7	
AA	
A	

	ISSN 0370-3	369x
1 70	Sumário	
a	Gestão da Qualidade na Fase Pré-Analítica Parte I: Análise Crítica do CLSI H3-A6	085
	Quality Management in Pre Analytical Phase Part I: Critical analyze of CLSI H3-A6	
2	Perfil Hematológico e sorológico dos pacientes suspeitos de Dengue atendidos no Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria – ENSP/FIOCRUZ durante a epidemia de 2008 no Rio de	000
línic	Janeiro Fabiano de Jesus Santos, Riany da Silva Silveira, Flávia de Oliveira Cardoso, Ana Maria Luiz da Silva, Joyce Eliza de Oliveira, Luciana Galdino Portugal, Dayse Figueira de Cilveira, Simone Marques Souza Lopes, Selma do Rosário Lima Serological blood profile of patients suspected of Dengue attended in the School Health Center Germano Sinval Faria - ENSP / FIOCRUZ during the epidemic of 2008 in Rio de Janeiro	.089
	Avaliação da Susceptibilidade a Antifúngicos de Diferentes Espécies de Leveduras Candida Isoladas de Mucosa Bucal e Pele. Volmir Pitt Benedetti, Gheniffer Fornari, Nathalia Rasti Schervinski Evaluation of Antifungal Susceptibility of Different Species of Candida Yeast Isolated from Buccal Mucosa	093
U	and Skin	
	Infecção Urinária em Gestantes: Perfil de Sensibilidade dos Agentes Etiológicos de Gestantes Atendidas pelo SUS na Cidade de Palmas - PR Anne Caroline Pereira, Jardel C. Bordignon	096
S	Urinary Infection in Pregnants: Susceptibility Profile of Etiological Agents in Pregnants Followed by SUS in the City of Palmas – PR	
0	Validação do método titulométrico para determinação de etanol em sangue utilizando ácido nitrico 54% e ácido sulfúrico concentrado	100
1.8	Simone Aparecida Galerani Mossini, Juliana Keiko Inoue, Miguel Machinski Junior, Paula Nishiyama Validation of chemical titration for blood-alcohol determination using nitric acid 54% and concentrated sulfuric acid	
	Síndrome metabólica em adultos atendídos no Programa Saúde da Família em Barra do Garças/MT	106
,CD	Sávia Oliveira de Rezende & María Fernanda Spegiorin Salla Brune Metabolic syndrome in adult users of the "Programa Saúde da Familia", Barra do Garças/MT	
	Caracterização do Perfil de Resistência à Fluoroquinilonas, Patos de Minas (MG) Rodollo Augusto Araujo Rabello, Lydiane Lara Caixeta, Soraya Carolina Caixeta, Marcos Vinicius Rocha e Vanessa Pereira Tolentino Felicio Caracterization of the of Resistance to Fluoroquinilonas, Patos de Minas (MG)	110
V	Envolvimento das quimiocinas CCL2 e CCL5 na patogênese do câncer de mama	116
AY	Involvement of CCL2 and CCL5 chemokines in breast cancer pathogenesis	
7	Influência da alimentação sobre o hemograma. Lia Yuki Tomoeda, Everson Augusto Krum, Giovani Marino Favero, Railson Henneberg Influence of feeding in hemograma	121
eira de Anális	Diagnóstico laboratorial da dengue: Situação atual e perspectivas André S. de Oliveira, Nina R. Dutre, Eliziária C. dos Santos, Marilia B. de Paula, Leandro L. de Oliveira, Eduardo de A. Marques, Sérgio O. de Paula Dengue Laboratory Diagnosis: Actual Situation and Perspectives	125
Ç	Imunocitoquímica e Imunohistoquímica para o Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose	12000
1	Tegumentar Americana S. N. Lunedo, V. Thomaz Soccol, E. A. Castro; J. E. Queiroz Teiles Immunocytochemistry and Immunohistochemistry for Laboratorial Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis	131
	Freqüência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas: análise de 213 casos	
	diagnosticados na Fundação Hemope	135
	Frequency of aberrant immunophenotypes in acute leukemia: analysis of 213 cases diagnosed in	

Super Bonder®"

Lucas do Amaral Santos, Leonardo de Souza Vasconcellos, Andy Petrolanu

Microorganisms Diffusion, Growth Inhibition and Biocide Activity of the "Super Bonder® Cyanoacrylate" Estudo Epidemiológico da Pitiríase Versicolor na Cidade de João Pessoa, PB, de 1999 a 2008 142 Lizandro Leite Brito: Edeltrudes Oliveira Lima, Egberto Santos Carmo; Fátima F. P. Carvalho, Priscilla B. S. de Albuquerque, Lizandro Lejide Brito: Edeltrudes Oliveira Lima, Egberto Santos Carmo; Fátima F. P. Carvalho, Priscilla B. S. de Albu Mariana M. P. de Figueirêdo

Epidemiological studies of Pityriasis Versicolor in the city of João Pessoa, PB, from 1999 to 2008 Perfil Antimicrobiano de Cepas de Escherichia coli Isolados de Pessoas com Suspeita de Infecção do Trato Urinário

MALDANER, Nádia Ione, CAVALLI, Vanessa, ROSSI, Eliandra Mirlei, SCAPIN, Diane, SARDIGLA, Cassius Ugarte

Antimicrobial profile of Escherichia coli strains isolated of peoples with suspect of urinary tract infections Aspectos clínico-laboratorials de crianças com Doença Falciforme Anacleto de Carvalho Neto, Marcelo Land, Marcos Fleury
Clinical and laboratorial aspects in children with sickle cell disease

Difusão de Microrganismos, Inibição do Crescimento e Atividade Biocida do "Cianoacrilato

Institute of Geriatrics and Gerontology - PUCRS Diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas160 Diagnostice units
Paulo Cesar Nacum
Differential diagnosis of microcytic and hypochromic anemia

RBAC é uma publicação da

Fundação Hemope



Volume 43 Número 2 Ano 2011





Gestão da Qualidade na Fase Pré-Analítica Parte I: Análise Crítica do CLSI H3-A6

Quality Management in Pre Analytical Phase Part I: Critical analyze of CLSI H3-A6

Gabriel Lima-Oliveira*^{1,2,3}, Luiz Fernando Barcelos^{1,2,3,4}, José Abol Corrêa^{1,2,4}, João Ciribelli Guimarães^{1,2,4}
Paulo Murillo Neufeld^{1,4}, Irineu Grinberg^{1,4}

RESUMO - A fase pré-analítica, segundo dados da literatura, é responsável por mais de dois terços de todos os erros atribuídos ao laboratório de análises clínicas, e há apenas alguns procedimentos de rotina para a detecção de não conformidades neste domínio de atividades. Nosso objetivo foi fazer uma análise crítica do CLSI H3-A6 *Procedimentos para a coleta do espécime diagnóstico sanguíneo por punção venosa* para ajudar o flebotomista e o gestor da qualidade a garantir a segurança do paciente. Nós confrontamos os detalhes do CLSI H3-A6, com as publicações internacionais mais recentes e concluímos que os procedimentos relacionados à punção venosa necessitam de pequenas mudanças para garantir a segurança do paciente.

Palavras Chaves: CLSI H3-A6, coleta de sangue, espécime diagnostico sanguíneo, fase pré analítica, flebotomia, flebotomista

SUMMARY - The pre analytical phase is responsible for more than two-thirds of all errors attributed to the clinical laboratory and there are only a few routine procedures for the detection of nonconformities in this field of activity. Our aim was make a critical analyze of CLSI H3-A6 Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture to help the phlebotomists and quality manager guarantee the patient safety. We contrast details from CLSI H3-A6 with up to date from literature and conclude that the procedures related venipuncture needs little changes to guarantee the patient safety. **Keywords:** CLSI H3-A6, blood collection, diagnostic blood specimen, pre analytical phase, phlebotomy, phlebotomist

INTRODUÇÃO

A fase pré-analítica é responsável por mais de dois terços de todos os erros atribuídos ao laboratório de análises clínicas¹⁴, e há apenas alguns procedimentos de rotina para a detecção de não conformidades neste domínio de atividades⁵⁻⁶. Nesta fase, os procedimentos que envolvem a flebotomia, fundamental para a obtenção do espécime diagnóstico sanguíneo, são pouco estudados no que diz respeito às principais fontes de erros e os procedimentos relacionados ao processo de gestão da qualidade7-8. A coleta do espécime diagnóstico sanguíneo para exames laboratoriais de rotina no Brasil são tradicionalmente realizados por técnicos, auxiliares de enfermagem, técnicos de enfermagem e enfermeiros, conhecidos internacionalmente como flebotomistas, seguindo as orientações do CLSI. Neste contexto, alguns detalhes pré-analíticos e procedimentos são críticos, tais como: a) o tempo adequado de jejum antes da coleta de sangue⁹; b) uso apropriado dos tubos de coleta a vácuo¹⁰⁻¹² e aditivos¹³⁻¹⁵; c) adequação da coleta do sangue, armazenamento e centrifugação 16-18; e d) estrita conformidade com as recomendações quanto ao tempo de aplicação do torniquete 19-21. Resultados laboratoriais influenciam aproximadamente de 60% a 70% das decisões médicas²² e, portanto, pode afetar o diagnóstico

e/ou o tratamento dos pacientes²³. Nosso objetivo foi fazer uma análise crítica do CLSI H3-A6 *Procedimentos para a coleta do espécime diagnóstico sanguíneo por punção venosa*²⁴ para ajudar os flebotomistas e os gestores da qualidade dos laboratórios de analises clínicas a garantir a segurança dos pacientes.

ANÁLISE CRÍTICA DO CLSI H3-A6

Desde 1977 o CLSI reconhece as fontes de erros provenientes da fase pré analítica e trabalha para fornecer informações que possam auxiliar os profissionais a garantir a qualidade da amostra biológica, pois é impossível fornecer resultados confiáveis a partir de amostras biológicas não conforme ²⁴.

A. CADEIRA PARA COLETA

A cadeira para coleta deve ser desenhada para proporcionar o máximo conforto possível e principalmente garantir a segurança do paciente no caso de evento adverso²⁴, como desmaio por exemplo. No item 6.1 do CLSI H3-A6 está claramente descrito que os braços da cadeira devem ser ajustáveis para proporcionar o posicionamento do braço e antebraço adequado à punção. Infelizmente a realidade brasileira não é esta. A maioria dos gestores preocupa-se

Recebido em 14/04/2011
Aprovado em 08/06/2011
1. Sistema Nacional de Acreditação - DICQ
2. Sociedade Brasileira de Analises Clinicas - SBAC
3. Comitê Setorial Mercosul de Análises Clínicas e Diagnóstico In Vitro – CSM 20
4. Programa Nacional de Controle da Qualidade – PNCQ

apenas com o conforto e segurança do paciente e adquirem em seus laboratórios cadeiras ou poltronas com apoio para os braços fixo; esta situação muitas vezes pode induzir o flebotomista a aplicar o torniquete por mais de um minuto para "garantir" o fluxo de sangue durante a coleta.

B. PROCEDIMENTO DE PUNÇÃO VENOSA

O procedimento para punção venosa descrito no CLSI H3-A6 consiste nos seguintes passos:

- a) Verificar a requisição de exames;
- b) Realizar a identificação do paciente (conferir se o paciente cadastrado é o paciente na sala de coleta) e higienizar as mãos;
- c) Verificar se o paciente está com o jejum adequado ao exame solicitado e se o mesmo é alérgico ao látex, em caso afirmativo, utilizar torniquete e luva livre de látex;
- d) Separar o material necessário e apropriado para a coleta dos exames solicitados;
- e) Posicionar o paciente;
- f) Aplicar o torniquete, selecionar o sitio de punção e a veia a ser puncionada;
- g) Vestir as Iuvas;
- h) Realizar a anti-sepsia do sitio de punção e aguardar o anti-séptico volatilizar;
- i) Realizar a punção venosa e quando iniciar o fluxo de sangue solicitar ao paciente que abra a mão;
- j) Completar os tubos de coleta respeitando a ordem correta:
- h) Soltar e remover o torniquete;
- I) Posicionar uma gaze sobre o sitio de punção;
- m) Remover a agulha e ativar o dispositivo de segurança;
- n) Aplicar pressão sobre o sitio de punção até estancar o sangramento para posterior aplicação do curativo;
- o) Etiquetar os tubos e registrar o horário da coleta. Alguns laboratórios identificam o flebotomista no tubo também.
- p) Verificar se existe processamento especial para os exames coletados:
- g) Enviar os tubos identificados ao laboratório.

B.1 ANALISANDO O PROCEDIMENTO DE PUNÇÃO VENOSA

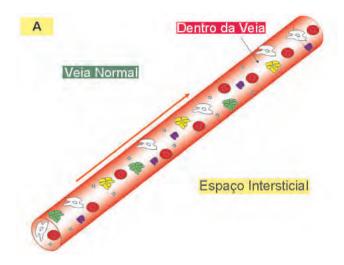
B.1.1 Jejum

Uma grande parte dos laboratórios brasileiros preocupa se apenas com a glicemia e o perfil lipídico quando se refere a jejum. O item C, descrito acima, aborda este tópico, referente ao jejum adequado ao exame solicitado. LIPPI et al⁹ demonstraram a influência da alimentação nos exames hematológicos de rotina (hemograma completo), para os quais raramente solicita-se jejum. O gestor da qualidade de cada laboratório deve padronizar o tempo de jejum para cada tipo de exame e não simplesmente adequar em função da glicemia ou perfil lipídico.

B.1.2 APLICAÇÃO DO TORNIQUETE

O torniquete pode ser definido como um instrumento de compressão, usado para obstruir temporariamente a circulação sanguínea do braco e ante braco, por um determinado tempo através da aplicação de uma pressão local. Esta pressão ao ser aplicada sobre a pele é transferida à parede dos vasos causando uma oclusão transitória²⁵. No caso do laboratório de análises clínicas, a oclusão venosa pelo torniquete induz um aumento da pressão de filtração através das paredes dos capilares. Líquido e compostos de baixo peso molecular passam pelas paredes dos capilares abaixo do local de aplicação do torniquete, produzindo hemoconcentração²⁶⁻²⁷. O aumento na turgidez dos vasos sanguíneos pelo acumulo de sangue facilita sua identificação e punção subsegüente. O torniquete, também designado de garrote, pode ser classificado em pneumático e não pneumático. Os torniquetes ditos pneumáticos são constituídos de um manguito conectado a um ducto, o qual permite inflá-lo com gás ou ar comprimido²⁸. No Brasil o torniquete mais utilizado na coleta do espécime diagnóstico é o tipo não pneumático, constituído de látex. Porém o CLSI H3-A6, preconiza a utilização dos torniquetes pneumáticos pela facilidade de padronização na pressão a ser aplicada e preferencialmente livre de látex na sua composição. O torniquete deve ser aplicado com uma distância de aproximadamente 7,5 cm acima do sitio de punção e deveria ser apertado o suficiente para obstruir o fluxo venoso e não afetar o fluxo arterial (não inflar mais que 40 mmHg)²⁴⁻²⁵. Em condições fisiológicas as concentrações dos elementos que compõe o sangue são homogêneas em toda a extensão do vaso. A obstrução do fluxo sanguíneo gerada pela aplicação do torniquete produz hemoconcentração pela estase venosa na região do vaso afetada pela aplicação do torniquete influenciando nos resultados laboratoriais 19-21. A Figura 1 mostra uma representação esquemática dos principais eventos associados à hemoconcentração associada ao uso do torniquete.

O item 8.6.1 do CLSI H3-A6 preconiza que a utilização do torniquete não deve exceder 1 minuto devido a hemoconcentração induzida pela estase venosa²⁴. Na prática sabe-se que este tempo não é respeitado por mais de 90% dos profissionais que realizam coleta de sangue para fins laboratoriais²⁹. Podemos atribuir parte da responsabilidade por esta não conformidade observada em relação ao tempo de aplicação do torniquete para coleta de sangue ao próprio CLSI H3-A6, pois se seguido o passo a passo do procedimento descrito neste documento "f) Aplicar o torniquete, selecionar o sitio de punção e a veia a ser puncionada; g) Vestir as luvas; h) Realizar a anti-sepsia do sitio de punção e aguardar o antiséptico volatilizar; i) Realizar a punção venosa e quando iniciar o fluxo de sangue solicitar ao paciente que abra a mão: i) Completar os tubos de coleta respeitando a ordem correta; h) Soltar e remover o torniquete;" certamente o tempo de aplicação do torniquete será superior ao tempo preconizado. O tempo de aplicação do torniquete é um importante indicador à gestão da qualidade laboratorial⁷. Recentes publicações demonstraram que a aplicação do torniquete por mais de 30 segundos pode alterar significativamente os resultados laboratoriais de rotina



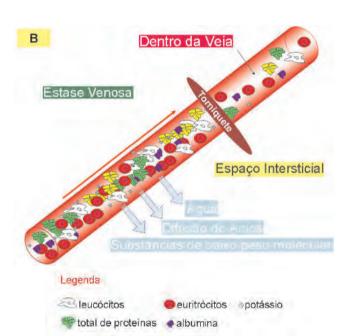


Figura 1. Representação esquemática do efeito da estase venosa induzida pela aplicação do torniquete em constituintes do sangue

Elementos celulares como leucócitos e eritrócitos, macromoléculas como lipoproteínas, proteínas, compostos associados às proteínas, moléculas de baixo peso molecular como glicose e eletrólitos, tem difusão do ambiente intracelular para o interstício em homeostasia (Figura 1-A). A aplicação do torniquete obstrui o fluxo sanguíneo criando um ambiente de estase venosa (Figura 1-B) que promove hemoconcentração devido ao efluxo de água, íons difusíveis e moléculas de baixo peso molecular para o interstício. Ou seja, elementos de baixa massa molecular difundem-se com a água e reduzem suas concentrações no vaso e compostos de alta massa molecular por não se difundirem apresentam-se com maior concentração relativa.

na hematologia³⁰ e coagulação³¹. Por quanto tempo o profissional que realiza coleta em seu laboratório aplica o torniquete? Se você é um laboratório acreditado pelo DICQ, participantes do PNCQ ou sócios da SBAC e não possui uma resposta para esta pergunta, mas gostaria de implementar o indicador de tempo de aplicação do torniquete, basta entrar em contato conosco e solicitar a lista de verificação gratuitamente.

B.1.3 CONSTRIÇÃO DO MÚSCULO DO ANTEBRAÇO

O Item 8.6.4 do CLSI H3-A6 é extremamente claro sobre a interferência da constrição do músculo do antebraço "Cleanch" novimento caracterizado pela atividade de abrir e fechar a mão. No entanto, se o paciente for corretamente orientado a simplesmente fechar a mão uma única vez este procedimento irá auxiliar o flebotomista a selecionar o sitio e a veia ser puncionada. A Figura 2 representa esquematicamente as alterações nos resultados de potássio provocadas pela constrição do músculo do antebraço.

B.1.4 ORDEM DE PREENCHIMENTO DOS TUBOS

A ordem preconizada no item 8.10 do CLSI H3-A6 é a descrita abaixo:

- 1. Frasco de hemocultura:
- 2. Tubo para exames de coagulação;
- Tubo que ao final da centrifugação irá fornecer soro (com ou sem aditivo pro coagulante; com ou sem gel separador);
- 4. Tubo heparinizado com ou sem gel separador:
- 5. Tubo com EDTA, este contendo ou não gel separador;
- 6. Tubo contendo inibidor glicolítico.

Esta seqüência descrita não é nenhuma novidade, uma vez que o CLSI H3-A6 é uma publicação de 2007 e respeitados pesquisadores estão chamando atenção para a seqüência correta desde 1982³⁴ e após a publicação do CLSI H3-A5³⁵ (versão anterior do documento que estamos realizando a análise crítica) já foram publicados outros estudos relacionados à seqüência de preenchimento dos tubos³⁶, técnica³⁷ e influência do diâmetro da agulha³⁸. No entanto,

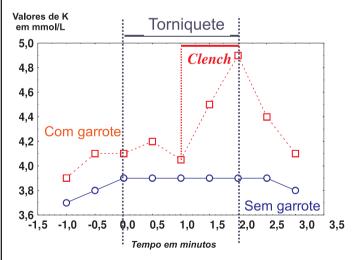


Figura 2. Efeito do torniquete e contração do músculo do antebraço (clench) na potassemia.

A aplicação do torniquete durante a coleta (quadrados abertos) aumenta a concentração de potássio sérico quando comparado com a coleta sem torniquete (círculos abertos). A contração do músculo do antebraço (clench), associada ao torniquete, potencializa a elevação do potássio sérico, evidenciando o efeito destes elementos da fase préanalítica no resultado da potassemia. Adaptado de Kaplan e Pesce³³.

alguns fabricantes insistem em possuir uma seqüência própria sem demonstrar fundamentação técnica. Lima-Oliveira et al⁷ desde 2009 incentiva os usuários destas marcas comerciais a solicitar dos fornecedores fundamentação técnica para a orientação de seqüência de coleta recebida divergente do CLSI. Nós nesta análise crítica incentivamos aos gestores da qualidade que solicitaram esta fundamentação teórica e não receberam a treinar seus colaboradores na seqüência preconizada pelo CLSI mesmo que seja divergente do fabricante.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a análise critica pontual do CLSI H3-A6 neste artigo demonstrou que pequenos detalhes previnem grandes erros. Esperamos que este primeiro artigo de uma série que fará a analise crítica dos documentos do CLSI relacionados à fase pré-analítica possa ajudar aos nossos colegas gestores da qualidade, supervisores, coordenadores e colaboradores a garantir a segurança dos pacientes atendidos em seus serviços.

AGRADECIMENTO

Nosso muito obrigado aos Srs Matteo Gelati e Davide Bronzini pela criação da figura 1.

REFERÊNCIAS

- 1. Wallin O, Soderberg J, Van Guelpen B, Stenlund H, Grankvist K, Brulin C. Preanalytical venous blood sampling practices demand improvement--a survey of test-request management, test-tube labelling and information search procedures. Clin Chim Acta2008 May;391(1-2):91-7.
- 2. Lippi G, Bassi A, Brocco G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Preanalytic error tracking in a laboratory medicine department: results of a 1-year experience. Clin Chem2006 Jul;52(7):1442-3.
- 3. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. Clin Chem2007 Jul;53(7):1338-42.
- 4. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. Clin Chem1997 Aug;43(8 Pt 1):1348-51.
- 5. Lippi G, Fostini R, Guidi GC. Quality improvement in laboratory medicine: extra-analytical issues. Clin Lab Med2008 Jun;28(2):285-94, vii.
- 6. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. Clin ChemLab Med2007;45(6):720-7.
- 7. Lima-Oliveira GS, Picheth G, Sumita NM, Scartezini M. Quality control in the collection of diagnostic blood specimens: illuminating a dark phase of preanalytical errors. J Bras Patol Med Lab2009:45:441-7.
- 8. Lippi G, Guidi GC. Preanalytic indicators of laboratory performances and quality improvement of laboratory testing. Clin Lab2006;52(9-10):457-62.
- 9. Lippi G, Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Montagnana M, Gelati M, Picheth G, et al. Influence of a light meal on routine haematological tests. Blood Transfus2010 Apr;8(2):94-9.
- 10. Loh TP, Saw S, Chai V, Sethi SK. Impact of phlebotomy decision support application on sample collection errors and laboratory efficiency. Clin Chim Acta Jan 30;412(3-4):393-5.
- 11. Gosselin RC, Janatpour K, Larkin EC, Lee YP, Owings JT. Comparison of samples obtained from 3.2% sodium citrate glass and two 3.2% sodium citrate plastic blood collection tubes used in coagulation testing. Am J Clin Pathol2004 Dec;122(6):843-8.
- 12. Kratz A, Stanganelli N, Van Cott EM. A comparison of glass and plastic blood collection tubes for routine and specialized coagulation assays: a comprehensive study. Arch Pathol Lab Med2006 Jan;130(1):39-44.
- 13. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Influence of two different buffered sodium citrate concentrations on coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis2005 Jul;16(5):381-3.
- 14. Saigo K, Sakota Y, Masuda Y. [EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: clinical aspects and laboratory tests]. Rinsho Byori2005 Jul;53(7):646-53.

- 15. Sharratt CL, Gilbert CJ, Cornes MC, Ford C, Gama R. EDTA sample contamination is common and often undetected, putting patients at unnecessary risk of harm. Int J Clin Pract2009 Aug;63(8):1259-62.
- Salvagno GL, Lippi G, Bassi A, Poli G, Guidi GC. Prevalence and type of pre-analytical problems for inpatients samples in coagulation laboratory. J Eval Clin Pract2008 Apr;14(2):351-3
- 17. van Geest-Daalderop JH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJ, Hoekstra MM, van den Besselaar AM. Preanalytical variables and off-site blood collection: influences on the results of the prothrombin time/international normalized ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy. Clin Chem2005 Mar;51(3):561-8.
- 18. Polack B, Schved JF, Boneu B. Preanalytical recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hemostase et la Thrombose' (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. Haemostasis2001 Jan-Feb;31(1):61-8.
- 19. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis2005 Sep;16(6):453-8.
- 20 Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC. Venous stasis and routine hematologic testing. Clin Lab Haematol2006 Oct;28(5):332-7.
- 21. Lippi \ddot{G} , Salvagno GL, Montagnana M, Brocco \ddot{G} , Guidi GC. Influence of short-term venous stasis on clinical chemistry testing. Clin Chem Lab Med2005;43(8):869-75.
- 22. Hallworth M, Hyde K, Cumming A, Peake I. The future for clinical scientists in laboratory medicine. Clin Lab Haematol2002 Aug;24(4):197-204.
- 23. Young DS. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests 3ed. Washington: AACC Press; 2007.
- 24. CLSI. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. NCCLS H3-A6.6 ed2007.
- 25. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. Clin Lab2006;52(5-6):217-30.
- 26. Lima-Oliveira GS, Picheth G, Assan NK, Ferreira CES, Sumita NM, Scartezini M. The effects of tourniquet application during 1 minute versus subcutaneous tissue transilluminator device in blood sample collection on biochemical parameters. Clin Chem. [Annual Meeting Abstracts]. 2007;53(S6):123.
- 27. Lima-Oliveira GS, Picheth G, Assan NK, Ferreira CES, Mangueira CLP, Sumita NM, et al. The effects of tourniquet application vs. subctaneous tissue transilluminator device in blood sample collection on hematological parameters. Award Recipient at the XXth ISLH Symposium. Int J Lab Hematol 2007;29:37.
- 28. Peckler B, Hsu CK. Tourniquet syndrome: a review of constricting band removal. J Emerg Med2001 Apr; 20(3):253-62.
- 29. Lima-Oliveira GS, Picheth G, Sumita NM, Scartezini M. Phlebotomists performance during blood sample collection in public and private clinical laboratories in são paulo city, brazil. Clin Chem. 2007;53(S6):205.
- 30. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Scartezini M, Guidi GC, et al. Transillumination: a new tool to eliminate the impact of venous stasis during the procedure for the collection of diagnostic blood specimens for routine haematological testing. Int J Lab Hematol 2011 Mar 17. doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01305.x. [Epub ahead of print].
- 31.Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Scartezini M, Picheth G, et al. Elimination of the venous stasis error for routine coagulation testing by transillumination. Clin Chim Acta2011 Jul 15;412(15-16):1482-4.
- 32. Baer DM, Ernst DJ, Willeford SI, Gambino R. Investigating elevated potassium values. MLO Med Lab Obs2006 Nov;38(11):24, 6, 30-1.
- 33. Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry. Theory, analysis, correlation. 3 ed. St. Louis: Mosby; 1996.
- 34. Calam RR, Cooper MH. Recommended "order of draw" for collecting blood specimens into additive-containing tubes. Clin Chem1982 Jun;28(6):1399.
- 35. CLSI. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. NCCLS H3-A5.5 ed2003.
- 36. Ernst DJ, Calam R. NCCLS simplifies the order of draw: a brief history. MLO Med Lab Obs2004 May;36(5):26-7.
- 37. Lippi G, Salvagno GL, Brocco G, Guidi GC. Preanalytical variability in laboratory testing: influence of the blood drawing technique. Clin Chem Lab Med2005;43(3):319-25.
- 38. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2006 Oct; 17(7):557-61.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. MsC. Gabriel Lima-Oliveira Rua Vicente Licínio, 99,Tijuca, Rio de Janeiro/RJ CEP 20270-902

Email: dr.g.lima.oliveira@gmail.com

Perfil Hematológico e sorológico dos pacientes suspeitos de Dengue atendidos no Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria – ENSP/FIOCRUZ* durante a epidemia de 2008 no Rio de Janeiro

Serological blood profile of patients suspected of Dengue attended in the School Health Center Germano Sinval Faria – ENSP/FIOCRUZ* during the epidemic of 2008 in Rio de Janeiro

Fabiano de Jesus Santos¹, Riany da Silva Silveira¹, Flávia de Oliveira Cardoso¹, Ana Maria Luiz da Silva¹, Joyce Eliza de Oliveira¹, Luciana Galdino Portugal¹, Dayse Figueira de Oliveira¹, Simone Marques Souza Lopes¹ & Selma do Rosário Lima¹

RESUMO - No mundo atual, onde a globalização e as mudanças climáticas nos obrigam a considerar novos temas ecológicos, políticos, demográficos e sociais, ocupa um espaço importante o problema das doenças emergentes e reemergentes, entre as quais a dengue se destaca por sua rápida extensão e aumento da morbi-mortalidade. A dengue é uma arbovirose mais freqüente em todo mundo, é causada por um vírus pertencente ao gênero Flavivírus, cuja transmissão ocorre através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, ou através da transmissão mecânica realizada pelo mesmo. A infecção por dengue causa um doença cujo espectro inclui desde infecções inaparentes até quadros de hemorragia e choque, podendo evoluir para êxito letal. É uma doença que apresenta um comprometimento clínico individual, contudo o diagnóstico se divide em específico (isolamento e sorologia) e não-específico (hemograma completo e plaquetometria). O objetivo deste trabalho é expor o perfil hematológico e sorológico que os pacientes suspeitos de dengue atendidos no Laboratório de Diagnóstico Ensino e Pesquisa apresentaram. Foi analisado o perfil de 1635 hemogramas e 610 sorologias. Com esse estudo observamos que o índice de positividade entre crianças com idade entre 6 meses e 5 anos foi superior a outras faixas etárias, atingindo um percentual de 23%.

Palavras-chave: Hemograma, Sorologia, Dengue.

SUMMARY - In today's world, where globalization and climate change require us to consider new ecological, political, demographic and social characteristics, issue occupies an important area the issue of emerging diseases and re-emerging, including dengue fever is marked by its Rapid expansion and increase of morbidity and mortality. Dengue is an arbovirus most common worldwide. It is caused by a virus belonging to the genus Flavivirus, whose transmission occurs through the bite of the Aedes aegypti mosquito, or by mechanical transmission by the same. The dengue infection causes a disease whose spectrum includes since inapparent infections until bleeding and shock, can may evolve into lethal success. It is a disease that presents a individual clinical consequences, but the diagnosis is divided into specific (isolation and serology) and non-specific (complete blood count and plaquetometria). The aim is to expose the blood profile and serological that patients suspected of dengue attended at Diagnostic Laboratory Teaching and Research showed. We analyzed the profile of blood and 610 serology 1635. With this study we observed that the rate of positivity among children aged 6 months and 5 years was higher than other age groups, reaching a percentage of 23%. **Keywords:** Blood, Serology, Dengue.

INTRODUÇÃO

No mundo atual, onde a globalização e as mudanças climáticas nos obrigam a considerar novos temas ecológicos, políticos, demográficos e sociais, ocupa um espaço importante o problema das doenças emergentes e re-emergentes, entre as quais a dengue se destaca por sua rápida extensão e aumento da morbimortalidade. As razões para emergência e re-emergência de patógenos são variadas, e incluem desde alterações ambientais até mutações do agente.

A dengue é uma arbovirose mais freqüente em todo o mundo, é causada por um vírus pertencente ao gênero Flavivírus da família Flaviviridae, do qual são reconhecidos quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. O vírus se acopla às células suceptíveis que são

macrófagos e monócitos. A penetração na célula do hospedeiro é possível por dois mecanismos: O envoltório viral pode fundirse à membrana celular, com a deposição imediata do nucleocapsídeo dentro do citoplasma; ou através da invaginação da membrana plasmática que forma endossomo ao redor do vírus, envolvendo-o. A transmissão se faz pela picada do mosquito Aedes aegypti, principal vetor, no ciclo homem - Aedes aegypti - homem. Após um repasto de sangue infectado, o mosquito fica apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação. A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro suscetível próximo. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem de fontes de água ou alimento.

A infecção por dengue causa uma doença cujo

Recebido em 10/02/2009 Aprovado em 28/02/2011 *Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz ¹ Laboratório de Diagnóstico Ensino e Pesquisa espectro inclui desde infecções inaparentes até quadros de hemorragia e choque, podendo evoluir para êxito letal. Apresenta-se como dengue clássica (DC), uma doença autolimitada, mas severa, semelhante à influenza, ou como febre hemorrágica da dengue ou dengue hemorrágica (FHD)¹.

A dengue é uma doença que apresenta um comprometimento clínico individual, portanto é estabelecido pelo Ministério da Saúde um diagnóstico laboratorial que se divide em específico (isolamento e sorologia) e não-específico (hemograma completo e plaquetometria). Os exames realizados para isolamento do vírus constituem o método mais específico para determinação do sorotipo responsável pela infecção e os testes sorológicos complementam tal isolamento. O Hemograma Completo possibilita a obtenção de todos os parâmetros hematológicos, nos quais podemos citar: leucometria global e suas subpopulações como basófilo, neutrófilo, monócito, linfócito e eosinófilo, hematimetria, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. A plaquetometria constitui uma avaliação a parte do hemograma completo, contudo por conveniência é realizado e liberado mesmo quando não é solicitado, pois atualmente a maioria dos laboratórios é dotada de equipamentos automatizados que realizam tanto o hemograma completo quanto a plaquetometria ao mesmo tempo. São testes simples e imprescindíveis para um prévio diagnóstico e monitoramento da doença, em geral os pacientes portadores da dengue podem apresentar leucopenia, embora possa haver leucocitose; linfocitose com atipia linfocitária, trombocitopenia que é revelada a partir da plaquetometria e hemoconcentração, que é evidenciado pelo aumento do hematócrito1,2,3.

As primeiras epidemias de dengue foram registradas em Jakarta na Ilha de Java, Alexandria e Cairo no Egito em 1779 e Filadélfia no Estados Unidos em 1780. No Brasil, a partir de 1986 diversas epidemias da doença vem assolando o território nacional².

Em 2008, o Rio de Janeiro passou por mais uma das grandes epidemias de dengue no Brasil. O Laboratório de Diagnóstico Ensino e Pesquisa do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria da ENSP/FIOCRUZ atendeu aproximadamente 2000 pacientes suspeitos de dengue, levando em consideração que este departamento da FIOCRUZ é destinado à atenção básica e atende prioritariamente a população do entorno de Manguinhos, e que neste momento crítico de epidemia expandiu a assistência estabelecendo atendimento, não só a população de Manguinhos, mas a todos que procuravam pela instituição.

O objetivo deste trabalho é expor o perfil hematológico e sorológico que esses pacientes apresentaram e esboçar o aspecto epidemiológico, o que contribui para reflexão e ações que visem medidas preventivas, evitando assim, a reincidência epidêmica, melhorando e garantindo a saúde da população.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi analisado, retrospectivamente, o perfil de 1635

hemogramas dos pacientes suspeitos de dengue atendido no Laboratório de Diagnóstico Ensino e Pesquisa do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria - ENSP/FIOCRUZ* no período de janeiro a maio de 2008 e desses 1635 pacientes foram realizadas também 610 sorologias para dengue. As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com EDTA para realização do hemograma e tubo com gel e sem anticoagulante para realização da sorologia. Os hemogramas foram realizados no equipamento automatizado Sysmex Xs1000i, seguindo-se o procedimento do fabricante. Simultaneamente realizamos controles internos fornecidos pelos fabricantes do equipamento, controles externos que fazem parte do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) fornecido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) e foi realizado também a hematoscopia de todos os pacientes sendo as lâminas foram coradas pelo método de Wright. O princípio da metodologia do equipamento Sysmex Xs1000i baseia-se na impedância elétrica e citometria de fluxo por fluorescência. As sorologias para dengue foram realizadas no laboratório de imunodiagnóstico do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas da FIOCRUZ, o método utilizado foi Enzimaimunoensaio (EIA). Visando o estudo dos resultados laboratoriais relacionados com a idade, subdividimos a amostra em três grupos: idades de 6 meses a 5 anos, 6 a 14 anos e 15 a 91 anos, constituídos respectivamente por 202, 453 e 980 indivíduos. Os pacientes foram agrupados segundo comparações estatísticas do perfil hematológico e sorológico encontrados.

RESULTADOS

Foi analisado que 1635 pacientes suspeitos de dengue realizaram hemograma e apenas 610 sorologia. O número absoluto de pacientes por mês está contido no Figura 1.

Para efeito deste trabalho subdividimos nossa análise por faixas etárias, sendo assim, dos 1635 pacientes, 132 (12%) tem idade entre 6 meses e 5 anos, 193 (28%) com idade entre 6 e 14 anos e 280 (60%) com idade entre 15 e 91 anos, como mostra a Figura 2.

Esses pacientes apresentaram o perfil hematológico e sorológico contidos nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente.

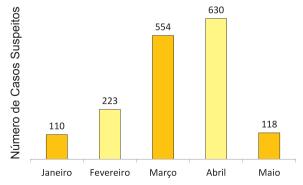


Figura 1: Distribuição mensal do número absoluto de pacientes atendidos

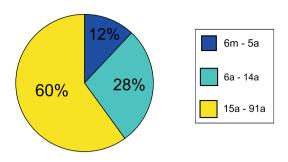


Figura 2: Distribuição percentual por faixa etária dos pacientes atendidos

Perfil Hematológico e Sorológico de pacientes com idade entre 6 meses e 5 anos

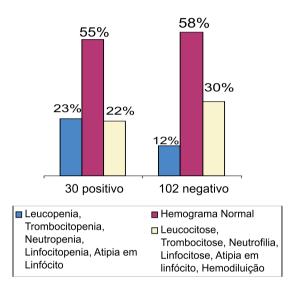


Figura 3: Distribuição analítica associando os pacientes com sorologia positiva ou negativa ao perfil Hematológico

Perfil Hematológico e Sorológico de pacientes com idade entre 6 e 14 anos

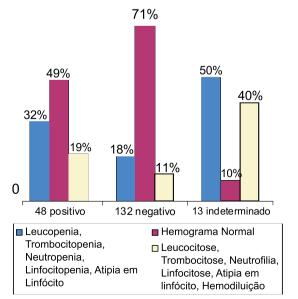


Figura 4: Distribuição analítica associando os pacientes com sorologia positiva ou negativa ao perfil Hematológico.

Perfil Hematológico e Sorológico de pacientes com idade entre 15 e 91 anos

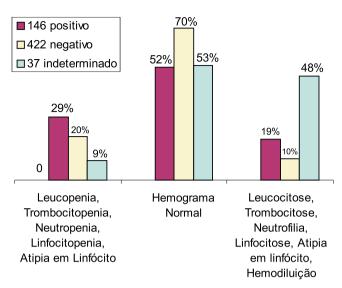


Figura 5: Distribuição analítica associando os pacientes com sorologia positiva ou negativa ao perfil Hematológico.

Perfil Hematológico dos pacientes que não realizaram sorologia

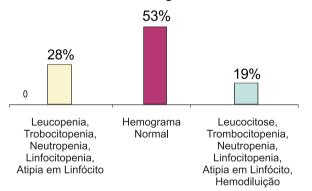


Figura 6: Distribuição dos dados hematológicos dos pacientes que não realizaram sorologia.

Analisamos também o perfil hematológico dos pacientes que não realizaram sorologia, estes resultados estão contidos na Figura 6.

Com esse estudo observamos que o índice de positividade entre crianças com idade entre 6 meses e 5 anos foi superior a outras faixas etárias, atingindo um percentual de 23% das 132 sorologias realizadas. Em segundo lugar ficou os indivíduos com idade entre 6 e 14 anos ou 24% de 193 sorologias, e em terceiro lugar com idade entre 15 e 91 anos que apresentou 24% de amostras positivas de 280 realizadas. Neste estudo bioestatístico foi observado também que em média 52,25% dos pacientes apresentaram hemograma normal, 28% apresentaram leucopenia, trombocitopenia, neutropenia, linfocitopenia, atipia em linfócito e hemoconcentração, 19,75% apresentaram leucocitose, neutrofilia, linfocitose, atipia em linfócito e hemodiluição.

DISCUSSÃO

É clássico que formas assintomáticas ou oligossintomáticas de dengue ocorram mais em crianças^{5,6}. Entretanto as crianças com diagnóstico sorológico confirmado de infecção pelo vírus da dengue poderia não ser diagnosticadas caso fossem considerados somente os critérios do Ministério da Saúde. Com esse estudo observamos que crianças com idade entre 5 meses e 6 anos apresentaram um índice de positividade superior a outras faixas etárias, além disso, 55% apresentaram Hemograma normal, e isso denuncia o desafio do diagnóstico da dengue em crianças. Com esse exame complementar é possível aumentar a sensibilidade para o diagnóstico, portanto é necessário que este esteja aliado aos sinais e sintomas clínicos.

Neste trabalho podemos observar claramente a dinâmica entre os parâmetros hematológicos e o perfil sorológico que esses pacientes apresentaram, ou seja, dos pacientes portadores de dados hematológicos tipicamente encontrados em pacientes com dengue, 19% apresentou sorologia negativa, e isso esclarece a possibilidade de um falso negativo, que pode ter ocorrido pelo simples fato de a coleta de sangue não ter sido realizada exatamente no período compreendido em que se obtêm as maiores concentrações de imunoglobulinas⁷; ou simplesmente este grupo pode ter sido infectado por patógenos que podem desencadear as mesmas alterações hematológicas. Em contrapartida tivemos 52,25% com hemograma normal e que revelou sorologia positiva, a justificativa para este fato contraditório está em alguns indivíduos, apesar de terem sido infectados com o vírus da dengue, possuírem capacidade de resposta fisiopatológica moderada. Nesse estudo constatamos também que 19% dos pacientes apresentaram sorologia positiva, porém um quadro hematológico totalmente atípico para dengue, mas compatível com outras patologias. Neste grupo podemos citar hipoteticamente a presença de outras infecções associadas, que consequentemente exacerbou a resposta fisiopatológica não especificamente apenas para infecção pelo vírus da dengue.

É fato que durante a epidemia, o diagnóstico clínico estava muito limitado ao hematócrito e plaquetometria, parâmetros hematológicos importantíssimo para o monitoramento clínico. Contudo este estudo evidenciou que apenas 28% apresentaram trombocitopenia e hemoconcentração, alteração mais esperada em pacientes acometido pela dengue. Assim podemos ressaltar uma contradição, pois de todos os pacientes que revelaram sorologia positiva para dengue, 52,25% tiveram hemograma normal, Isso nos leva a concluir que esta avaliação hematológica é de extrema importância apenas para o acompanhamento clínico e um prévio diagnóstico. Além disso, cabe ressaltar que os parâmetros hematológicos são avaliados de acordo com uma referência laboratorial tabelada, embora cada indivíduo possua sua referência clínica individual, devido a isso é necessário que os clínicos recorram aos hemogramas de cada indivíduo realizados anteriormente em avaliações periódicas.

AGRADECIMENTOS

À funcionária Aldaléia Ignácio Telles pelo precioso auxílio prestado.

REFERÊNCIAS

- 1. Martinez torres, Eric. Dengue. 2005 43-50p.
- 2. Coura, José Rodrigues. Doenças Infecciosas e Parasitárias 2008 24p.
- 3.Dengue: Aspectos Epidemiológicos, Diagnóstico e Tratamento/Ministério da saúde www.saude.gov.br/cartilhadenque.
- 4.www.medstudent8.com.br/content/resumos/resumodengue.
- 5. Nogueira AS. Dengue. J. Pediatria (Rio de Janeiro). 1999; 75 supl 1:59-14
- 6.Nogueira AS. Dengue. In: Fahat C. K., Carvalho ES, Carvalho LH, Succi R.C. Infectologia Pediátrica. 2° ed. Atheneu: São Paulo: 1998. 378 382p.
- 7 Ferreira, A. Walter. Diagnóstico e Laboratório 2008.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Fabiano de Jesus Santos Fundação Oswaldo Cruz

Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Manguinhos

Cep: 21041-210 RJ

E-mail: fjsantos@ensp.fiocruz.br

Avaliação da Susceptibilidade a Antifúngicos de Diferentes Espécies de Leveduras *Candida* Isoladas de Mucosa Bucal e Pele

Evaluation of Antifungal Susceptibility of Different Species of Candida Yeast Isolated from Buccal Mucosa and Skin

Volmir Pitt Benedetti¹; Gheniffer Fornari²; Nathalia Rasti Schervinski²

RESUMO - A variabilidade das diferentes espécies de *Candida* sp, juntamente com as distintas respostas às formas de tratamento, desenvolveram a necessidade da utilização de diferentes métodos diagnósticos e esquemas terapêuticos. Entre as leveduras deste grupo, a *Candida albicans* é um dos patógenos mais comuns envolvidos nas candidíases mucocutâneas e da orofaringe, porém as espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância devido ao acréscimo do perfil de resistência aos antifúngicos. A resistência da *Candida albicans* e das espécies não *albicans* ao fluconazol e outros derivados azólicos é descrito na literatura com freqüência, o que torna importante a realização de testes de susceptibilidade. Neste contexto esta pesquisa tem como objetivo determinar o perfil de susceptibilidade das leveduras *Candida* em diferentes sítios anatômicos. As leveduras isoladas da mucosa bucal e de pele foram semeadas em CHROMagar *Candida*, incubadas por 48 horas, a 35°C sendo posteriormente identificadas e avaliado *in vitro* o perfil de susceptibilidade utilizando o método da macrodiluição. Entre as 25 amostras analisadas, verificou-se um perfil de resistência maior ao fluconazol em comparação ao cetoconazol, sendo que 44% dos isolados de boca e 50% de pele mostraram-se resistentes ao fluconazol.

Palavras-chave: Candida sp, resistência, antifúngicos, susceptibilidade.

SUMMARY - The variability of the different species of Candida sp, together with the distinct responses to treatment, elicited the need of using different diagnostic methods and therapeutic programs. Among the yeast of this group, Candida albicans is one of the most common pathogens involved in muco-cutaneous and oropharingeal candidiases, but the non-albicans species have increased in number and importance due to antifungal resistance. The resistance of Candida albicans and the non-albicans species to fluconazole and other azolic derivatives is frequently reported, which makes susceptibility tests important. Within this scope, this research has the purpose of determining the susceptibility profile of Candida yeast from different anatomical sites. The yeast cells isolated from buccal mucosa and skin were seeded in CHROMagar Candida, incubated for 48 hours at 35°C; later, they were identified and the susceptibility profile was assessed in vitro using the macrodilution method. Of the 25 samples analyzed, a higher profile of resistance to fluconazole compared to ketoconazole was noticed, where 44% of the buccal and 50% of the skin isolates were resistant to fluconazole.

Keywords: Candida sp, resistance, antifungals, susceptibility

INTRODUÇÃO

A candidíase, principal infecção fúngica oportunista do ser humano, provocada por leveduras do gênero *Candida*, que fazem parte da microbiota do corpo humano. Essa infecção expressa muito a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, podendo ir do comensalismo à doença sistêmica fatal¹⁵.

Algumas características das leveduras do gênero *Candida* justificam o seu alto poder patogênico, como a capacidade deste microrganismo crescer em 37°C, formação de hifas e pseudo-hifas, manifestações alérgicas, ação de mananas, que podem provocar a depressão da imunidade celular, e produção de lipases e proteinases²¹.

Dentre as leveduras do gênero Candida, mais

freqüentemente associadas como agentes patológicos em humanos, estão *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilllermonii*, e *C. kefyr*. Sendo que *C. albicans* é uma espécie habitual do trato gastrintestinal, genital e cutânea dos seres humanos, a *C. tropicalis* que apresenta alta prevalência em casos de candidemia no Brasil e no mundo e, finalmente, a *C. glabrata* associada tanto em casos de candidemia em pacientes mais idosos quanto em casos de candidúria, além disso, esta ultima é frequentemente citada por apresentar resistência à terapêutica pelo fluconazol, sendo este grupo comumente transmitido por fatores endógenos^{3,6,11,13,18}.

As manifestações clínicas da candidíase apresentam grande diversidade de quadros, podendo ser divididas em três grupos: mucocutânea, cutânea e sistêmica. Na candidíase mucocutânea, os tecidos mais atingidos são os da mucosa oral e vaginal, sendo que a forma oral pode subdividir-se em cinco

Recebido em 22/06/2009 Aprovado em 21/03/2011

¹Professor dos Cursos de Biomedicina e Nutrição do Campus da Universidade Paranaense - Unipar de Francisco Beltrão – PR ²Acadêmicas do Programa de Iniciação Científica – PIC do Campus da Universidade Paranaense - Unipar de Francisco Beltrão – PR.

apresentações distintas: pseudomenbranosa, atrófica aguda, hiperplásica crônica, quelite angular e língua negra pilosa^{12,16, 20,22}

O tratamento das infecções causadas por *Candida sp* é limitado a um número de agentes antifúngicos, o que inclui poliênicos como a nistatina e anfotericina B; azólicos, entre eles o cetoconazol, itraconazol e fluconazol; e derivados azólicos recentes, como o voriconazol e o posaconazol ^{19,20,22}.

Na literatura, há crescentes relatos de leveduras resistentes aos antifúngicos, segundo alguns autores, as espécies de *Candida* não *albicans*, têm apresentado um aumento expressivo na resistência a algumas destas drogas, como no caso do fluconazol, destacando-se principalmente a *C. glabrata* e *C. krusei*. Sendo que as principais causas desta falha terapêutica incluem doses inadequadas, o freqüente uso na clínica médica, a distribuição ou metabolismo deficiente, as interações medicamentosas, pacientes com neutropenia grave, tornando clara a razão da crescente importância dos testes de susceptibilidade^{4,2}.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo determinar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da mucosa bucal e de pele.

MATERIAL E MÉTODO

No presente trabalho, analisou-se 25 amostras de leveduras isoladas a partir de escamas de pele e da mucosa bucal de crianças. No processo de identificação das leveduras empregou-se o meio CHROMagar *Candida*, em incubação por 48 horas a 35° C. Para avaliar a susceptibilidade in vitro das espécies de leveduras realizou-se a metodologia de macrodiluição em tubo, segundo o protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*^{5,17}.

O preparo das drogas variou de acordo com suas diferentes concentrações; o fluconazol apresentou concentrações variando entre 5 a 640 µg/ml e o cetoconazol entre 0,625 a 80 µg/ml. Preparou-se um inóculo de leveduras a serem testadas, utilizando o meio de RPMI-1640 (previamente diluídas e ajustadas para que o número de células fique entre 0,5 a 2,5 x10³ por mL). Após o preparo de todas as respectivas diluições das drogas, colocou-se o inóculo na seqüência de tubos de cada um dos antifúngicos testados. Utilizaram-se testes controles positivos e negativos, com incubação dos tubos

a 35°C por 48h. A leitura foi efetuada através do tubo-controle positivo e comparando-o visualmente ao crescimento verificado nos tubos referente a diferentes concentrações do antifúngico testadas.

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi definida como a menor concentração de antifúngico que é capaz de impedir qualquer crescimento visível, em comparação com o controle do crescimento positivo (sem o antifúngico). Os critérios adotados para o conceito de resistência e sensibilidade às drogas testadas foram baseados segundo CLSI (2008), o qual determina que a levedura será sensível se houver a inibição do crescimento em uma concentração de cetoconazol abaixo de 8 μg/ml e resistente acima de 16 μg/ml. Já para o fluconazol foi considerado sensível para concentração menor que 8 μg/ml e resistente para maior que 64 μg/ml. ¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de 25 amostras, onde 64% eram de origem bucal e 36% de pele dos espaços interpododactilar, sendo que 40% eram *C. glabrata*, 36% eram *C. tropicalis* e 24% eram *C. albicans*. Neste estudo, o perfil de sensibilidade total apresentou-se mais alto para o cetoconazol em 60% das amostras e 48% para o fluconazol, sendo que o percentual de isolados resistentes para fluconazol foi de 24% das amostras analisadas, enquanto que para o cetoconazol este valor foi de 4%. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Favalessa *et al.*, ⁹ que estudou o perfil de susceptibilidade a drogas antifúngicas de leveduras do gênero *Candida* de pacientes HIV positivo, verificando que dentre as 30 amostras isoladas, 20% eram resistentes ao cetoconazol e 40% eram resistentes ao fluconazol. Em ambos os estudos, o fluconazol apresentou os maiores perfis de resistência.

A variação da concentração inibitória mínima de cada antifúngico testado é apresentada na tabela abaixo.

Neste estudo, observou-se uma variação no perfil de susceptibilidade entre os antifúngicos testados, pois os valores de CIM foram maiores para o fluconazol. Na pesquisa desenvolvida por Costa *et al.*,⁷ onde se avaliou o perfil de susceptibilidade antifúngica de leveduras *Candida* sp a partir de pacientes com câncer, constatou-se que o fluconazol foi o antifúngico azólico que respondeu a concentrações mais elevadas. Perfil semelhante foi relatado por Lima *et al.*¹⁴, em isolados de onicomicose de paciente HIV positivo, onde as

Tabela 1 - Distribuição dos isolados de Candida sp conforme a concentração inibitória mínima dos dois antifúngicos analisados

	Susceptibilidade															
Sítio Anatômico	Cetoconazol (µg/mL)							Fluconazol (μg/mL)								
	0,625	1,25	3	5	10	20	40	80	5	10	20	40	80	160	320	640
Pele	7	-	-	-	-	1	-	1	5	-	-	-	-	-	-	4
Cavidade oral	9	-	-	-	-	-	-	7	7	1	-	-	-	-	-	8

espécies de Candida isoladas em escamas unqueais apresentaram maior resistência ao fluconazol. Contudo, relatos da resistência de leveduras ao cetoconazol são cada vez mais frequentes na literatura8.

O perfil de susceptibilidade de cada espécie de levedura testada, considerando os parâmetros sensível, intermediário e resistente, frente a cada antifúngico analisado, está relatado na tabela abaixo.

O maior perfil de resistência nas amostras ao fluconazol ocorreu entre as leveduras da espécie C. albicans (67%). Já para o cetoconazol, C. albicans foi a espécie que apresentou maior índice de sensibilidade (83%), sendo que a C. glabrata foi única espécie a apresentar 10% das amostras com sensibilidade intermediária (dose-dependente) para os dois antifúngicos testados. Analisando os valores de sensibilidade das leveduras da espécie C. tropicalis, observou-se que os índices de resistência mantiveram-se iguais (44%) para ambos os antifúngicos testados testados. Já no trabalho desenvolvido por Vieira et al., 23 que investigou a susceptibilidade da diferentes amostras de Candida albicans isoladas da mucosa bucal de criancas portadoras da Síndrome de Down, todas as amostras desta levedura foram

sensíveis ao fluconazol. Contudo, no estudo realizado por França et al., 10 que investigou 51 isolados de Candida sp. verificou-se que três isolados de Candida glabrata e um de Candida krusei apresentaram suscetibilidade intermediária (dose-dependente) ao fluconazol.

Assim sendo, é necessário que as linhagens causadoras de candidose sejam identificadas em nível de espécies, juntamente com a determinação do perfil de susceptibilidade, devido à existência de cepas intrinsecamente resistente aos antifúngicos azólicos, em especial ao fluconazol, porque embora a susceptibilidade aos antifúngicos das leveduras deste gênero seja previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral¹.

Tabela 2 - Número de isolados das diferentes espécies de Candida sp considerados sensíveis, intermediários e resistentes

	Susceptibilidade									
Espécies	ı	Fluconazo	I	Cetoconazol						
Fúngicas	S %	SDD %	R%	S %	SDD %	R%				
C. albicans	33	-	67	83	-	17				
C. glabrata	50	10	40	80	10	10				
C. tropicalis	56	-	44	56	-	44				

S: Sensível

SDD: Sensível Dose-dependente

R: Resistente

CONCLUSÃO

Foi possível observar neste estudo que a Candida albicans, foi a espécie das leveduras analisadas que apresentou os maiores índices de resistência aos antifúngicos testados, e que "in vitro" o Fluconazol em comparação com o Cetoconazol apresentou maior perfil de resistência.

COMITÉ DE ÉTICA

O projeto intitulado de "AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AANTIFÚNGICOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE LEVEDURAS CANDIDA ISOLADAS DE MUCOSA BUCAL E PELE" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEPEH), da Universidade Paranaense - UNIPAR, sob o protocolo 13902.

REFERÊNCIAS

- 1. BOAVENTURA, L.C.S.; MONTE, L.R.; SANTOS, L.; TALHARI, S.; SOUZA, B.V.J. Candidose oral em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida internados na fundação de medicina tropical do Amazonas. Rev. Soc. Bras. Med. trop. v.41, n.1, Uberaba, jan./fev. 2008.
- 2. CANUTO, M.M.; RODERO, F.G. Antifugal drug resisteence to azoles and polyenes. The Lancet Infectious Diseases 2: 550-563, 2002.
- 3. CANTÓN, E.: VIUDES, A.: PEMÁN, J. Infección sistêmica nosocomial por leveduras, Rev. Iberoam Micol., v. 18, n. 2, p. 51-55, 2001.
- 4. CEBALLOS, SALOBREÑA A.; GAINTÁN, CEPEDA L.A.; RUESGA, M.T.; CEBALLOS, GARCÍA L.: QUINDÓS, G. Prevalencia de lesiones orales por Candida en una población con SIDA sometida a terapia antirretroviral altamente activa. Rev. Iberoam Micol. 15: 141-5, 1998.
- 5.COLOMBO, A. L.; BARCHIESI, F.; McGOUCH, D.A. & RINALDI, M.G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. Clin. Micro.,33:535-40, 1995.
- 6. COLOMBO, A.L.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Cândida* spp. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- 7. COSTA, J. L; BIRMAN, E. G; ALVES, H. S.; CURY, A. E. suscetibilidade de Candida albicans um antifúngicos: cepas isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. Rev. Odontol Univ SP, n. v. 13, 3, p. 219-223, Jul./conjunto. 1999
- 8. EVANS, E.G. Resistance of Candida species to antifungal agents used in the treatment of
- onychomycosis: a review of current problems. Br J Dermatol 141 (Suppl 56): 33-35, 1999. 9. FAVALESSA, O.C.; RIBEIRO, L.C.; TADANO, T.; SIMÕES, S.A.A.; DIAS, L.B.; FONTES, C.J.F.; HANH, R.C. Caracterização de espécies e perfil de susceptibilidade à drogas antifúngicas de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* isoladas de pacientes HIV positivos em Cuiabá – MT. Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 41 Suplemento I. 2008
- 10. FRANÇA, B.C.J.; RIBEIRO, L.E.C.; TELLES, Q.F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, freqüência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.41 n.1 Uberaba jan./fev. 2008
- 11. FRIDKIN, S.K.; JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fugal infections. Clin. Microbiol. Rev. v.9, n. 4, p.499-511, 1996.
- 12. KONEMAN, E.N. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 13, LACAZ, S.C: PORTO,E: MARTINS, C.E.J: VACCARI, H.M.E: MELO, T.N. Tratado de Micologia
- Medica Lacaz. São Paulo: Sarvier, ed.9º,2002.
- 14. LIMA, M.K.; DELGADO, M.; REGO, M.S.R.; CASTRO, B.M.M.C. Isoladas de onicomicose em paciente HIV-positivo: co-resistência in vitro aos azólicos. Recife – PE. Revista de patologia tropical Vol. 37 (1): 57-64. jan.-abr. 2008.
- 15. MENEZES EÁ. Isolamento de *Cândida* spp no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceara e teste de susceptibilidade a antifúngicos. Fortaleza -CE. 20 de outubro de 2004. p.1-10.
- 16. MENEZES, E.A.; CAVALCANTE, M.S.; FARIAS, R.B.; TEIXEIRA, A.B.; PINHEIRO, G.P.; BEZERRA, B.P.; TORRES, J.C.N.; CUNHA, F.A. Freqüência e atividade enzimática de *Cândida* albicans isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche de prefeitura de Fortaleza. J. Brás. Patol. Méd. Lab., v.41,n.1,p.9-13,2005.
- 17. CLSI Clinical end Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard - Third Edition - CLSI document M27-A3. Clinical end Laboratory Standard Institute, Pennsylvania, USA, 2008.
- 18. PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D.J. Role of sentinel surveillance of candidemia; trends in species distribution and antifugal susceptibility. J. Clin. Microbiol., v.40, n.10, p.3551-3557, 2002.
- 19. QUINDÓS, G. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Rev. Iberoam Micol 2002; 19: 1-4
- 20. SIDRIM. J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. Fundamentos Clínicos Laboratoriais da Micologia Medica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S.A.; 1999.
- 21. SIDRIM, JJC; ROCHA, GFM. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2002. 22. URIZAR, J.M.A. *Candidiasis orales*. Rev. Iberoam Micol 2002; 19: 17-21.
- 23. VIEIRA, G.D.J; RIBEIRO, L.E; CAMPOS, C.C; PIMENTA, C.F; TOLEDO, A.O; NAGATO, M.G; SOUZA, A.N; FERREIRA, M.W; CARDOSO,G.C; DIAS, S.M.S; JUNIOR, A.A.C; ZATTA, T.D; SANTOS, S.J. Candia Albicans Isolada da Cavidade Bucal de Crianças com Sindrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por Streptomyces sp. Rev. Soc.Bras.Med.Trop. vol 38no.5 Uberaba Sept./Oct. 2005. .

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Volmir Pitt Benedetti Rua Alagoas, 800 - Alvorada

Francisco Beltrão/PR CEP: 85601-080

E-mail: volmir@unipar.br

Infecção Urinária em Gestantes: Perfil de Sensibilidade dos Agentes Etiológicos de Gestantes Atendidas pelo SUS na Cidade de Palmas - PR*

Urinary Infection in Pregnants: Susceptibility Profile of Etiological Agents in Pregnants Followed by SUS in the City of Palmas - PR

Anne Caroline Pereira¹; Jardel C. Bordignon²

RESUMO - Objetivo: determinar o perfil de sensibilidade dos agentes etiológicos de infecção do trato urinário (ITU) em gestantes atendidas pelo SUS, na cidade de Palmas-PR, para traçar perfil epidemiológico e diretrizes terapêuticas.

Métodos: Foram avaliadas amostras urinárias de 203 gestantes no período de setembro de 2007 a janeiro de 2008. Nas culturas positivas, foi realizada a identificação e o antibiograma. Este último foi realizado por disco- difusão (Kirby e Bauer) seguindo as diretrizes do CLSI 2007.

Resultados: Das amostras analisadas, 17 (8,4%) foram positivas. Os agentes isolados foram a *Escherichia coli* (82,3%); *Streptococcus agalactiae* (11,7%) e *Staphylococcus saprophyticus* (5,9%). Dos antibióticos testados e que podem ser administrados durante a gestação, as cefalosporinas, a fosfomicina e a nitrofurantoína foram os que apresentaram melhor eficácia frente aos uropatógenos isolados.

Conclusão: Os resultados obtidos estão alinhados com a literatura consultada e servem de base para a determinação de terapia empírica destas pacientes, quando for necessário.

Palavras-chave: infecção urinária; gestação; perfil de sensibilidade.

SUMMARY - Objective: to determine the susceptibility profile of etiological agents of UTI in pregnant women by followed Public Healt System in the city of Palmas-PR, to draw epideological profile and treatment guidelines.

Methods: 203 urinary samples of pregnant women were evaluated between September 2007 and January 2008. Positive urinary cultures were submitted to bacterial identification and antibiotic susceptibility testing. The latter was performed by disky-diffusion method (Kirby and Bauer), following the guidelines of the CLSI 2007.

Results: Of the samples analyzed, 17 (8,4%) were positive. The agents isolated were Escherichia coli (82,3%), Streptococcus agalactiae (11,7%) and Staphylococcus saprophyticus (5,9%). The antibiotics that were tested and wich can be administred during pregnancy, the cephalosporins, fosfomycin and nitrofurantoin were effective against the uropatogens isolated.

Conclusion: The results are alignes with literature data and can be used as the basis for standardizing the empirical treatment when it is necessary.

Keywords: urinary tract infection; pregnancy; suscepitibility profile.

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma patologia freqüente, que ocorre em todas as idades e acomete principalmente mulheres^{1,2,3,5}. A maior incidência neste grupo, se deve a maior predisposição para apresentarem infecções deste tipo por razões específicas em cada período de vida¹⁶. A ITU é definida como a invasão microbiana de qualquer órgão do trato urinário desde a uretra até os rins e pode ser classificada em cistite (quando a bactéria se adere à bexiga), pielonefrite (acomete os rins), bacteriúria de baixa contagem (quadro de ITU precoce) e bacteriúria assintomática⁶.

Durante anos a gravidez foi vista como um fator predisponente a todas as formas de ITU. O que ocorre é que no período gestacional fatores mecânicos e hormonais contribuem para provocar mudanças no trato urinário materno, tornando-o mais susceptível às formas

sintomáticas da infecção 13. Além disso, neste período a urina é mais rica em nutrientes e vitaminas, o que propicia

um meio de cultura mais rico, favorecendo o crescimento bacteriano ¹⁷. O quadro clínico, então, se torna sugestivo devido a sintomas como disúria, polaciúria, dor lombar e/ou suprapúbica, urgência miccional, urina turva e/ou avermelhada². A ITU é a terceira intercorrência clínica mais comum na gestação, acometendo de 10 a 12 % das gestantes ¹⁷ e deve ser tratada para que ocorra uma supressão do microrganismo causador da infecção e para prevenir casos recorrentes ¹⁶.

Complicações maternas e perinatais são associadas à ITU¹³. Dentre elas destacam-se o trabalho de parto pré-termo, ruptura prematura de membranas amnióticas, restrição de crescimento intra-uterino, recém-nascidos de baixo peso, retardo mental, paralisia cerebral e óbito perinatal⁴¹¹³. Portanto, o diagnóstico precoce seguido de terapêutica adequada e imediata é imprescindível para evitar o comprometimento do prognóstico materno e gestacional¹³.

Recebido em 28/07/2009 Aprovado em 18/02/2011

*UNICS - Centro Universitário Católico do Sudoeste do Paraná

¹ Acadêmica do curso de Farmácia do UNICS

² Professor em Microbiologia Básica, Microbiologia Clínica e Micologia Clínica do UNICS

Uma preocupação adicional aos profissionais de saúde responsáveis pelo acompanhamento pré-natal é que, além da incidência aumentada entre grávidas, é justamente nesse período que arsenal terapêutico e as possibilidades profiláticas são restritos¹³. A prescrição de antimicrobianos durante a gestação é freqüente, mesmo sabendo que quase todos esses medicamentos atravessarem a placenta, com intensidades diferentes, e têm potencial para proporcionar a cura da infecção e para causar efeitos adversos no feto. Ainda assim, há conhecimento suficiente para que os médicos atuem dentro de limites seguros, utilizando esses agentes depois de fazer uma rigorosa avaliação de risco/benefício9. Nesse contexto, é de extrema importância ter conhecimento do microrganismo, das suas características epidemiológicas e da sua susceptibilidade a antimicrobianos, já que esses dados são essenciais para a eficácia do tratamento e para dificultar o surgimento de resistência bacteriana⁷.

O diagnóstico da ITU é sempre feito com bases clínicas e laboratoriais⁶, sendo os mais usados um método qualitativo e um quantitativo. O primeiro é realizado através de fitas que sofrem uma reação colorimétrica e são especialmente úteis na triagem de casos agudos de ITU, já que detectam esterase leucocitária e atividade redutora de nitrato¹, o que representa a presença de alguns tipos de bactérias. O método quantitativo é a urocultura e é o exame mais importante no diagnóstico da ITU⁶, usado como exame confirmatório da infecção⁵. Ele indica a ocorrência de multiplicação bacteriana no trato urinário e também permite o isolamento do agente etiológico, assim como o estudo de sua sensibilidade a antimicrobianos^{2,6,8}.

O teste de sensibilidade a antimicrobianos, ou antibiograma, está indicado somente para microrganismos cujo padrão de sensibilidade não é previsível e para aqueles que são isolados de um sítio anatômico estéril. Este teste avalia o padrão de resposta da bactéria diante de concentrações preestabelecidas de antibióticos, correlacionados com níveis séricos atingidos após doses usuais em pacientes normais. Ele reflete duas variáveis: a bactéria e a droga, sem levar em consideração outros aspectos clínicos que acompanham a infecção, portanto seu resultado deve ser avaliado pelo médico. O antibiograma pode ser realizado de acordo com dois métodos: disco difusão e concentração inibitória mínima (MIC). O primeiro é um método qualitativo e fornece resultados em categorias definidas como sensível, intermediário e resistente¹⁵. o que norteia o médico quanto ao uso de um antibiótico adequado para o tipo de infecção que o microrganismo está causando. O método de MIC reflete a menor concentração do antibiótico que inibe o crescimento bacteriano e podem ser utilizados equipamentos automáticos¹⁵. Devido ao custo, o primeiro método é o mais utilizado. Quanto à seleção dos antimicrobianos que serão utilizados, o labortório deve selecionar painéis específicos para cada microrganismo, baseado em padronização. Este é determinada por comitês internacionais de padronização, cada um com particularidades que refletem as características das cepas estudadas em seus países de origem. No Brasil, a maioria dos laboratórios utiliza o manual do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), que anualmente publica recomendações e atualizações de técnicas analíticas e pós- analíticas para melhor adequar a interpretação do antibiograma. Os resultados gerados por este teste são úteis na orientação de terapêuticas antimicrobianas empíricas locais¹⁵.

Outro exame que auxilia no diagnóstico é a coloração de Gram, um método bastante simples que localiza os resultados quanto à presença bactérias negativas-Gram ou positivas-Gram.

Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil de sensibilidade dos agentes etiológicos de ITU em gestantes atendidas pelo SUS em Palmas-PR, para traçar um perfil epidemiológico, assim como nortear um tratamento empírico à paciente se for necessário.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de setembro de 2007 a janeiro de 2008 foram estudadas, amostras urinárias de 203 gestantes de todas as idades gestacionais, que eram encaminhadas ao Laboratório Aldes de Análises Clínicas pela unidade de saúde central, por ocasião de exames do pré-natal.

As gestantes foram esclarecidas quanto à realização do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Também foram instruídas quanto à forma correta da coleta da amostra: higiene perineal, urina de jato médio, transporte imediato ao laboratório ou refrigeração por no máximo 24 horas entre 2 e 8° C¹³.

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram submetidas a realização da cultura e incubadas à 35° C por 24 horas. Depois, foi realizado o exame parcial de urina, através de teste colorimétrico com fitas reagentes. Então, as urinas foram centrifugadas a 1.600 RPM por cinco minutos, para ser obtido o sedimento urinário, o qual seria levado ao microscópio e observado. Da mesma amostra centrifugada, pegou-se uma pequena porção para realização da coloração de Gram.

As culturas foram analisadas quanto ao crescimento de microrganismos, após 24 horas de incubação. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram crescimento de 100.000 UFC/ mL ou acima de 10.000 UFC/ mL com sintomatologia¹⁴. Os patógenos foram identificados de acordo com as metodologias preconizadas pela literatura. Depois de identificado o tipo de microrganismo, foi realizado o antibiograma, também específico para cada grupo de bactérias. A preparação da suspensão, escolha dos meios de cultura e dos antibióticos a serem testados, atmofera e tempo de incubação foram realizados de acordo com a publicação do CLSI 2007²⁰.

RESULTADOS

Dentre as 203 gestantes estudadas, 17 apresentaram positividade de crescimento bacteriano, ou seja, 8,4% do total. Dos casos positivos, a *E. coli* foi identificada como uropatógeno em 82,3%; em 11,7% das gestantes infectadas foi identificado o *Streptococcus agalactiae* (grupo "B" de Lancefield) e em 5,9% dos casos identificou-se *Staphylococcus saprophyticus*.

Quanto à sensibilidade, os resultados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Perfil de sensibilidade dos uropatógenos

Antibacteriano	E. coli (% sensívesis)	S. saprophyticus (% sensíveis)	S. agalactiae (% sensíveis)		
Ác. Nalidíxico	86	NA	NA		
Amicacina	100	100	NA		
Amoxicilina	57	100	100		
Amoxicilina+ Ác. Clavulânico	100	100	100		
Ampicilina	57	100	100		
Aztreonam	100	100	100		
Cefaclor	93	100	100		
Cefalexina	93	100	100		
Cefalotina	93	100	100		
Ceftazidima	100	100	100		
Cefotaxima	100	100	100		
Ceftriaxona	100	100	100		
Cefoxitina	100	NA	100		
Ciprofloxacino	93	100	100		
Fosfomicina	100	100	100		
Gentamicina	100	100	NA		
Imipenem	100	NA	NA		
Levofloxacino	100	100	100		
Nitrofurantoína	100	100	100		
Norfloxacino	93	100	100		
Penicilina	NA	100	100		
Sulfametoxazol+ trimetroprim	57	100	50		

DISCUSSÃO

Segundo os estudos, até 10 % das gestantes apresentam alguma forma de ITU4,13,18. Sendo assim, o percentual de 8,4 % de positividade está dentro das estatísticas do país. A prevalência de E. coli (82,3 % dos casos) como uropatógeno era esperada, já que é descrita por vários autores como o principal causador de ITU, sendo responsável por até 90 % dos casos^{4,6,13,17,18}. O isolamento de Staphylococcus saprophyticus ocorre entre 5 e 15 % dos casos de ITU, principalmente em mulheres jovens²³. É importante ressaltar a presença de Streptococcus agalactiae (grupo "B" de Lancefield), que frequentemente coloniza o trato genital feminino de forma assintomática. As conseqüências relacionadas com a presença de infecção por esse grupo de bactérias incluem infecção urinária, infecção intrauterina, ruptura prematura das membranas, paro prematuro e endometriose pós-parto. A infecção por estreptococo do gripo B é uma causa comum de sepse neonatal¹⁹, o que torna ainda

mais importante o diagnóstico precoce, para que o tratamento seja feito o mais rápido possível. A presença dessas espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* também é compatível com a literatura^{4,18}.

Entre os antibióticos testados, os que são mais seguros para uso na gestação e que apresentam bom perfil de sensibilidade foram as cefalosporinas, a fosfomicina e a nirofurantoína, sendo que o último deve ser utilizado com cautela no final da gravidez²¹. As cefalosporinas, principalmente as de primeira geração (cefalexina), têm sido utilizadas como antibiótico de primeira escolha no tratamento de infecções do trato urinário; entretanto, não existem estudos adequados e bem controlados feitos com gestantesº que comprovem a segurança do tratamento. A cefalexina age interferindo na síntese de peptideoglicanos tanto de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas. Após a sua absorção, exibe ampla distribuição pelo corpo e é excretada, em boa parte, pelos rins²8, o que justifica sua eficácia em infecções urinárias.

Vale destacar a atividade da fosfomicina (Monuril®), que é um agente bactericida, com um ótimo espectro de ação, já que age tanto contra bactérias Gram-negativas quanto contra Gram-positivas¹⁰. Atua bloqueando a primeira etapa da síntese de peptideoglicanos 10,111 além de possuir a propriedade de diminuir a aderência ao urotélio, tanto de bactérias sensíveis quanto de resistentes^{10,12}. A fosfomicina não é associada a efeitos teratogênicos¹⁰, podendo, portanto, ser administrada durante a gestação. A resistência a esse agente pode ocorrer devido à produção de uma enzima constitutiva (fosfomicinaglutation-S tranferase) que inativa o antibiótico ou por alteração na permeabilidade da membrana celular e modificação enzimática do antibiótico¹², porém, na clínica, isso não ocorre com frequencia¹¹. Essa baixa resistência pode ser explicada pelas altas concentrações que o antimicrobiano alcança na urina11, já que um terço da dose PE eliminada na forma biologicamente ativa¹². A posologia usual é dose única, ou no máximo três doses, sendo cada dose de 3 g. Seu uso é bastante difundido em países como França, Espanha, Alemanha e EUA¹².

Outros agentes como amoxicilina, ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim, também podem ser administrados durante a gestação, porém apresentaram um elevado índice de resistência (43%) para as cepas testadas, o que não os caracteriza como um bom antimicrobiano de escolha para o tratamento. O uso racional de antibióticos, respeitando o tempo de tratamento, o reconhecimento dos agentes e seus respectivos perfis de sensibilidade na comunidade (em pacientes gestantes ou não) são fundamentais para evitar a ocorrência de resistência². Deve-se ressaltar que a escolha de um antimicrobiano deve levar em conta, além da sensibilidade das bactérias, a facilidade de obtenção pelo paciente, a sua tolerabilidade, a comodidade do esquema posológico, o custo e a toxicidade do medicamento⁴.

Um estudo feito na cidade de Novo Hamburgo-RS¹⁷, com gestantes, mostrou que 16% das amostras de urina foram positivas para ITU. Sendo que, das positivas, 76 % tinham *E. coli* como uropatógeno, e 6% *S. saprophyticus*. Em Curitiba, o estudo realizado em 2006²², entre as pacientes gestantes que participaram do estudo, 16,28% tiveram o diagnóstico de ITU.

Nesse estudo, a *E. coli* apareceu em 63.64% das amostras. A sensibilidade das cepas de E. coli de um estudo feito na cidade de Ponta Grossa-PR²³, foi de 37,9% à ampicilina, 77,2% à cefalotina e 93% ao ciprofloxacino, sendo estes resultados semelhantes ao presente estudo. Um outro estudo realizado na mesma cidade²⁴, mostrou que a nitrofurantoína teve uma ótima taxa de sensibilidade (89,8%), mostrando-se o antibiótico de escolha para o tratamento empírico de ITU's não complicadas. porém em pacientes não grávidas. O sulfametoxazoltrimetoprim teve alta taxa de resistência (36,6%), comprovando a diminuição de sua eficácia no tratamento de ITU e limitando seu uso. Já segundo, Jamie et al., a nitrofurantoína é antimicrobiano de escolha no tratamento de ITU baixa em gestantes, já que as cepas de E. coli estudadas mostraram baixa resistência a esse antimicrobiano. Comparando os resultados com um estudo feito em Palmas, em 2006 (dados não publicados), houve semelhanca nos dados relativos ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Vale ressaltar que o número de amostras estudadas deveria ser maior para se ter um resultado mais claro da porcentagem de positividade de ITU em gestantes e também de níveis exatos de eficácia dos antibióticos testados. Porém, os resultados obtidos são bastante significativos e devem ser considerados, já que pelo menos 90% das gestantes de Palmas-PR são assistidas pelo SUS.

Os dados resultantes desta pesquisa mostram a necessidade do monitoramento da bacteriúria assintomática em gestantes através de urocultura, ao mesmo tempo em que destaca a importância da detecção do perfil de sensibilidade aos fármacos para nortear a terapia farmacológica.

REFERÊNCIAS

- 1. HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário –ITU. Revista da Associação Médica Brasileira, 49 (1): 109 116, 2003.
- SILVA PIRES, M. C.; SOUSA FROTA, K.; MARTINS JUNIOR, P. O.; CORREIRA, A. F.; CORTEZ-ESCALANTE, J. J.; SILVEIRA, C. A. Prevalência e Suscetibilidade Bacterianas das Infecções Comunitárias do Trato Urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no Período de 2001 a 2005. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Nov – Dez, 40 (6): 643, 2007.
- 3. SCARPA, K. P.; HERRMANN, V.; PALMA, P. C. R.; RICETTO, C. L. Z.; MORAIS, S. Prevalência de Sintomas Urinários no Terceiro Trimestre da Gestação. Revista de Associação Médica Brasileira. 52 (3): 153-156, 2006.
- 4. DUARTE, G.; MARCÓLIN, A. C.; GONÇALVES, C. V.; QUINTANA, S. M.; BEREZOWSKI, A. T.; NOGUEIRA, A. A.; PEREIRA DA CUNHA, S. Infecção Urinária na Gravidez: Análise dos Métodos para Diagnóstico e do Tratamento. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 24 (7): 471-477. 2002.
- 5. SIQUEIRA DE CAMARGO, C. B.; DE CÁSSIA PEDRO, C.; SILVA LOURENÇO, D.; GIRONI, R. H.A.R.; MARTINEZ, R. Infecção de Vias Urinárias na Comunidade de Ribeirão Preto SP: Etiologia, Sensibilidade Bacteriana a Antimicrobianos e Implicações Terapêuticas. Medicina,

- Ribeirão Preto, 35: 173-178, abr/ Jun 2002.
- 6. FÁTIMA SATO, A.; SVISZINSKI, A. E.; LOPES CONSOLARO, M. E.; BOER, C. G. Nitrito Urinário e Infecção Urinária Por Cocos Gram-positivos. Jornal Brasileiro de patologia e Medicina Laboratorial. 41 (6): 397-404. 2005.
- 7. DIAS NETO, J. A.; PEREIRA MARTINS, A. C.; MAGALHĀES DA SILVA, L. D.; TIRABOSCHI, R. B.; ALONSO DOMINGOS, A. L.; COLOGNA, A. J.; PASCHOALIN, E. L.; JUNIOR TUCCI, S. Community Acquered Urinary Tract Infection: Etiology and Bacterial Susceptibility. Acta Cirúrqica Brasileira. 18 (Supl 5): 33-35. 2003.
- 8. GARCIA, P. C.; CAMPONOVO, R. C.; TRIANTAFILO, V. V.; BRAUNS, S. J.; CONA, E. T. e GRUPO COLABORADOR. Encuesta Sobre los Métodos de Diagnóstico Microbiológico de La Infeccion Urinaria. Revista Chilena de Infectologia, 18 (1): 35-40, 2002.
- 9. AMATO NETO, V.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; DE MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. Antibióticos na Prática Médica. 5 ed. São Paulo, Editora Roca, 2000.
- 10. PEDREIRA, W.; ANZALONE, L.; ÁLVEZ, M.; CAFFERATTA, A. Fosfomicina Trometamol: Uma Opción Terapéutica Válida em Infecciones Urinarias Bajas. Revista Médica do Uruguai, 19 (2): 107-116, ago. 2003.
- 11. ALÓS, J. I.; GARCÍA- PEÑA, P.; TAMAYO, J. Coste Biológico Asociado a la Resistencia a La Fosfomicina em Aislamientos de Escherichia coli de orina. Revista Espanhola de Quimiotrapia, 20 (2): 211-215, jun. 2007.
- 12. GOBERNADO, M. Fosfomicina. Revista Espanhola de Quimioterapia, 16 (1): 15-40, mar. 2003
- 13. DUARTE, G.; MACOLIN, A. C.; QUINTANA, S. M.; CAVALLI, R. C. Infecção Urinária na Gravidez. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 30 (2): 93-100, 2008.
- 14. OPLUSTIL, C. P.; ZOCOLLI, C. M.; TOBOUTI, N. R. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. São Paulo: Sarvier, 2004.
- 15. ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- 16. ZEIGHAMI, H.; MOTA, A.; RAHTMATI, M. Evaluation of Urinary Tract Infeccion in Pregnant Women. The Journal of Biologic Sciences, 3 (4): 441-443, 2008.
- 17. JACOCIUNAS, L. V.; PICOLI, S. U. Avaliação de Infecção Urinária em Gestantes no Primeiro Trimestre de Gravidez. Revista SBAC, 39 (1): 55-57, 2007.
- 18. YIN, L. K.; NALLIAH, S. Urinary Tract Infections in Pregnancy. Malaysian Family Physician, 2 (2): 54-56, 2007.
- 19. CHOMBLEHOME, W. R. apud. TIENEY JR, L. M.; MCPHEE, S. F.; PAPADASKI, M. A. Current Medicina Diagnóstico e Tratamento. Capítulo 18: Obstetrícia. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.
- 20. WIKLER, M. A.; COCKERIEL, F. R.; BUSH, K.; DUDLEY, M. N.; ELIPOULOS, G. M.; HARDY, D. I.; HECHT, D. W.; HINDLER, J. F.; PATEL, J. B.; POWELL, M.; TURNIDGE, J. D.; WEINSTEIN, M.P.; ZIMMER, B. L. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Information Supplement. 19 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- 21. LIMA, D. R. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicológica. Vol. 1. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 2004.
- 22. SOARES, L. A.; NISHI, C. Y. N.; WAGNER, H. L. Isolamento das Bactérias Causadoras de infecções Urinárias e seu Perfil de Resistência aos Antimicrobianos. Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade, 2 (6): 84-92, jul/ set. 2006.
- 23. ESMERINO, L. A.; GONÇALVES, L. G.; SCHELESKY, M. E. Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana de Cepas de Escherichia coli Isoladas de Infecções Urinárias Comunitárias. Publicado por UEPG Ciências Biológicas da Saúde. Ponta Grossa, 9 (1): 31-39, mar. 2003.
- 24. BAIL, L.; SANCHES ITO, C. A.; ESMERINO, L. A. Infecção do Trato Urinário: Comparação Entre Perfil de Sensibilidade e a Terapia Empírica com Antimicrobianos. Revista da SBAC, 38 (1): 51-56, 2006
- 25. JAMIÉ, W. E.; EDWARDS, R. K.; DUFF, P. Antimicrobial Susceptibility of Garm- negative Urophatogens Isolated from Obstetrics Patients. Infectious Deseases in Obstetrics and Gynecology, 10: 123-126, 2002.
- 26. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Anne Caroline Pereira

Rua Benjimin Constant, 1074 - Centro Palmas/PR CEP: 85555-000

E-mail: anne_caroline9@hotmail.com

Validação do método titulométrico para determinação de etanol em sangue utilizando ácido nítrico 54% e ácido sulfúrico concentrado*

Validation of chemical titration for blood-alcohol determination using nitric acid 54% and concentrated sulfuric acid

Simone Aparecida Galerani Mossini¹, Juliana Keiko Inoue², Miguel Machinski Junior³, Paula Nishiyama⁴

RESUMO - A causa da maioria dos acidentes automobilísticos tem sido há muito associada ao consumo de álcool e, visando diminuir esses acidentes, os países têm estabelecido limites de alcoolemia para os condutores. A determinação da alcoolemia tem se tornado importante para fins de aprendizagem, clínico-legais, administrativos, e particularmente no cumprimento da lei, com aplicação específica nas violações automobilísticas, podendo subsequentemente assumir relevância forense como evidência de intoxicação. A quantificação sanguínea de etanol por titulometria é bastante utilizada, fornecendo boa correlação linear, sensibilidade, precisão, exatidão, baixo custo e relativa facilidade de execução. Devido à proibição da venda de ácido nítrico concentrado pela Polícia Federal, Polícia Civil e Exército Brasileiro, o objetivo desse trabalho foi avaliar as características de desempenho do método utilizando outros reagentes em substituição ao ácido nítrico concentrado, com isso garantindo a eficiência na quantificação do etanol em sangue. Os melhores resultados foram obtidos com ácido nítrico 54%, necessitando apenas de ajustes em relação aos volumes utilizados na técnica original. A solução sulfocrômica mostrou-se de difícil manipulação em função de sua viscosidade. Os resultados demonstraram que o método modificado apresentou linearidade, precisão e exatidão, de acordo com a resolução especificada pela ANVISA, Agência Brasileira Regulatória.

Palavras-chave: Etanol sanguíneo. Titulometria. Validação.

SUMMARY - All over the world, the main cause of traffic accidents has been associated to alcohol use. In many countries, laws have been introduced to control drink-driving, reducing accidents. Accurate blood-alcohol determination has become increasingly important for learning, clinical, forensic and administrative purposes. It is required in law enforcement, with specific application to automobile traffic violations. Blood ethanol determinations carried out for diagnostic purposes can subsequently assume forensic relevance as evidence of intoxication. Blood-alcohol determinations by chemical titration has been used for many years, it supplies good linear correlation, sensitivity, precision, accuracy, low cost and relative easiness of execution. Due to sale prohibition of concentrated nitric acid by Federal Policy, Civil Policy and Brazilian Army is the aim of this work to carry through assays with other reagents in substitution to that one, to evaluate its performance characteristics and to guarantee its efficiency. The best ones resulted had been gotten with nitric acid 54%, needing only volumes adjustments beside original technique. Chromic acid solution prepared with concentrated sulfuric acid had viscosity of difficult manipulation. Based on the results, the method presented good linear correlation, was accurate and precise according to specific resolution from ANVISA, the Brazilian Regulatory Agency. **Keywords:** Blood-alcohol. Chemical titration. Validation

INTRODUÇÃO

Acidentes devidos à direção sob o efeito do álcool constituem um sério problema em qualquer país que faça uso substancial de veículos automotores. No Brasil, dados do DETRAN mostram que 50% dos acidentes automobilísticos fatais são relacionados à ingestão de álcool¹º. Gazal-Carvalho *et al.*¹², avaliando a prevalência de alcoolemia em vítimas de causas externas, encontraram índice de positividade de 28,9%. Em estudo semelhante realizado pela Associação Brasileira dos Departamentos de Trânsito (ABDETRAN) em quatro cidades brasileiras (Brasília, Curitiba, Recife e Salvador), verificou-se que do total de 831 vítimas não fatais de acidentes de trânsito, 61,4% apresentavam níveis de álcool no sangue. De 34 vítimas fatais incluídas, houve positividade em 52,9% dos casos¹³.

O Código de Trânsito Brasileiro estabelece como limite para criminalização do ato de beber e dirigir o índice de tolerância de dois decigramas por litro de sangue ou de um décimo de miligrama por litro de ar expelido dos pulmões, no caso de teste em aparelho de ar alveolar pulmonar. Motoristas que estiverem dirigindo com essa concentração estão impedidos de conduzir veículo automotorº. A quantificação de etanol no sangue, portanto, é frequentemente solicitada em laboratórios clínicos e de caráter forense^{1,15}. A cromatografia em fase gasosa é a metodologia de escolha para dosagem de etanol¹⁵, entretanto, a maioria dos laboratórios nacionais utiliza a separação por destilação e quantificação por titulometria, por não disporem de tal equipamento. A dosagem sanguínea de etanol é um valioso instrumento de análise tanto para fins de aprendizagem quanto para fins clínico-legais, sendo a técnica titulométrica⁴, fornecedora de boa correlação linear, sensibilidade, precisão, exatidão, baixo custo e relativa

Recebido em 29/07/2009 Aprovado em 28/02/2011

*Laboratório de Toxicologia, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá

¹Docente do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

²Aluna do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Maringá.

³Docente do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

facilidade de execução 17. A Coordenação da Divisão de Controle de Produtos Químicos da Polícia Federal Brasileira⁷, juntamente com a Polícia Civil e o Exército Brasileiro determinou a proibição da venda de ácido nítrico concentrado, reagente com função importante na reação titulométrica, permitindo a venda apenas de ácido nítrico a 54%. Devido à importância e necessidade para fins diagnósticos e didáticos do uso desse reagente para a referida técnica, faz-se necessário a validação da metodologia utilizando o ácido nítrico 54% em substituição ao concentrado. Como esse reagente em conjunto com dicromato de potássio tem função oxidante na metodologia, verificou-se também a possibilidade de substituição por outro reagente que possua a mesma função, como é o caso do ácido sulfúrico concentrado. Entretanto, para que essas possíveis substituições fossem feitas tornou-se imprescindível a validação da técnica utilizando tais reagentes. permitindo a utilização da técnica titulométrica de dosagem de etanol de forma segura, exata e precisa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Equipamentos

- (a) balança analítica Metler mod. H31;
- (b) manta aquecedora;
- (c) destilador;
- (d) buretas de vidro (25 e 50mL);
- (e) pipetas volumétricas;
- (f) micropipetas automáticas Eppendorf.

Reagentes

- (a) etanol absoluto p.a. Merck;
- (b) solução saturada de ácido pícrico;
- (c) solução de iodeto de potássio 1%;
- (d) solução de tiossulfato de sódio 0,01N;
- (e) solução nitrocrômica (dicromato de potássio 0,05 N em ácido nítrico concentrado);
- (f) solução nitrocrômica (dicromato de potássio 0,05 N em ácido nítrico 54%);
- (g) solução sulfocrômica (dicromato de potássio 0,05 N em ácido sulfúrico concentrado);
- (h) goma de amido.

Amostras

Amostras de referência negativa

Amostras de sangue de referência negativa foram obtidas dos próprios analistas que não fizeram uso de etanol.

Amostras de referência positiva

Para o estudo de validação do método foram utilizadas como referência positiva amostras de sangue de referência negativa adicionadas dos padrões de etanol.

Metodologia

A reação Titulométrica utilizada na técnica em análise é baseada em reações de oxidação-redução 13. Primeiramente o etanol é separado dos outros constituintes do sangue através de uma destilação simples, seguido pela titulação 4. A metodologia é baseada na reação de oxidação do etanol pelo dicromato de potássio em meio ácido, o excesso de dicromato de potássio oxida iodeto a iodo, que é titulado com a solução de tiossulfato de sódio, usando goma de amido como indicador 13. A concentração de etanol foi calculada com base na equivalência: 0,115 mg de etanol correspondendo a 1,0 mL de tiossulfato de sódio 0.01 N5.

Validação do método

Segundo o Eurachem Working Group, a validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho condizente com o que a aplicação requer¹¹. Sendo parte

integrante da qualidade, a validação visa diminuir ou controlar fatores que possam levar à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado, tais como variabilidade da amostra, calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise.

A validação do método foi conduzida com base no guia para procedimento de validação de métodos analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária², estabelecendo-se os valores de recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção e limite de quantificação. A validação da técnica titulométrica de dosagem de etanol foi realizada utilizando em substituição ao ácido nítrico concentrado, ácido nítrico 54% com volume ajustado para 1,2 mL e ácido sulfúrico concentrado. Como padrão de etanol, foi utilizado álcool etílico 99,5% p.a. nas concentrações de 0,2; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 3,9; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 dg/L de água destilada.

Linearidade

O estudo de linearidade foi baseado na análise de Regressão Linear (método dos mínimos quadrados dos pontos médios de seis curvas de calibração autênticas)¹⁶, realizado pela análise dos padrões de etanol (0,2 – 9,0 dg/L) submetidos ao método em seis repetições para cada uma das soluções oxidantes em estudo. Curvas de calibração foram construídas e os coeficientes de correlação foram calculados.

Precisão intra e interensaio

A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária para as soluções oxidantes em estudo. O estudo da precisão intraensaio (repetibilidade) foi conduzido dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, analisando os padrões de etanol (0,2 – 9,0 dg/L) em seis repetições para o cálculo da estimativa do

desvio padrão relativo (DPR). A precisão interensaio (intermediária) foi avaliada através da análise dos padrões de etanol em seis repetições por analista e instrumentação diferentes e expressas por meio da estimativa do desvio padrão relativo (coeficiente de variação — CV%)². Os resultados foram analisados de acordo com o Quadro I.

QUADRO I – Recuperação e Coeficientes de variação em função do nível de concentração do analito

Faixa	Concentração do analito (%)	Intervalo de recuperação Aceito (%)	Coeficiente de variação (%)
1	≤ 10	98 – 102	0 – 1,9
2	≤ 1	97 – 103	2 – 2,7
3	≤ 0,1	95 -105	2,8 – 3,9
4	≤ 0,01	90 – 107	4,0 – 5,5
5	≤ 0,001	80 -110	5,6 – 7,9
6	≤ 0,0001	80 -110	8,0 – 10,9
7	≤ 0,00001	80 -110	11 – 15,9
8	≤ 0,000001	60 – 115	16 – 22,9
9	≤ 0,0000001	40 – 120	23 – 31

Fonte: Adaptado de AOAC, 1993; Wood, 1999²¹.

Estudo da recuperação do método

A exatidão foi avaliada através da comparação entre os valores teóricos das adições de etanol e os valores obtidos nos ensaios, sendo expressa como porcentagem de recuperação ². Amostras adicionadas nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 3,9; 6,0 e 7,0 dg/L foram destiladas, analisadas utilizando as soluções oxidantes em estudo, em seis repetições por dois diferentes analistas e os resultados analisados de acordo com o Quadro I.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram determinados pelo método empírico que consiste em analisar uma série de amostras de sangue contendo quantidades decrescentes do analito³. O limite de detecção foi equivalente a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação que não excedeu 20% e o limite de quantificação a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação que não excedeu 10% 19.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acidentes de trânsito são a décima causa de morte e a nona causa de morbidade em todo o mundo, vitimando fatalmente 1,2 milhões de pessoas todo ano, e ferindo de 20 a 50 milhões. A América Latina apresenta um panorama ainda mais preocupante, por ter as maiores taxas de fatalidades no trânsito de todas as regiões do mundo, 26,1 mortes para cada 100 mil habitantes, o dobro da média mundial^{14,22}. Segundo

dados do Departamento Nacional de Trânsito, o Brasil tem uma taxa de 6,3 acidentes para cada 10 mil veículos registrados⁸.

As causas desse fenômeno podem ser as mais diversas, incluindo a má conservação de ruas, avenidas e rodovias, a má conservação de veículos, a pesada carga de trabalho que muitos motoristas profissionais são submetidos e a imprudência e inabilidade de muitos motoristas brasileiros. Outro fator determinante para a ocorrência de acidentes pode ser o uso de álcool e outras substâncias psicoativas pelos condutores de veículos.

De acordo com o Código de Trânsito Brasileiro o índice de tolerância é de dois decigramas de etanol por litro de sangue⁹, em função dessas informações foram preparados os padrões e as amostras adicionadas com concentrações conhecidas de etanol.

Sempre que uma técnica de análise necessite de algum tipo de modificação, como ocorreu com a técnica titulométrica de dosagem de etanol em sangue, em função da substituição de um reagente com importância fundamental, se faz necessária a revalidação da técnica. Tal procedimento é de grande importância para a Garantia da Qualidade Analítica e se constitui em uma das exigências das normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) vigentes⁶.

Os parâmetros de validação estudados (recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção e limite de quantificação) asseguram a qualidade do trabalho analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Matematicamente, a relação entre o sinal medido e a concentração da espécie a ser quantificada pode ser expressa como uma curva analítica de calibração. A estimativa dos coeficientes da curva a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear^{16,20}.

Para esse parâmetro, o método demonstrou ser linear na faixa de concentração estudada para as soluções oxidantes analisadas. Curvas de calibração foram obtidas de 0,2 dg/L a 9,0 dg/L. As equações de regressão linear (média de seis determinações) e os coeficientes de correlação (r), utilizando as soluções oxidantes em teste foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados:

Ácido nítrico concentrado: y = 1,0256x - 0,00666 e r = 0,997; Ácido nítrico 54%: y = 1,0327x - 0,01504 e r = 0,999; Ácido sulfúrico concentrado: y = 1,011x + 0,04598 e r = 0,995.

Os coeficientes de correlação (r) apresentaram-se superiores a 0,99, para todas as soluções oxidantes testadas, o que demonstra que as respostas foram lineares nos intervalos de concentração empregados nesse estudo. Um coeficiente de correlação maior de 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Os resultados estão de acordo com a ANVISA, que recomenda como critério

mínimo aceitável do coeficiente de correlação valor igual a 0.99^2 .

Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Em validação de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade².

Neste estudo a precisão do método, utilizando soluções oxidantes diversas da original, foi avaliada referente ao nível de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade apresenta a concordância entre resultados de medidas sucessivas de uma mesma metodologia, efetuadas sob as mesmas condições de repetibilidade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumental usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto intervalo de tempo². A ANVISA sugere que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado no procedimento empregado, três níveis, três repetições para cada um, ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado².

A Tabela I explicita os resultados de ensaio de repetibilidade. Observando os resultados, podemos concluir que o método utilizando solução nitrocrômica 54% forneceu

resultados semelhantes aos obtidos com a solução original, apresentou boa repetibilidade, visto que o coeficiente de variação (CV%= 0 a 3,12%) é inferior ao especificado pela resolução vigente, que é de 5%².

O estudo da precisão interensaio apresentou coeficientes de variação de zero a 1,91%, demonstrou desse modo que não há grandes diferenças entre as análises realizadas individualmente em pequeno intervalo de tempo, sendo portanto, considerado preciso, e dentro da faixa aceitável para validação de métodos analíticos.

A solução sulfocrômica apresentou coeficientes de variação de zero a 36,5% e zero a 51,64% para precisão intrasérie e inter-série, respectivamente, ultrapassando o limite especificado pela resolução.

Estudo de Recuperação

A exatidão do método foi avaliada pelo estudo de sete concentrações diferentes de etanol, utilizando as soluções oxidantes em teste, como mostram os resultados do percentual de recuperação nas concentrações analisadas observados na Tabela II. Os testes realizados com solução nitrocrômica a 54% forneceram resultados similares aos obtidos com a solução utilizada na metodologia original com percentuais de recuperação de 91,9% a partir da concentração de 1,5 dg/L de etanol em sangue, indicando uma ótima recuperação e que o método pode ser considerado exato e preciso, pois os valores de recuperação encontram-se dentro dos limites aceitáveis, de 70 a 120%².

Tabela I - Estudo da precisão do método utilizando as soluções oxidantes em teste

	Ácido nítrico conc.				Ácido ní	trico 54%		Ácido sulfúrico				
Etanol	Mé	dias	cv	(%)	Méd	dias	CV(%)		Médias		CV(%)	
dg/L	Intra- série	Inter- série	Intra- série	Inter- série	Intra- série	Inter- série	Intra- série	Inter- série	Intra- série	Inter- série	Intra- série	Inter- série
0,2	0,23	0,23	0	0	0,23	0,23	0	0	0,34	0,23	36,5	51,64
0,5	0,46	0,46	0	0	0,46	0,46	0	0	0,57	0,46	21,9	20,41
0,75	0,69	0,69	0	0	0,69	0,69	0	0	0,92	1,15	12,9	0
1,0	0,92	0,92	0	0	0,92	0,92	0	0	0,92	0,92	0	0
1,5	1,61	1,61	0	0	1,38	1,38	0	0	1,61	1,61	0	0
2,0	1,84	1,84	0	0	2,07	2,07	0	0	2,07	2,07	0	0
3,0	2,99	2,99	0	0	2,99	2,99	0	0	2,99	2,99	0	0
3,9	4,14	4,14	0	0	4,02	4,14	3,12	0	4,02	4,14	3,12	2,86
6,0	6,21	5,98	1,91	1,98	6,21	6,21	1,51	1,91	6,21	6,21	1,51	1,80
7,0	7,13	7,13	1,66	1,31	7,13	7,13	1,31	1,31	7,36	7,82	1,61	1,20
8,0	8,05	8,05	1,47	1,47	8,28	8,28	1,43	1,43	8,51	8,74	1,31	1,07
9,0	9,02	9,02	0	1,29	9,2	9,2	1,29	0	9,2	8,97	1,29	1,32

A solução sulfocrômica apresentou níveis de 91,9% de recuperação apenas a partir da concentração de 3 dg/L, acima do limite legal determinado pelo DENATRAN⁹, não servindo aos propósitos da técnica.

Limite de detecção e limite de quantificação

De acordo com os dados das Tabelas I e II, os limites de detecção e quantificação tanto para a solução nitrocrômica concentrada quanto para a solução nitrocrômica 54% foram de 0,2 dg/L e 1,5 dg/L, respectivamente. Além disso, as médias de recuperação para etanol em sangue foram de 91,9% para concentrações iguais e superiores ao limite de quantificação servindo ao propósito de detecção da técnica.

Para a solução sulfocrômica, os limites de detecção e quantificação do método utilizando solução sulfocrômica foram de 1 dg/L e 3 dg/L, respectivamente, com médias de recuperação para etanol de 91,9% a 183,8%, alcançando valores superiores aos limites aceitáveis².

CONCLUSÃO

O método foi avaliado e validado com a finalidade de demonstrar que o mesmo atende aos requisitos de boas práticas de laboratório, apresentado a confiabilidade requerida para um método analítico após mudança de um reagente com função importante para seu bom funcionamento.

As características de desempenho do método verificado, utilizando solução nitrocrômica preparada com ácido nítrico 54%, demonstraram resultados semelhantes aos obtidos utilizando a solução nitrocrômica preparada com ácido nítrico concentrado, necessitando apenas de ajustes em relação aos volumes utilizados na técnica original. Todos os parâmetros avaliados mostraram-se compatíveis com as recomendações estabelecidas pelos órgãos competentes e oficiais, validando a

metodologia testada para dosagem de etanol em sangue, utilizando solução nitrocrômica preparada com ácido nítrico a 54%.

Quanto ao uso da solução sulfocrômica, a mesma apresentou-se de difícil manipulação em função de sua viscosidade, acarretando demora e variações nas pipetagens, o que resultou em diferenças nos resultados dos testes de recuperação.

A metodologia titulométrica de dosagem de etanol em sangue, utilizando ácido nítrico a 54% em substituição ao concentrado é, portanto, apropriada para os usos a que se propõe, desde que o volume da solução oxidante originalmente utilizado na técnica seja ajustado.

REFERÊNCIAS

- 1.ANDRADE, A.F.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. Toxicologia na Prática Clínica. Belo Horizonte: Editora Folium, 2001, 343 p.
- 2.ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos. ANVISA, Brasilia, Resolução n° 899, 29/05/2003. Disponível em: ">http://www.e-legis.brs.br/leis>. Acesso em: 30/07/2007.
- 3. ARMBRUSTER, D.A.; TILLMAN, M.D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD)/Limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin. Chem.*, 40: 1233-1238, 1994.
- 4. BRANDENBERGER, H. Forensic alcohol analysis. *In:* CURTUS, H. C.; ROTH, M. (Ed.). *Clinical biochemistry:* principles and methods. New York: Walter de Gruyter, 1974. v. 2, p. 435-1438.
- 5. CAVETT, J.W..Apud: CLARKE, E. G. C. Isolation and Identification of Drugs. London: The Pharmaceutical Press, 1974. v. 1, p. 332-333.
- CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P.; SALVADORI, M. C.; ANDRAUS, M. H.; FERNICOLA, N. A.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicologia*, 11(1): 1-6, 1998
- 7. DCPQ- Divisão de Controle de Produtos Químicos Departamento da Polícia Federal, Portaria DPC de 31/08/2003. Disponível em: http://www.dpf.gov.br/centrais/siproquim.htlm. Acesso em: 18/01/2007.
- 8. DENATRAN, Anuário Estatístico Denatran 2005. Renaest Registro Nacional de Acidentes e Estatísticas de Trânsito. Brasília: Secretaria Nacional de Segurança Pública, 2006. Disponível em: http://www.infoseg.gov.br/renaest/>. Acesso em: 10/12/2006.
- 9. DENATRAN, Departamento Nacional de Trânsito. Código de Trânsito Brasileiro, Lei nº 11.705

TABELA II - Estudo da recuperação do método utilizando as soluções oxidantes

Etanol	Ácido nítrico concentrado			Á	cido nítrico 54º	%	Ácido sulfúrico concentrado			
(dg/L)	Média	Recuperação	CV(%)	Média	Recuperação	CV(%)	Média	Recuperação	CV(%)	
1,0	1,83	183,8%	25,82	1,83	183,8%	25,81	1,83	183,8%	0	
1,5	1,37	91,9%	0	1,37	91,9%	0	2,75	183,8%	0	
2,0	1,83	91,9%	0	1,83	91,9%	0	2,75	137,8%	0	
3,0	2,75	91,9%	0	2,75	91,9%	0	2,75	91,9%	0	
3,9	3,67	94,2%	0	3,67	91,9%	0	3,67	94,2%	0	
6,0	5,51	91,9%	0	5,51	91,9%	0	5,51	91,9%	0	
7,0	6,43	91,9%	0	6,43	91,9%	0	6,43	91,9%	7,37	

e Decreto 6.488, de 20 de junho de 2008, Brasília: República Federativa do Brasil:

2008 Disponível em: http://www.denatran.gov.br/ultimas/20080626_alcool_direcao.htm. Acesso em: 26/06/2008.

- 10. DETRAN SP- Departamento Estadual de Trânsito (2004) Álcool e trânsito. Disponível em: http://www.detran.sp.gov.br/campanhas/alcool transito/in alcool transito.html>. Acesso em:
- 11. EURACHEM WORKING GROUP (EURACHEM). Eurachem Guide: The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom, Teddington: LGC, 1998. 61 p.
- 12. GAZAL-CARVALHO, C.; CARLINI-COTRIM, B.; SILVA, O.A.; SAUAIA, N. Prevalência de alcoolemia em vítimas de causas externas admitidas em centro urbano de atenção ao trauma, Rev. Saúde Pública, São Paulo, 36: 47-54, 2002.
- 13. HARRIS, D. C. Análise química quantitativa. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora S. A., 2005. p.
- 14. JACOBS, G.; AERON-THOMAS, A.; ASTROP, A. Estimating global road fatalities. Crowthorne: Transport Research Laboratory, (TRL Report, n°445), 2000. 36 p.
- 15. JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. Clarke's analytical forensic toxicology. London: Pharmaceutical Press, 2008. p. 299-322.
- 16. LEITE, F. Validação em análise química, 3.ed, Campinas: Editora Átomo, 1998, 224 p.
- 17. MACHINSKI, M. J.; NISHIYAMA, P. Comparação dos métodos de Atenuação de Energia Radiante e Titulométrico para a determinação de Etanol em sangue. Acta Scientiarum. Health Sciences, 25(2): 135-140, 2003,

- 18. NERY FILHO, A.: MEDINA, M.G.: MELCOP, A.G.: OLIVEIRA, E.M., Eds. Impacto do uso de álcool e outras drogas em vítimas de acidentes de trânsito. Brasília (DF): Associação Brasileira dos Departamentos Estaduais de Trânsito (ABDETRAN); 1997. 87 p.
- 19. PEAT, M.; DAVIS, A. Analytical considerations and approaches for drugs. In: KARCH, S.B., ed. Drug abuse handbook. Boca Raton: CRC Press, 1998., p. 751-764.
- 20. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim. Nova, 27(5): 771-780, 2004.
- 21 WOOD R: THOMPSON M (Eds) The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories. Pure Appl. Chem., 1999. v. 65, p. 2123, (also published in J. AOAC Int. 1993, v. 76, p.926).
- 22. WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. World report on road traffic injury prevention. Geneva: WHO, 2004, 52p.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dra. Simone Aparecida Galerani Mossini Departamento de Análises Clínicas Laboratório de Toxicologia Universidade Estadual de Maringá Av. Colombo, 5790 Bloco J01 87020-900 Maringá-PR, Brasil E-mail: simonegmossini@yahoo.com.br

Para você que é um profissional atento às inovações tecnológicas chegou a oportunidade de conhecer nossas soluções em biossegurança!



A BSTec é uma empresa inovadora que tem desenvolvido seus projetos com o apoio do Ministério de Ciência e Tecnologia, da FINEP, do SEBRAE-RS e FIERGS através do programa INOVAPERS e convida você a conhecer as novidades que apresentará na Feira Hospitalar que se realizará do dia 24 a 27 de maio de 2011, no Expo Center Norte na cidade de São

Esperamos a sua visita no nosso estande localizado na Rua F1, número 123 no Pavilhão Branco.

É a qualidade aliada à segurança que você precisa.

Solicite maiores informações pelo nosso chat www.bstec.com.br comercial@bstec.com.br 54 3286-5788

Apoio

Nossos projetos tecnológicos tem o apoio financeiro de:









Síndrome metabólica em adultos atendidos no Programa Saúde da Família em Barra do Garças/MT

Metabolic syndrome in adult users of the "Programa Saúde da Família", Barra do Garças/MT

Sávia Oliveira de Rezende¹ & Maria Fernanda Spegiorin Salla Brune²

RESUMO - A síndrome metabólica (SM) é caracterizada por um conjunto de fatores de risco que contribuem para a gênese de doenças cardiovasculares. Há controvérsias na identificação desta síndrome, pois não há um único critério internacional para sua definição. O principal objetivo deste estudo foi estimar a prevalência de Síndrome Metabólica em 100 pacientes atendidos pelo "Programa Saúde da Família", em Barra do Garças/MT, tendo como referência os critérios do NCEP-ATP III. Após a análise dos resultados, observou-se uma alta prevalência de SM na população (63%). De acordo com os cinco fatores de risco, a prevalência do HDL-C diminuído foi de 98%, da circunferência abdominal elevada foi de 87%, da hipertensão arterial foi 75%, de triglicérides séricos aumentados foi de 71%, e de hiperglicemia foi de 41%. A maioria dos participantes mostrou a associação de quatro fatores de risco (47,6%), enquanto a associação de três e cinco fatores de risco foi de 28,6% e 23,8%, respectivamente. Como foi observada uma alta prevalência de SM, é importante que se faça um diagnóstico prévio e atenção terapêutica, que poderá tanto prevenir como reduzir as sérias complicações relacionadas a este distúrbio metabólico.

Palavras Chaves: Síndrome Metabólica, risco cardíaco, dislipidemia.

SUMMARY - The metabolic syndrome (MS) is characterized for a group of risk factors, which contribute for the genesis of cardiovascular diseases. There are controversial points in the MS characterization because the lack of an international agreement for its definition. The main objective of the current study was to estimate the prevalence of MS in 100 patients included in a public program, called "Programa Saúde da Família", Barra do Garças/MT, based by NCEP-ATP III criteria. The results have been analyzed, and it was possible to notice a high prevalence of MS in the patients (63%). According to the five risk factors, the prevalence of the reduced HDL-C was 98%, the altered waist circumference was 87%, the hypertension was 75%, hipertrigliceridemy was 71% and hiperglicemy was 41%. Most individuals have got the association of four risk factors (47,6%), while 28,6% and 23,8% of the individuals had three and five risk factors, respectively. Considering the high prevalence of MS, it's important a previous diagnosis and therapeutic attention as well, because it could as reduce as prevent serious complications related to this metabolic dysfunction.

Keywords: Metabolic Syndrome, cardiac risk, dislipidemy.

1. INTRODUÇÃO

À medida que a doença cardiovascular apresenta-se como a principal causa de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos, o conhecimento de suas bases fisiopatológicas e fatores de risco tornamse o foco de pesquisas nesta área, visando a sua prevenção. Neste sentido, a constatação de que diversos fatores de risco pudessem compor uma síndrome, a síndrome metabólica, não é um conceito novo, pois foi originalmente proposto em uma publicação clássica de Reaven, em 1988¹⁰.

Embora a definição para a Síndrome Metabólica (SM) ainda não seja unânime, um conjunto de fatores ou anormalidades metabólicas podem caracterizá-la. Em 2001, a NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III)⁹ enfatizou a associação da SM com doenças cardiovasculares e forneceu uma definição operacional para esta comorbidade. Segundo os critérios do NCEP-ATP III, a Síndrome Metabólica representa a combinação de pelo menos três dentre os cinco parâmetros avaliados: obesidade abdominal, triglicerídeos, HDL-Colesterol,

pressão arterial e glicemia de jejum. Posteriormente, outras definições foram elaboradas, porém a NCEP-ATP III tornou-se a mais aceita pela Sociedade Brasileira de

Diabetes, pois privilegia a circunferência abdominal, as alterações lipídicas, glicêmicas, e também os valores pressóricos¹⁵.

A prevalência de Síndrome Metabólica na população brasileira ainda não está muito bem estabelecida, porém em populações como a mexicana, norte-americana e asiática variam de 12,4% a 28,5% entre os homens, e 10,7% a 40,5% entre as mulheres¹².

A etiologia da SM ainda não foi totalmente elucidada em virtude de sua fisiopatologia ser extremamente complexa. Atualmente, sabe-se que a maioria dos pacientes acometidos por esta disfunção são pessoas obesas, sedentárias e que apresentam resistência à insulina. Os principais fatores de risco estão nessa ordem: idade, predisposição genética, estilo de vida que privilegia pouca atividade física e excesso de consumo calórico³.

Nos últimos anos, há hipóteses de que a causa primária da SM seja a resistência à insulina, que por sua vez está relacionada à gordura visceral, ao passo que a ligação entre resistência à insulina e desordens cardiovasculares

Recebido em 02/07/2009 Aprovado em 15/03/2011

¹Discente do curso de Farmácia da UFMT/Campus Pontal do Araguaia-MT

²Farmacêutica, doutora em Bioquímica, Professora Adjunta do Curso de Farmácia da UFMT/Campus Pontal do Araguaia-MT*

provavelmente seja mediada por um estresse oxidativo com disfunção endotelial, cujas consequências são danos vasculares e formação de ateroma^{11,5}.

Frente à simplicidade e praticidade dos critérios do NCEP-ATP III para definir a SM, esta é a definição recomendada pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica¹⁵, sendo desta forma utilizada pelo presente estudo.

Em face de toda essa situação, objetivou-se identificar a prevalência de Síndrome Metabólica em pacientes adultos atendidos no Programa Saúde da Família (PSF) "Dr. João Bento" e "Central", ambos situados na cidade de Barra do Garças/MT.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra foi constituída por 100 adultos, atendidos pelo Programa Saúde da Família "Dr. João Bento" e "Central", na cidade de Barra do Garças/MT, de ambos os sexos, com idades variando de 19 a 81 anos, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMT.

Os instrumentos utilizados para a coleta dos dados foram um questionário e exames clínico-laboratoriais. Mediante o agendamento prévio dos pacientes, além de esclarecimentos quanto à necessidade de jejum de dez a doze horas, os pacientes compareceram aos respectivos "PSFs" para a coleta de sangue, exame físico e entrevista.

No exame físico foi aferida a pressão arterial e determinada a circunferência abdominal, obedecendo-se o meio da distância entre o extremo superior da crista ilíaca e o extremo inferior da última costela.

Foram coletados aproximadamente 5mL de sangue, por punção venosa, realizando as dosagens de glicemia, HDL-colesterol, e triglicerídeos por método enzimático e colorimétrico semi-automático (BIOPLUS®).

Os exames foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da UFMT/Campus Universitário do Araguaia – Pontal do Araguaia/MT, sendo que os resultados dos exames laboratoriais e clínicos foram utilizados para o diagnóstico da SM e também avaliados isoladamente.

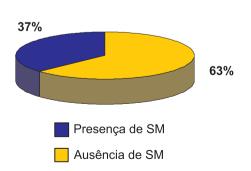


Figura 1 – Distribuição dos participantes deste estudo de acordo com a ocorrência de Síndrome Metabólica (SM), segundo os critérios NCEP-ATP III, em números percentuais (n=100 pacientes).

O protocolo seguido para o diagnóstico de SM foi estabelecido pelo NCEP-ATP III, na forma de consenso na I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica¹⁵.

Os dados foram analisados através da estatística descritiva, apresentados como freqüências, médias e desviopadrão.

RESULTADOS

Foram avaliados 100 pacientes atendidos nos PSFs "Dr. João Bento" e "Central", sendo 79 mulheres (79%) e 21 homens (21%). Com respeito à faixa etária, a idade média dos pacientes foi de 57 anos (± 14 anos). A prevalência de Síndrome Metabólica dentre os pacientes que participaram deste estudo foi de 63% (Figura 1). Na Figura 2 é mostrada a distribuição da SM de acordo com o gênero dos pacientes, sendo diagnosticada em 50 mulheres (63%) e 13 homens (62%).

Considerando os pacientes diagnosticados como portadores de SM (n=63), foi avaliada a prevalência de alterações bioquímicas e clínicas neste grupo (Tabela 1). Verificou-se que os fatores de risco mais freqüentes para a SM foram, nesta ordem: HDL-colesterol diminuído (98%), circunferência abdominal alterada (87%), hipertensão (75%), triglicérides elevado (71%) e, com menor expressão, os valores de hiperglicemia (41%). Tanto no gênero masculino quanto feminino, o fator de risco da SM com maior freqüência foi o HDL-colesterol diminuído (100% para os homens e 98% para as mulheres) e aquele de menor frequência foi a hiperglicemia (31% para homens e 40% para as mulheres).

Na Figura 3 é apresentada a distribuição do número de componentes (ou fatores de risco) nos pacientes diagnosticados como portadores da SM. Dentre o total de 63 indivíduos portadores de SM (50 mulheres e 13 homens), alguns irão apresentar, no mínimo, três fatores de risco e outros no máximo cinco, considerando as possíveis variáveis fisiopatológicas envolvidas na caracterização desse distúrbio metabólico 15.

Com relação aos resultados apurados, é digno de nota que um maior número de indivíduos possui quatro fatores de risco, sendo 22 mulheres e 08 homens, apresentando uma média de idade de 60 anos (± 13 anos). O segundo grupo de



Figura 2 – Representação gráfica da presença de SM, segundo o gênero, nos participantes deste estudo, segundo os critérios NCEP-ATPIII.

Tabela 1 – Ocorrência (%) de alterações dos parâmetros bioquímicos e clínicos dos pacientes que apresentaram SM, seguidos da média e desvio padrão, segundo os critérios NCEP-ATP III.

Indicadores da SM	Geral (n=63) % (Média ± DP)	Mulheres (n = 50) % (Média ± DP)	Homens (n = 13) % (Média ± DP)
Circunferência Abdominal (>88cm/? e >102 cm/?)	87% (103 ± 11)	88% (101 ± 11)	85% (109 ± 9)
Hipertensão arterial (= 130 mm Hg)	75% (143 ± 18)	74% (144 ± 19)	77% (140 ± 11)
Hipertrigliceridemia (= 150 mg/dL)	71% (209 ± 45)	72% (216 ± 48)	69% (182 ± 21)
HDL-C diminuído (<50 mg% ? e <40 mg% ?)	98% (34 ± 9)	98% (35 ± 9)	100% (28 ± 5)
Hiperglicemia (= 110 mg/dL)	41% (154 ± 55)	40% (162 ± 61)	31% (125 ± 56)

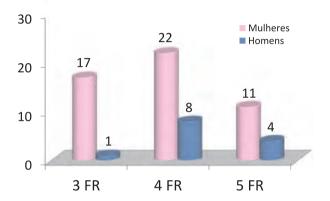


Figura 3 – Porcentagem de pacientes com SM separado por gênero, apresentando 3, 4 e 5 fatores de risco (FR) associados, segundo critério do NCEP-ATP III.

maior expressividade foi composto por três fatores, acometendo 17 mulheres e apenas 01 homem. O terceiro e menor grupo foi aquele composto por indivíduos que apresentavam todos os cinco fatores de risco, e este se constituiu de 11 mulheres e 04 homens. Em suma, o grupo de pacientes que apresentaram três fatores de risco representou 28,6% da população diagnosticada com SM, enquanto 47,6% e 23,8% dos pacientes portadores de SM apresentaram quatro e cinco fatores de risco, respectivamente.

DISCUSSÃO

De acordo com os critérios estabelecidos pelo NCEP-ATP III, é necessário que o indivíduo apresente, obrigatoriamente, pelo menos três fatores de risco para que haja a caracterização da Síndrome Metabólica¹⁵. Portanto, todos os resultados foram fundamentalmente delimitados por estas exigências.

Dentre aqueles que participaram deste estudo, 63% apresentaram Síndrome Metabólica (SM) (n= 63) (Figura 1). O valor encontrado de 63% para SM está em harmonia com o trabalho de Braga *et al.*¹, que encontraram a caracterização de SM em 68,6% dos indivíduos da amostra, de acordo com os parâmetros da IDF (Federação Internacional de Diabetes)⁶. A IDF exige que a circunferência abdominal seja, por excelência, o único fator de risco que deva estar incluído entre os demais

fatores para que se estabeleça a caracterização da SM. Com respeito aos resultados do trabalho citado, a presença de hipertensão arterial em todos os pacientes provavelmente contribuiu para esse elevado valor.

Embora a estimativa da prevalência da SM no mundo ocidental esteja em torno dos 35%, poucos estudos indicam qual é, de fato, a freqüência dessa síndrome nas populações. Portanto, a prevalência dependerá em muito da população estudada e dos critérios adotados¹⁴.

De acordo com a literatura, a SM afeta 24% da população adulta, e entre 50-60% na população acima de 60 anos nos Estados Unidos. Projeções estimam que somente neste país, no ano de 2010, existirão de 50 a 75 milhões de pessoas com manifestações dessa síndrome⁸.

Na Figura 2 é mostrada a distribuição da SM de acordo com o gênero dos pacientes. Foi diagnosticada a SM em 50 mulheres (63%) e 13 homens (62%), havendo um equilíbrio entre os gêneros, mesmo sendo a população feminina expressivamente maior. De acordo com o trabalho de Rossini *et al.*¹¹, a prevalência de SM encontrada foi de 59,6%, sendo 51% para os homens e 64,2% para as mulheres.

Embora tenha havido um equilíbrio na ocorrência de SM em diferentes gêneros, muitos trabalhos sugerem que as mulheres têm uma predisposição maior que os homens em desenvolver essa síndrome, em razão do declínio do estrógeno na menopausa, além da Síndrome dos Ovários Micropolicísticos (SOMP). Uma possível explicação seria que a cessação da função ovariana provocaria uma redução do metabolismo, da quantidade de massa magra e do gasto energético no exercício, além de estimular o acúmulo de gordura no tecido adiposo⁴.

Na Tabela 1, observa-se a prevalência de alterações bioquímicas e clínicas para os pacientes diagnosticados portadores de SM, e também para cada gênero.

Uma pesquisa realizada na cidade de Vitória/ES, com a participação de 1.630 indivíduos durante um ano e sete meses, e baseada nos critérios do NCEP-ATP III, apresentou divergências em relação ao nosso trabalho quanto à posição dos cinco parâmetros avaliados¹³. Já no trabalho de Santos et al.¹⁴, os valores glicêmicos também obtiveram menor expressão com relação à freqüência dos cinco fatores de risco para SM. Ambos os sexos obtiveram valores aproximados para os níveis de HDL-C (84,8% para mulheres e 80,9% para homens) e triglicérides elevado (49,3% mulheres e 47,6% para homens), assim como os valores encontrados em nosso trabalho (Tabela 1).

Com respeito às dislipidemias, representadas neste trabalho pelas elevadas percentagens de HDL-C diminuídos, estas ocuparam a primeira posição referente aos cinco fatores de risco. Por isso, é importante que se faça um controle rigoroso dos níveis lipídicos a fim de se evitar conseqüências cardíacas mais graves. Preocupados com esse assunto, a IV Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose elaborou um protocolo cuja finalidade principal é orientar os profissionais de saúde no atendimento de portadores com esse desarranjo lipídico, na tentativa de prevenir a aterosclerose ou reduzir suas complicações¹⁶.

Na Figura 3 é apresentada a distribuição do número de componentes (fatores de risco) nos pacientes diagnosticados como portadores da SM. Com relação aos resultados apurados, é digno de nota que um número maior de indivíduos apresentou quatro fatores de risco para a SM, com uma média de idade de 60 anos (± 13 anos), confirmando outros trabalhos que mostraram uma relação direta entre o aumento da idade e conseqüente elevação dos constituintes de risco da SM. Portanto, à medida que a idade avança, os fatores de risco tendem a se acumular em virtude de um reforçar a instalação do outro².

O trabalho de Rossini *et al.*¹², que contou com a participação de 146 indivíduos, apresentou os seguintes resultados com relação a todos os fatores de risco observados: com a associação de três deles havia 24,7%; os portadores de quatro fatores responderam por 28,1% e com os cinco fatores de risco foram encontrados 6,8% dos pacientes.

É importante destacar neste trabalho que, embora o grupo portador de quatro fatores de risco fosse o maior numericamente, formado por 30 pessoas, e o grupo com cinco fatores fosse aquele que agregou uma população menor, com 15 pessoas, uma avaliação mais minuciosa mostra que os gêneros feminino e masculino apresentaram divergências no que diz respeito ao número de fatores de risco associados. Isso significa que a seqüência dos fatores de risco descrita anteriormente, não é a mesma para os homens e para as mulheres (Figura 3).

Portanto, dentre os homens diagnosticados com SM (n=13), um maior número de indivíduos apresentou a associação de quatro fatores de risco, representando 62% da população masculina. A associação de cinco fatores de risco também se apresentou elevada em homens, representando 31% desta população. A associação de três fatores de risco foi observada em apenas um homem (7%).

Com respeito ao gênero feminino, a associação dos fatores de risco apresentou algumas diferenças em relação aos homens. O grupo que possuía o maior número de indivíduos (n=22), assim como para os homens, também obteve a associação de quatro fatores de risco, representando 44% da população feminina. Em segundo lugar, no entanto, encontrouse a associação de três fatores de risco (34% da população feminina), e finalmente o grupo feminino numericamente menor apresentou a associação de cinco fatores de risco (22% da população feminina). Com base nestes dados percentuais, concluiu-se que o gênero masculino apresentou uma maior combinação de fatores de risco para a SM, quando comparado às mulheres.

Segundo a literatura, ao se avaliar o risco do desenvolvimento de doença cardiovascular e diabetes, relacionado ao número de componentes para SM, concluiu-se que o risco cardíaco é seis vezes maior quando quatro ou mais componentes (fatores de risco) estiverem presentes no indivíduo⁷.

Conforme foi apresentado, a SM causa um transtorno metabólico que cronicamente promove, se ainda não houver, a instalação de hipertensão arterial, diabete *mellitus* 2, que somados respondem por complicações cardiovasculares fatais. Embora não existam pesquisas consistentes de grande amostragem epidemiológica a respeito deste assunto, isso não o torna de menor importância ou insignificante.

Este trabalho se torna uma ferramenta importante para incentivar o controle dos fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da SM. A elevada prevalência deste distúrbio metabólico ressalta a importância de ações específicas na área de saúde, focadas no controle de dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes, principalmente entre a população adulta e sedentária. Quanto aos profissionais da saúde, cabe o desenvolvimento de programas de conscientização e recomendações que facilitem a adesão ao tratamento por parte dos pacientes.

4. REFERÊNCIAS

- 1. BRAGA, F.L.M & et al. Síndrome Metabólica em pacientes hipertensos atendidos ambulatoriamente em um hospital de ensino. Rev. Bras. Nutr. Clin., 23 (1): 13-20, 2008.
- 2. BRANDÃO, A. A. & et al. Prevenção da doença cardiovascular: aterosclerose se inicia na infância? Revista da SOCERJ, Rio de Janeiro, jan./fev./mar 2004.
- 3. DEEN, D. Metabolic Syndrome: Time for action. American Family Physician, 69 (12): 2875-2882, 2004. Disponível em: www.aafp.org/afp. Acesso em: 05/2008.
- 4. FRANÇA, A.P & et al. Fatores associados à obesidade global e à obesidade abdominal em mulheres na pós-menopausa. Rev. Bras. Saúde Materna-Infantil, 8 (1): 65-73, 2008.
- 5. GUIMARÃES, I.C.B. & GUIMARÃES, A.C. Sindrome Metabólica na infância e adolescência, um fator maior de risco cardiovascular. Revista Baiana de Saúde Pública, 30 (2): 349-362, 2006.
- um tator maior de risco caraiovascular. Revista balana de Saude Publica, 30 (2): 349-362, 2006.

 6, IDF INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION The IDF consensus worldwide definition of metabolic syndrome, 2008. Disponível em: http://www.idf.org. Acesso em: 05/2008.
- 7. KLEIN B.E. & et al. Components of the metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease and diabetes in Beaver Dam. Diabetes Care, 25:1790-1794, 2002.
- 8. MOTA, C.S.A & MELO, M.A.R. Exercício e Síndrome Metabólica. Rev. Motriz Rev. de Educ. Fís., 12 (2): 185-193, Rio Claro, 2006.
- 9. NCEP-ATPIII The Third Report of National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of high blood cholesterol in adults, (Adult Treatment Panel III), JAMA, 285 (19): 2486-97, 2001.
- 10. REAVEN G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes, 37: 1595-607. 1988.
- 11. RIBEIRO FILHO & et al. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 50 (2): 230-238, 2006.
- 12. ROSSINI, N. & et al. Prevalência de síndrome metabólica e estratificação de risco para DAC em pacientes hipertensos-tabagistas. Revista RBAC, 39 (3): 223-226, 2007.
- 13. SALAROLI, L.B. & et al. Prevalência de Síndrome Metabólica em estudo de base populacional, Vitória-ES-Brasil. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 51 (7): 1143-1152, 2007.
- 14. SANTOS, R. & et al. Obesidade, síndrome metabólica e atividade física: estudo explanatório realizado com adultos de ambos os sexos, da ilha de S. Miguel, região autônoma de Açores, Portugal. Rev. Bras. Ed. Física Esp., 10 (4): 317-318, 2005.
- 15. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Arq. Bras. Card., 84: 1-28, Abril, 2005.
- 16. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da aterosclerose. Arq. Bras. Card., 88: 1-18, Abril, 2007.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Maria Fernanda S. S. Brune UFMT – Campus Universitário do Araguaia Rodovia MT100 Km3,5 CEP 78698-000. Pontal do Araguaia/MT

E-mail: fersalla@yahoo.com.br

Caracterização do Perfil de Resistência à Fluoroquinilonas, Patos de Minas (MG)*

Caracterization of the of Resistance to Fluoroquinilonas, Patos de Minas (MG)*

Rodolfo Augusto Araujo Rabello¹; Lydiane Lara Caixeta¹; Soraya Carolina Caixeta²; Marcos Vinicius Rocha³ e Vanessa Pereira Tolentino Felicio⁴

RESUMO - As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as infecções mais comuns na clínica médica e respondem a uma grande parte dos processos infecciosos, comunitários e hospitalares. São caracterizadas pela invasão e multiplicação de microrganismos nas vias urinárias, habitualmente, bactérias. Este trabalho teve como objetivo investigar as ITU no município de Patos de Minas, em usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), no período de agosto de 2008 a abril de 2009, através de exames realizados no Laboratório Universitário de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, ressaltando a idade, sexo e a prevalência dos microrganismos envolvidos e a observação da resistência/sensibilidade dos microrganismos encontrados aos antimicrobianos, Ampicilina, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Nitrofurantoina e Sulfametoxazol-Trimetoprima. Dos 1.245 resultados de urocultura analisados, 201 (16,14%) apresentaram resultados positivos para ITU, sendo que 13,89% (173) foram do sexo feminino. A prevalência por idade se apresentou, de 20 à 39 anos com 5,4% (65), seguido pela faixa etária de 40 à 59, com 5,1% (63). Das uroculturas positivas, a prevalência foi maior para as bactérias Gram negativas (BGN), 89% (179), sendo a *E. coli*, presente em 66% (133) das amostras positivas. Ao analisar o perfil de sensibilidade, a Ampicilina apresentou-se sensível (S) em 43% (86) e 53% (113) resistente; a Sulfa/trimetoprima S= 61% (122) e R=38% (76); Nitrofurantoina S=77% (154) e R=21% (43); Norfloxacina S=71% (142) e R=28% (56); e o Ciprofloxacina S=75% (150), e R=24% (49). Assim conclui-se que o uso indiscriminado de antimicrobianos acaba levando à resistência.

Palavras Chave: Infecção. Trato urinário. Escherichi coli. Antimicrobianos.

SUMMARY - The urinary tract infections (ITU) is an extremely common condition that occurs in all ages, from newborns to the elderly. Accordingly, this work aims to investigate the ITU in the city of Patos de Minas, in users of the Sistema Único de Saúde (SUS), from August 2008 to April 2009 in tests Laboratório Universitário de Análises Clínicas, emphasizing the age, sex and prevalence of the microorganisms involved and the observation of resistance / sensitivity to antibiotics of microorganisms found Ampicillin, Ciprofloxacin, norfloxacin, nitrofurantoin and trimethoprim-sulfamethoxazole. The 1245 results of urine culture tested, 201 (16.14%) showed positive results for ITU, with 13.89% (173) were female. The prevalence by age is presented from 20 to 39 years with 5.4% (65), followed by the age of 40 to 59, with 5.1% (63). By analyzing the profile of sensitivity, is presented Ampicillin sensitive (S) in 43% (86), 1% intermediate (I) and 53% (113) resistant; to Sulfa/trimethoprim S = 61% (122), I = 1% (3) and R = 38% (76); Nitrofurantoin S = 77% (154), I = 2% (4) and R = 21% (43); Norfloxacin S = 71% (142), I = 1% (3) and R = 28% (56), and Ciprofloxacin S = 75% (150), I = 1% (2) and R = 24% (49). Thus it is concluded that the indiscriminate use of antibiotics has led to resistance.

Keywords: Infection. Urinary tract. Escherichia coli. Antimicrobials

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma afecção muito comum e responde a uma grande parte dos processos infecciosos, comunitários e hospitalares. É caracterizada pela invasão e multiplicação de microrganismos nas vias urinárias, habitualmente, bactérias.

No Brasil as ITUs são consideradas as mais comuns das infecções bacterianas responsáveis por 80 em cada 1.000 consultas clínicas (DALBOSCO *et al.* 2003 *apud* MULLER; SANTOS; CORRÊA, 2008). Daí se vê a importância das ITU para a Saúde Pública.

A prevalência varia de acordo com a faixa etária. É mais comum no sexo masculino, no primeiro ano de vida, devido à maior prevalência de mal-formações congênitas, como válvula de uretra posterior, mal-formações da uretra. Após tal período, passa a ser mais freqüente no sexo feminino. Na idade pré-escolar, tende a ser de 10 a 20 vezes maior em crianças do sexo feminino (VIEIRA NETO, 2003). No adulto, a frequência de ITU aumenta, também, com predomínio no sexo feminino, com picos de prevalência, no início, ou relacionado com atividade sexual, na gestação e na menopausa. A prevalência volta a aumentar no sexo masculino após a 5ª e 6ª década de vida, devido a problemas da próstata. A menor prevalência de ITU, no sexo masculino, deve-se a fatores anatômicos: uretra mais longa, atividade bactericida do fluido prostático e ambiente periuretral mais úmido. No sexo feminino. além da uretra mais curta, há, também, maior proximidade do ânus com a uretra e o vestíbulo vaginal, o que possibillita a colonização destes por enterobactérias que, habitualmente, causam ITU (HEILBERG; SCHOR, 2003).

Recebido em 02/07/2009 Aprovado em 03/03/2011

¹Graduandos (2009) do curso de Farmácia do Centro Universitário de Patos de Minas- UNIPAM.
² Professora Especialista do curso de Farmácia do Centro Universitário de Patos de Minas- UNIPAM.
³ Farmacêutico bioquímico do Laboratório Universitário de Análises Clínicas do UNIPAM.
⁴ Professora Mestre do curso de Farmácia do Centro Universitário de Patos de Minas- UNIPAM.
*Laboratório Universitário de Análises Clínicas e Toxicologicas/UNIPAM

O tipo mais comum de ITU é a infecção da bexiga urinária, também conhecida como cistite. Outro tipo de ITU é a infecção renal, conhecida como pielonefrite que é muito mais grave. Embora elas causem desconforto, as infecções do trato urinário geralmente são tratadas rapidamente e facilmente com tratamento com antimicrobianos adequados. Entretanto, o uso inadequado de antimicrobianos vem se tornando um dos mais graves problemas de Saúde Pública, pela resistência bacteriana adquirida. O freqüente uso de agentes antimicrobianos podem resultar na seleção de bactérias resistentes causando falhas terapêuticas importantes.

O diagnóstico de ITU é feito através de exames, diagnóstico laboratorial, sintomatologia e do encontro de bactérias na urina. A infecção deve ser tratada precocemente e com toda a atenção. O tratamento deve ser específico para cada tipo de microrganismos infectante. A escolha do antimicrobiano mais eficaz é baseada no Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) que analisa e quantifica a susceptibilidade das bactérias aos medicamentos (MENEZES et al., 2005).

Pelotto e Reis (2005) afirmam que a ocorrência do patógeno causador de ITU varia geograficamente e o perfil de suscetibilidade requer monitoramento para fornecer informações para novas orientações de opções terapêuticas:

Segundo Zhang (2004 *apud* KOCH *et al.*, 2008), no Brasil, os antimicrobianos recomendados para o tratamento empírico da ITU adquirida na comunidade em adultos são sulfametoxazol/Trimetoprima, quinolonas (norfloxacina ou ciprofloxacina), cefalosporinas de 1ª ou 2ª gerações, amoxiciclina/clavulanato ou nitrofurantoína. No entanto, o crescimento da resistência antimicrobiana dos uropatógenos deixa dúvida sobre a validade dessas recomendações.

A importância desse trabalho consiste no fato de que, através dele, será feita a caracterização das ITUs em um Laboratório de Análises Clínicas no município de Patos de Minas, ressaltando alguns fatores predisponentes a esta patologia como idade, sexo a esta patologia, a prevalência dos microrganismos mais envolvidos e a observação do comportamento dos antimicrobianos frente a estas bactérias.

Este trabalho teve como objetivo investigar as infecções do trato urinário (ITU) em um laboratório no município de Patos de Minas no período de agosto de 2008 a abril de 2009 em exames, ressaltando a idade, sexo e a prevalência dos microrganismos envolvidos e a observação da resistência/sensibilidade dos microrganismos encontrados nos exames aos antimicrobianos analisados: Ampicilina, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Nitrofurantoina e Sulfametoxazol-Trimetoprima.

METODOLOGIA

O estudo desenvolvido foi do tipo retrospectivo de corte transversal, no período de agosto de 2008 a abril de 2009. Foi realizado através do levantamento de resultados de exames de urocultura em usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), usuários estes encaminhados por demanda espontânea das Unidades Básicas de Saúde (UBS), após consulta médica e

suspeita de ITU. Os exames foram realizados no Laboratório Universitário de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro Universitário de Patos de Minas- UNIPAM, determinando a prevalência de bactérias envolvidas nas ITUs diagnosticadas laboratorialmente, bem como a idade e o sexo dos pacientes acometidos e a resistência ou sensibilidade dos microrganismos encontrados aos antimicrobianos (mais vendidos no comércio/ prescritos): Ampicilina, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Nitrofurantoina e Sulfametoxazol-Trimetoprima.

Investigou-se ao todo 1.245 resultados de exames de urocultura, sendo que nos resultados positivos foram observados a espécie do patógeno encontrado e os resultados do TSA para os antimicrobianos analisados.

Foi concedida autorização pelo Diretor da Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Patos de Minas (FACISA/UNIPAM) e do Diretor Técnico do Laboratório Universitário de Análises Clínicas e Toxicológicas (LUACT/UNIPAM) desta mesma instituição, para acesso a todos os registros de urocultura e antibiograma realizados neste período.

Inicialmente, foi elaborada a estrutura de um banco de dados no programa Excel (versão 2007), esta estrutura permitiu que os dados coletados fossem imediatamente digitados, de forma a favorecer sua análise.

Obteve-se a estimativa de uroculturas positivas e negativas analisadas segundo as variáveis do estudo. Para análise, os resultados foram expressos em número absoluto e em porcentagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 1.245 dados coletados para este estudo, no período de agosto de 2008 a abril de 2009, 16,14% (201) apresentaram resultados de uroculturas positivas e 83,86% (1.044) de uroculturas negativas (Figura 1).

A infecção do trato urinário é uma das doenças mais comuns. A prevalência verificada nesse trabalho se assemelha a outros trabalhos descritos, como o de Muller, Santos e Corrêa (2008), realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense - Umuarama (PR), onde foi identificado 15,85% (n=52) de resultados positivos, sendo 14,64% (n=48) em mulheres; ao trabalho de Kazmirczak, Giovelli e Goulart (2005), desenvolvido no Município de Guarani das Missões, onde foram analisados 226 exames, dos quais 52 (23%) apresentaram amostras positivas, acometendo principalmente indivíduos do sexo feminino (90% dos casos de ITU); e ao trabalho de Pelotto e Reis (2005), realizado na cidade

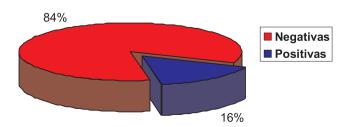


Figura 1 – Porcentagem de uroculturas positivas e negativas, LUACT/UNIPAM, 2009.

de Goiânia (GO), onde, das 442 amostras analisadas, houve 78 (17,6%) resultados positivos para infecção do trato urinário.

A Figura 2 mostra a distribuição da freqüência de uroculturas positivas e negativas relacionadas com o sexo da população amostrada. Foi detectada uma freqüência maior de positividade no sexo feminino, com 17,2% (173). Este dado pode ser explicado pelo fato de as mulheres serem mais susceptíveis a este tipo de infecção por diversos fatores, dentre eles, fatores associados ao comprimento da uretra e sua localização próxima da abertura anal, facilitando, dessa forma, a contaminação por bactérias.

Porém essa diferença de 12% para 17%, não é estatisticamente significativa. Em estudo realizado por Mora *et al.* (2008), no Município Flor do Sertão- Santa Catarina, das 126 uroculturas analisadas, 35% foram positivas, destas 89% pertenciam ao sexo feminino e em relação à idade dos pacientes avaliados, a maioria se concentrou entre 20 a 30 anos (25%).

Em relação às associações entre a faixa etária e positividade, relatadas na figura 3, pode ser verificado que a maior prevalência ocorreu entre as idades de 20 a 59 anos. Foi observado uma frequência de 5,4% (65) na faixa etária 20 a 39 anos e na de 40 a 59 anos, de 5,1% (63). As menores frequências encontram-se na faixa etária acima de 80 anos, com 1,2% (15)

Segundo Schaechter et al. (2002), 20% das mulheres já sofreram algum episódio de infecção urinária ao atingir 30 anos de idade. Heilberg e Schor (2003) complementam que 48% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU ao longo da vida, relacionada principalmente a atividade sexual, a gestação ou a menopausa.

No sexo masculino as infecções urinárias são menos comuns, isso se deve principalmente ao tamanho da uretra, que é bem maior que a do sexo feminino e, segundo Kazmirczak, Giovelli e Goulart (2005), pode também estar relacionado a quadros de hipertrofia prostática, que obstruem o fluxo urinário causando esvaziamento vesical incompleto e, consequentemente, a infecção urinária.

Na Figura 4 está representada a porcentagem de positividade em uroculturas relacionada com a característica bacteriana quanto à técnica de coloração do Gram. Verificou-se 89% (179) dos resultados de uroculturas positivas estão

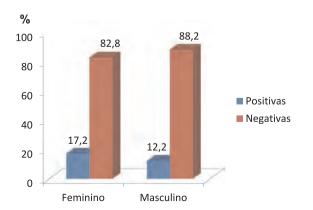


Figura 2 – Prevalência de positividade de uroculturas em relação ao sexo da população amostrada, LUACT/UNIPAM, 2009.

relacionados a Bastonetes Gram negativos (BGN) e 11% (22) a Cocos Gram positivos (CGP).

Estes resultados se assemelham aos obtidos por Pelotto e Reis (2005), que identificaram que em 85,9% das uroculturas positivas o agente causador da ITU era BGN.

Com relação à piúria, urocultoras positivas, (Figura 5) este trabalho apresentou resultados de 20,8% (42) das uroculturas positivas com até 6 piócitos por campo e 79,2% (159) com uroculturas positivas contendo acima de 6 piócitos por campo. Já em relação às uroculturas negativas, 93,9% (980) apresentaram número de piócitos inferiores a 6 por campo e, 6,1% (64), apresentaram a acima de 6 piócitos por campo.

Segundo Riccetto (2004), dentre os indicativos de contaminação bacteriana da urina no momento da coleta podese destacar a presença de quantidades expressivas de células epiteliais, escamosas na microscopia do sedimento urinário (indicativas de contaminação a partir do intróito vaginal ou prepúcio). O achado de leucocitúria ou piúria no exame do sedimento urinário, com mais de 6 leucócitos por campo de grande aumento, é indicativo de inflamação. O referido autor afirma também que na maioria dos casos de infecção urinária o achado de leucocitúria vem acompanhado pela presença de bacteriúria, e é importante lembrar que o achado de piúria sem a presença de bacteriúria deve fazer-nos pensar na possibilidade de contaminação na coleta como frasco coletor contaminado, contato da amostra com a água do vaso sanitário, dentre outras, ou tuberculose do trato urinário.

Riccetto (2004) afirma que piúria significativa pode estar ausente em 23 a 50% dos casos de ITU. Além de ITU, piúria pode ser observada em crianças com desidratação grave, apendicite, injúria química do trato urinário e glomerulonefrites. A tuberculose renal também causa piúria. Cilindros piocitários sugerem pielonefrite.

A conversão de nitrato em nitrito sugere bacteriúria e esta sugere ITU por BGN. Quando foi avaliada presença de nitrito nas amostras analisadas, verificou-se que em 100% das uroculturas positivas foram isoladas alguma espécie de Enterobactérias.

A análise da Figura 6 mostra que dos 133 (66%) achados para *E. coli* nos resultados positivos de uroculturas, 119 (59%) pertencem ao sexo feminino, seguida por *Klebsiella sp.*, com 20 (10%), onde 18 (9%) pertencem ao sexo feminino e,

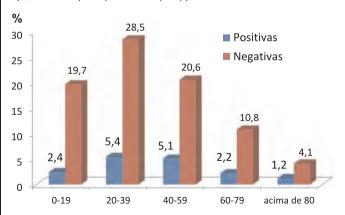


Figura 3 – Freqüência de uroculturas positivas e negativas por faixa etária, LUACT/UNIPAM, 2009.

por *Enterobacter sp.*, 13 (6,5%). Apresentam menor freqüência o *Sthaphylococcus saprophyticus* 6%¹², *Proteus sp.* 3,5% (7), e *Streptococcus agalactiae* com 3%³, do total de positivos. As outras espécies encontradas não obtiveram porcentagem maior que 1,5% cada.

Detectou-se que das espécies bacteriana, a *E. coli* (BGN) obteve uma porcentagem superior às demais as espécies encontradas, mas também foi notável entre os CGP os *Sthaphylococcus saprophyticus, Streptococcus agalactiae e o Enterococcus sp.* tiveram uma prevalência significativa. Em análise individual das espécies, o *Streptococcus agalactiae* mostrou-se com taxa de freqüência no sexo feminino idêntica à freqüência geral, provavelmente por colonizar o canal vaginal.

Segundo trabalho realizado por Pelotto e Reis (2005), em um total de 442 amostras, a porcentagem de *E. coli* tem sua referência em 67,9% (53) dos casos. Esse resultado é bastante similar ao obtido na presente pesquisa, onde, no total de 1245 amostras, 66% (133) foram positivas para *E. coli*. Porém, a *Klebsiella sp.* ficou bem aumentada, de 3,8% (3), identifica no trabalho realizado pelos autores citados, para 10% (20) obtidos na presente pesquisa. Com relação à positividade do *Streptococcus agalactiae*, no trabalho desenvolvido por Pelloto e Reis (2005), 3,8% (3) das amostras foram positivas, valor esse que se aproxima muito bem do relatado no presente trabalho, que é 3% (6).

É válido lembrar que, dentre os 11% de CGP, os Sthaphylococcus saprophyticus obtiveram um índice de 6% (12) do total de positivos, onde tem sido apontado como segunda causa mais freqüente de ITU não complicada. O diagnóstico de ITU por S. saprophyticus é por vezes difícil, pelo fato de apresentar um crescimento muito lento em urocultura e também porque este agente pode ser confundido com outros Staphylococcus como o coagulase e DNAse-negativo, saprófita da flora comensal do trato urinário, mucosas e pele, como o Staphylococcus epidermidis. O que o diferencia deste último é a resistência ao antimicrobiano Novobiocina e ao Ácido Nalidíxico. Nas ITUs complicadas, a prevalência de Pseudomonas é maior e de gram-positivos resistentes como Enterococcus também (HEILBERG; SCHOR, 2003).

O estudo da caracterização do perfil de sensibilidade dos patógenos bacterianos, representado na figura 7, mostra altas taxas de resistência à ampicilina 56% (113) e sulfametoxazol/Trimetoprima 38% (76).

Vários estudos têm reportado taxas semelhantes para ampicilina. Pelotto e Reis (2005) afirmam que os

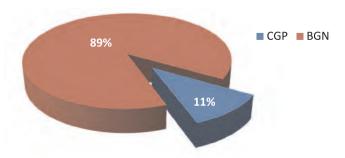


Figura 4 – Porcentagem de positividade em uroculturas relacionada com a característica bacteriana quanto à técnica do Gram, LUACT/UNIPAM. 2009.

microrganismos Gram-negativos se mostraram resistentes em maior índice à ampicilina (72,7%), em seu estudo em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia.GO.

Segundo os mesmos autores, mesmo apresentando uma alta concentração urinária, o uso desse antimicrobiano não é recomendados para tratamento das ITUs por causa da resistência e alta recorrência, quando comparados a outros agentes. Esta resistência é justificada principalmente pela produção de Beta-lactamases e por alterações nas proteínas de ligação das penicilinas (PBPs) das bactérias.

A sulfametoxazol/Trimetoprima foi durante muito tempo uma das principais opções terapêuticas para o tratamento de infecções urinárias, no entanto, tem sido detectada uma diminuição na sua atividade, provavelmente em decorrência principalmente do uso indiscriminado, uso empírico e mais vários fatores não tão importante quanto esses.Para Zhang (2004 apud KOCH et al., 2008), na maioria dos pacientes que apresentaram resistência bacteriana in vitro a sulfametoxazol-trimetoprima ou trimetoprim isso ocorreu porque os mesmos foram tratados empiricamente com esses antimicrobianos.

Bail, Ito e Esmerino (2006) dizem que a resistência ao sulfametoxazol/trimetoprima tem aumentado em todo o mundo, mesmo nas infecções comunitárias, o que limita seu uso como antimicrobiano empírico.

Chama a atenção o fato de que esses antimicrobianos são justamente aqueles mais indicados para o tratamento empírico de ITU adquirida na comunidade em adultos. Esses dados indicam que o emprego freqüente dos antimicrobianos foi provavelmente o fator responsável pelo surgimento de resistência antimicrobiana. Estes resultados são alarmantes, indicando a necessidade de uso mais racional dos antimicrobianos no Brasil (ZHANG, 2004 apud KOCH et al., 2008).

A Nitrofurantoina, no presente trabalho, apresentou um exelente índice de sensibilidade de 77% (154), porém sua resistência vem aumentando, como pode ser visto neste trabalho, mesmo com uma boa porcentagem de sensibilidade, sua resistência tem aumentado consideravelmente 21% (43). Isso também foi evidenciado por Blatt e Miranda (2005), onde foi identificada resistência de 22,2% a *Proteus spp*, 24% a *Klebsiella spp*, mas teve bom resultado para *E. coli*.

As quinolonas testadas, Norfloxacina e Ciprofloxacina,

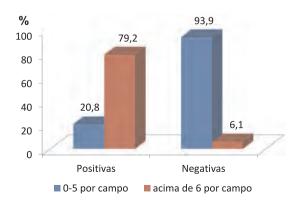


Figura 5 - Relação da presença de piócitos, LUACT/UNIPAM, 2009.

exibem excelente potencial *in vitro*. Entretando, esses compostos apresentam uma baixa taxa de sensibilidade (77,5 – 78,6%), como apontado por Mimica *et al.*(2001). De um modo geral, continuam sendo boas opções terapêuticas, pois apresentam baixa taxa de resistência e uma grande sensibilidade, apresentando um bom resultado ao tratamento e se tornando, muita das vezes, de primeira escolha para tratamento de ITU, segundo Bail, Ito e Esmerino (2006). O antimicrobiano mais prescrito empiricamente foi a Norfloxacina.

Com relação aos antimicrobianos com maior prevalência de sensibilidade, como o Ciprofloxacina e o Norfloxacina, Heilberg e Schor (2005) afirmam que a sensibilidade das antigas e novas quinolonas fazem com que elas sejam mais indicadas para tratamento de infecções não complicadas e também na profilaxia, uma vez que possuem amplo espectro e alta adesão de tratamento, reduzindo as chances de ITUs se tornarem complicadas.

Em um estudo feito por Bail, Ito e Esmerino (2006), na Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa, a norfloxacina apresentou uma das melhores taxas de susceptibilidade para *Escherichia coli* (88,4%) e outras enterobactérias (94,1%) de origem comunitária e uma discreta taxa inferior entre os isolados hospitalares (*Escherichia coli* 84,2% e outras

Enterobactérias 87,5%). Isto demonstra a grande adesão do tratamento pelas fluoroquinolonas.

A resistência para as fluoroquinolonas têm aumentado, possivelmente pelo uso intenso desses fármacos no tratamento das infecções urinárias. Com o aumento da resistência a vários antimicrobianos, e como já dito, os excelentes resultados obtidos em relação ao uso das fluoroquinolonas, de alguma maneira tornaram seu uso indiscriminado.

Como por exemplo, quando em um teste de antibiograma uma bactéria mostra-se sensível a um antimicrobiano já usado para ITU há mais tempo, mesmo que este apresente taxa de resistência grande, para este referido teste não foi, sendo que com a confirmação do teste, esse comumente usado seria de grande eficácia no tratamento, evitando o uso de variados antimicrobianos, conseqüentemente evitando também as resistências.

Devem-se reservar as quinolonas de maior espectro como a Ciprofloxacina para uso em caso de impossibilidade de uso das outras drogas para não induzir resistência. A Ciprofloxacina é especialmente útil em pielonefrite de moderada severidade, pois sua penetração tecidual é superior à da Norfloxacina (HEILBERG; SCHOR, 2003).

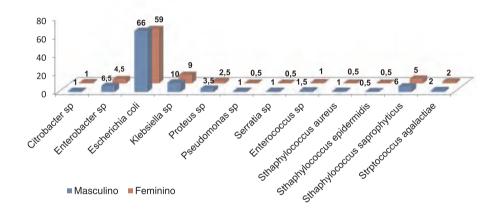


Figura 6 - Distribuição da freqüência da positividade de uroculturas relacionada com o sexo feminino, LUACT/UNIPAM, 2009.

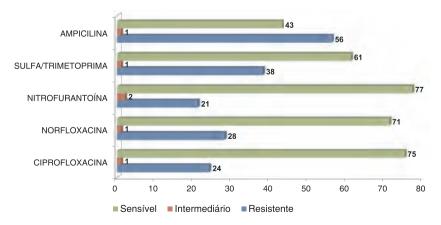


Figura 7 – Caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos aos patógenos isolados de uroculturas, LUACT/UNIPAM, 2009.

CONCLUSÃO

O presente estudo foi realizado a partir dos dados de resultados dos exames de urocultura realizados no Laboratório Universitário de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro Universitário de Patos no período de agosto de 2008 a abril de 2009, envolvendo um total de 1.245 amostras. Com base nos resultados obtidos, podem-se alistar várias conclusões a seguir:

- AITU é uma patologia mais diretamente relacionada às mulheres, pois dos 1245 exames de urocultura, 13,89% (113), dos 16,14% (201) de casos positivos foram presente no sexo feminino;
- A faixa etária de 20 a 39 anos apresentou maior número de ITU:
- Das uroculturas positivas, a prevalência foi maior para as BGN 89% (179), sendo a *E. coli* 66% (133) a principal responsável pela ITU;
- Com relação de piúria e bacteriúria os resultados foram de 20,8% (42) das uroculturas positivas com até seis piócitos por campo, e 79,2% (159) com acima de seis piócitos por campo.
- Em relação aos antimicrobianos, destaca-se uma grande resistência a Ampicilina 53% (113) e sulfa/Trimetoprima 38% (76), Norfloxacina 28% (56) e Ciprofloxacina 24% (49).

Os resultados encontrados no presente estudo servirão de referência e alerta aos profissionais de saúde, devido a grande importância de fatores relacionados à resistência bacteriana. A pesquisa favorece a reflexão sobre a maneira correta e a necessidade específica de cada caso de ITU, para utilização do antibiótico mais apropriado. A realização de testes como o antibiograma, para tratamento das ITUs e, consequentemente, a utilização do antimicrobiano mais apropriado evitam o uso indiscriminado, que acaba levando à resistência, fato evidente entre as fluoroquinolonas, que têm apresentado índices cada vez maiores de resistência.

REFERÊNCIAS

1.BAIL, L.; ITO, C.A.S.; ESMERINO, L.A. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. RBAC, v.38, n.1, p.51-56, 2006. 2.BLATT, J.M.; MIRANDA, M.C. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. Revista Panamericana de Infectologia, v.7, n.4, p.10-14,

3.HEILBERG, I.P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário—Itu. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.49, n.1, Jan./Mar. 2003. 4. KAZMIRCZAK, A. GIOVELLI, F.H.; GOULART, L.S. Caracterização das Infecções do Trato Urinário Diagnosticadas no Município de Guarani das Missões – RS. **RBAC**, v.37, N.4, P. 205-207, 2005.

5.KOCH, C.R.; RIBEIRO, J. C.; SCHNOR, O. H.; ZIMMERMANN, B. S.; MÜLLER, F. M.; D' AGOSTIN, J.; MACHADO, V. E ZHANG, L. Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.41, n.3, Maio/Jun. 2008.

6.MENEZES, E.A.; CARNEIRO, H. M.; CUNHA, F. A.; OLIVEIRA, I. R. N.; ÂNGELO, M. R. F. e SALVIANO, M. N. C.. Freqüência de Microrganismos Causadores de Infecções Urinárias Hospitalares em Pacientes do Hospital Geral de Fortaleza. RBAC, v.37, n.4, p.243-246, 2005.

7.MIMICA, L. M. J. et al. Atividade in vitro de gatifloxacina e outros antimicrobianos frente a 1885 isolados clínicos em 11 centros no Brasil. RBM (Revista Brasileira de Medicina), Rio de Janeiro, v. 58. n. 3. 2001.

8.MORA, J.F.; MENEZES, I.; REQUIA, M. K. e SARDIGLIA, C. U. Perfil dos Pacientes com Infecções do Trato Urinário diagnosticados no Município de Flor do Sertão – SC. RBAC, v.40, n.4, p.321-323, 2008.

9.MULLER, E.V.; SANTOS, D.F.; CORRÊA, N.A.B. Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense—Umuarama—PR. RBAC, v.40, n.1, p.35-37, 2008.

10.PELOTTO, K.Q.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.5, p.416-420, set./out. 2005.

11.RICETTO, C.L.Z. Infecções do trato urinário: fisiopatologia e diagnóstico, 2004. Disponível em: < http://www.fcm.unicamp.br/deptos/cirurgia/urologia/graduacao/pdf/ITU_ fisiopatologia e diagnostico.pdf>. Acesso em: 30 maio 2009.

12.VIEIRA NETO, O.M. Infecção do trato urinário. Medicina, Ribeirão Preto, v.36, p.365-369, abr./dez. 2003. Disponível em: http://www.fmrp.usp.br/revista/2003/36n2e4/22%20 infeccao trato urinario.pdf>. Acesso em: 25 maio 2009.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Vanessa Pereira Tolentino Felicio Av Afonso Queiroz, 812 - Antonio Caixeta Patos de Minas/MG CEP 38705-167

E-mail: vanessa@unipam.edu.br

Envolvimento das quimiocinas CCL2 e CCL5 na patogênese do câncer de mama

Involvement of CCL2 and CCL5 chemokines in breast cancer pathogenesis

Alissana Ester lakmiu Camargo¹, Thiago Cezar Fujita², Kalil William Lima³, Mateus Nobrega Aoki² & Maria Angelica Ehara Watanabe⁴

RESUMO - No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres com um risco de 51 casos a cada 100 mil mulheres. A metástase, principal causa de morte pelo câncer de mama, é dirigida a uma variedade de órgãos vitais, como ossos, pulmões, cérebro e fígado. Ocorre quando células tumorais geneticamente instáveis adaptam-se ao microambiente do tecido que está distante do tumor primário. A natureza heterogênea da metástase no câncer de mama dificulta não apenas a cura, mas também a estimativa dos fatores de risco. A disseminação das células tumorais é realizada através da circulação sanguínea sistêmica atingindo outros órgãos. Tem sido verificado que essas células utilizam-se da expressão dos receptores de quimiocinas, para encontrar órgãos alvo que produzem um particular conjunto de quimiocinas. Mais recentemente, foi estabelecido que as células do câncer aproveitam-se da sinalização através dos receptores para quimiocinas para a iniciação e progressão do tumor primário e da metástase. Embora grande número de moléculas tenha sido implicada na metástase do câncer de mama, o mecanismo exato que determina a direção da migração parece incerto. Tem sido demonstrado que CCL2 e CCL5 estão expressos em grande quantidade pelas células tumorais do câncer de mama e são a causa da malignidade e metástase neste órgão. A expressão dessas duas quimiocinas pelas células do tumor de mama acompanha eventos de transformação maligna, e está associada com o curso avançado e progressão da doença. Desse modo, vários estudos sugerem que a determinação e o prognóstico das quimiocinas CCL2 e CCL5 será de grande para uma melhor identificação do risco de progressão e determinação das implicações terapêuticas em pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama, metástase, quimiocina, CCL2 e CCL5.

SUMMARY - In Brazil, breast cancer is the major cause death among women with a risk of 51 cases to 100 thousand women. The metastasis, the main cause of death by breast cancer, is directed to a variety of vital organs such as bones, lungs, brain and liver. Occurs when genetically unstable tumor cells adapt to the microenvironment of the tissue that is distant from the primary tumor. The heterogeneous nature of metastasis in breast cancer is difficult not only for the definition of cure for this disease, but also to estimate their risk factors. The spread of tumor cells is achieved through the systemic bloodstream to reach other organs. It has been verified that these cells are used the expression of chemokine receptors to find on target organs that produce a particular set of chemokines. It was established that the cancer cells use the signaling through the receptors for chemokines in the initiation and progression of primary tumor and metastasis. Although large number of molecules has been implicated in metastasis of breast cancer, the exact mechanism that determines the direction of migration seems uncertain. In a review conducted recently, the authors argue that CCL2 and CCL5 are expressed in large amounts by tumor cells of breast cancer and are the cause of malignancy and metastasis in this organ. The expression of these chemokines by the tumor cells of breast accompanying events of malignant transformation, and is associated with the advanced course and progression of disease. Thus several studies suggest that the determination and validation of the prognostic value of the chemokines CCL2 and CCL5 will be of great value for better identification of risk of progression and determine the therapeutic implications in patients with breast cancer

INTRODUÇÃO

Keywords: Breast cancer, metastasis, chemokine, CCL2 and CCL5.

No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres, sendo que o número de novos casos de câncer de mama estimado para o ano de 2008 foi de 49.400, com um risco de 51 casos a cada 100 mil mulheres (Brasil¹⁴).

O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea. Aproximadamente 10 a 15% dos pacientes com câncer de mama têm uma doença

agressiva e desenvolve metástase à distância dentro de três anos depois da detecção inicial do tumor primário. No entanto, a manifestação dos sítios de metástase à distância depois de 10 anos ou mais não é incomum. Portanto pacientes com câncer de mama correm o risco de manifestação de metástase por toda vida. Anatureza

heterogênea da metástase no câncer de mama é dificultosa não apenas para a definição da cura para essa doença, mas também para estimar os fatores de riscos para metástase (Weigelt¹⁵).

Recebido em 25/07/2009 Aprovado em 10/03/2011

Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas, Laboratório de Genética Molecular-Imunologia, Universidade Estadual de Londrina, PR.

¹Farmacêutica-Bioquímica, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, UEL, ²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, UEL, ³Iniciação Científica, CNPq, Universidade Estadual de Londrina,

⁴Mestrado e Doutorado pela Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP. Pós-Doutorado em Imunologia pelo Hemocentro de Ribeirão Preto, USP, SP.

A metástase, principal causa de morte pelo câncer de mama, é dirigida a uma variedade de órgãos vitais, como ossos, pulmões, cérebro e fígado (Lu & Kang³⁴). A metástase ocorre quando células tumorais geneticamente instáveis adaptam-se ao microambiente do tecido que está distante do tumor primário. Esse processo envolve uma seleção de características que são vantajosas para células do câncer e concomitantemente recrutam caracteres do estroma tumoral que acomoda a invasão para as células metastáticas. (Gupta & Massagué²³).

A disseminação sistêmica de células tumorais é considerada um processo organizado, tendo em vista que certas malignidades têm tendências a metastizar para órgãos distantes específicos, sugerindo um papel crucial do microambiente do órgão para a localização e desenvolvimento de células metastáticas (Tait⁴⁴).

Lu e Kang³⁴ propuseram um modelo integrado de organotropismo na metástase do câncer de mama. Células progenitoras do câncer de mama são derivadas da transformação oncogênica de células progenitoras mamárias normais. As células do tumor primário devem desenvolver programas genéticos para o organotropismo na metástase ou permanecer no tecido primário ou adquirir habilidade metastática para tornar-se uma célula progenitora do câncer de mama. A disseminação das células tumorais do câncer de mama é realizada através da circulação sanguínea sistêmica atingindo outros órgãos. As células tumorais utilizam-se da expressão dos receptores de quimiocinas para encontrar órgãos alvo que produzem um particular conjunto de quimiocinas. Adicionalmente, a especificidade do órgão alvo é definida pela ligação das células tumorais às células endoteliais via um conjunto de moléculas de adesão.

As quimiocinas são uma família de citocinas próinflamatórias, e seus receptores regulam uma variedade de
respostas imunes nas infecções, inflamação e no reparo
tecidual. Além de controlarem o tráfego das células imunes, as
quimiocinas também regulam a migração de muitos tipos
celulares na embriogênese. Mais recentemente, foi
estabelecido que as células do câncer aproveitam-se da
sinalização através dos receptores para quimiocinas para a
iniciação e progressão do tumor primário e da metástase. Em
particular, a quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 são tão
importantes para o tumor primário e a metástase no câncer de
mama, assim como para outros tumores malignos nos pulmões,
cérebro e próstata (Lucker & Lucker²8).

Embora, grande número de moléculas tenha sido implicada na metástase do câncer de mama, o mecanismo exato que determina a direção da migração parece incerto. Para Zlotnik², pode-se explorar mais precisamente as implicações que a expressão dos receptores de quimiocinas podem apresentar em pacientes com câncer e a medida da expressão dos receptores de quimiocinas em amostras de tumores que tem o potencial de se tornar um biomarcador de relativa agressividade tumoral.

Valdivia-Silva²⁴ submeteram células da linhagem MCF-7 a um microambiente inflamatório usando as citocinas IL-

1, TNF- α , IL-6 e IFN- γ e demonstraram uma aumentada expressão de cinco receptores de quimiocinas (CXCR4, CXCR2, CCR9, CCR5 e CX3CR1), dependendo da citocina inflamatória usada na cultura, e observou aumentada migração aos respectivos ligantes para os receptores associados ao tumor.

A elevada expressão de CXCR4, VEGF e MMP-9 apresentou uma correlação significativa com fatores clinicopatológicos e o estado dos linfonodos em uma série de cânceres de mama de pacientes que passaram por cirurgia em trabalho realizado por Hao³¹. Ademais, as expressões concomitantes de duas dessas moléculas tiveram maior correlação com metástase nos linfonodos do que cada uma delas isoladamente, e a expressão combinada de todos os três marcadores mostraram-se fortemente relacionada com metástase nos linfonodos.

Em revisão realizada por Soria e Bem-Baruch²², os autores afirmam que CCL2 e CCL5 estão expressos em grande quantidade pelas células tumorais do câncer de mama e são a causa da malignidade e metástase neste órgão. A expressão dessas duas quimiocinas pelas células do tumor de mama acompanha eventos de transformação maligna, e está associada com o curso avançado e progressão da doença. CCL2 e CCL5 também estão expressas no

microambiente do tumor primário e em sítios metastáticos, desempenhando grande papel na promoção do estabelecimento do tumor e propagação da célula tumoral, levando à metástase. O presente trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão sobre o envolvimento das quimiocinas CCL2 e CCL5 na patogênese do câncer de mama. .

Quimiocinas

As quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes em 1992 após o Encontro Internacional de Imunologia em Budapest (Lindley³³). As quimiocinas constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, e apresentam similaridade com as citocinas, bem como diferenças claras. Assim, como as citocinas, as quimiocinas são proteínas secretórias produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto, as quimiocinas são muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete α-hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos (Baggiolini⁵).

Quimiocinas são constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (Baggiolini^{7,8}). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma seqüência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como e quimiocinas, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou são adjacentes (CC). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1 → Cys3 e Cys2 → Cys4), o que confere às

quimiocinas sua estrutura tri-dimensional. As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (Baggiolini⁶).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores se tornou necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação (Zlotnik & Yoshie⁵⁰) baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene. Enquanto que a nomenclatura sistemática tem sido adotada para os receptores, a maioria das quimiocinas ainda é distinguida por seus nomes tradicionais (Baggiolini⁶).

Em soluções concentradas, diversas quimiocinas se associam para formarem dímeros (Clore¹⁸, Baldwin⁹). A estrutura geral dos dímeros é diferente para quimiocinas CXC e CC. Originalmente, acreditava-se que interagiam com seus receptores através de mecanismos distintos, entretanto, descobriu-se que a tendência de formarem dímeros varia, e que algumas quimiocinas são sempre monoméricas, como a MCP-3 (Kim³⁰).

Câncer de mama é caracterizado por um padrão metastático distinto, envolvendo linfonodos, medula óssea, fígado e pulmão. A migração das células tumorais e metastáticas tem muita semelhança com o tráfego de leucócitos, que é regulado por quimiocinas e seus receptores (Muller ³⁶).

As quimiocinas podem influenciar indiretamente na angiogênese por modulação do recrutamento de leucócitos. No câncer de mama, células epiteliais cancerosas produzem fatores solúveis que induzem infiltração de células da linhagem monocítica que produzem um repertório de quimiocinas CXC (CXCL1, 2, 3, 5, 7 e 8) (Balkwill¹¹, Bottazzi¹³).

A permeabilidade vascular tem sido mostrada ser um preditor independente do estágio de patologia em muitos cânceres sólidos. Neovascularização é essencial para o crescimento de tumores acima de 1-2 mm. A angiogênese ocorre pela influência do perturbado e importante balanço entre fatores angiogênicos e angiostáticos (Ali³). A angiogênese está correlatada a elevada incidência de metástase e um período de sobrevivência menor (Kato²¹; Weidner⁴8).

A expressão dos receptores de quimiocinas pode definir subtipos de linfócitos T. Além disso, linfócitos T periféricos maduros expressam diferentes receptores de quimiocinas dependendo do seu fenótipo funcional. Por exemplo, células T helper 1 (Th1), que sintetizam interleucina-2 e interferon gama, e mediam a ativação de fagócitos, expressam CXCR3, CCR2 e CCR5. Linfócitos T helper 2 (Th2), que produzem interleucina-4, interleucina-5 e são mediadores da produção de anticorpos pelos linfócitos B, expressam CCR3, CCR4 e CCR2. Estas diferenças determinam, em parte, o tipo de resposta imune que irá se desenvolver em um sítio de inflamação (Sallusto⁴¹, Wallace⁴⁷).

Os macrófagos associados a tumores são importantes no desenvolvimento do câncer. Níveis elevados de

macrófagos nos tumores estão frequentemente relacionados com prognóstico ruim (Lin³²).

As quimiocinas constituem, portanto, uma superfamília de citocinas pró-inflamatórias que estão implicadas na progressão tumoral, modulando não apenas a resposta imunológica tumor-específica, mas também angiogênese ou ainda invasão e a proliferação de células tumorais (Baggiolini⁷, Rossi³⁹, Muller³⁶).

CCL2 e CCL5 em câncer de mama

A quimiocina normalmente expressa e secretada por célula T, cuja regulação é feita sob ativação denominada de RANTES (Regulated upon activation, normal T cell expressed and Secreted) é atualmente conhecida como CCL5 (ligante da quimiocina da família CC). Esta quimiocina é bem conhecida devido a sua atividade no contexto imunológico onde induzem a mobilização dos leucócitos. A quimiocina CCL2 (também denominada de MCP1) e CCL5 são atuantes principalmente nos processos inflamatórios estimulando a migração primária de monócitos e linfócitos para os locais de lesão tecidual ou inflamação (Zlotnik²). Esta quimiocina pode estar expressa constitutivamente em células não estimuladas.

As quimiocinas inflamatórias primariamente CCL2 (MCP-1) e também CCL5 (RANTES) promovem a migração de monócitos aos tumores (Ben-Baruch¹).

A CCL2 está presente tanto em células epiteliais cancerosas quanto em células do estroma, tais como macrófagos (Ueno⁴⁵, Saji⁴⁰) o qual está associado com o aumento do recrutamento de macrófagos associados ao tumor e neovascularização no câncer de mama (Chavey¹⁶, Saji⁴⁰, Balkwill¹⁰). A CCL2 está relacionado a atividade do endotélio portanto, é razoável especular o eixo CCL2/CCR2 pode afetar os componentes vasulares e estromais do tumor para fornecer benefícios ao paciente (Ali³).

Ueno *et al.*⁴⁵ evidenciaram a expressão de CCL2 correlacionada com VEGF, TNF-alfa e CXCL8 nas amostras de câncer de mama. Já Azenshtein *et al.*⁵ mostraram que CCL2 e CCL5 aumentam a secreção de CXCL8 em monócitos, mas não em células tumorais de mama.

A quimiocina CCL5 tem sido relacionada com a progressão de uma série de cânceres, podendo estar induzindo metástase no câncer de mama (Vaday⁴⁶).

Especificamente na mama, tem sido sugerido que CCL5 e CCL2 auxiliam na malignidade. Em pacientes com câncer de mama, parâmetros tais como doença avançada, recidiva precoce e prognóstico ruim são significativamente correlacionados com a elevada incidência e expressão dos níveis de cada uma das duas quimiocinas nas células tumorais, tanto em biópsias mamárias, como também no soro (Gall²¹). Além disso, resultados recentes indicam que, em pacientes com câncer de mama no estadiamento II, a CCL5 é um confiável e altamente significativo preditor da progressão da doença, especialmente quando combinada com a diminuição ou ausência de um receptor α de estrogênio (Yaal-Hahoshen⁴9), o qual é utilizada na clínica como um marcador para prognóstico ruim em câncer de mama (Gali²¹).

A evolução de cânceres de mama humanos é intimamente regulado por níveis de estrógenos (Dickson¹9). Em roedores, o estrogênio tem demonstrado diminuir significantemente os níveis de quimiocinas CCL2 e CCL3 em tecido mamário murino, e essa regulação é parcialmente anulada pelo co-tratamento com 4-hidroxitamoxifeno (antagonista estrogênico)* (Fanti²0).

Kanda *et al.*²⁵ realizaram a transfecção do receptor de estrogênio beta (ER-beta) em células SKBR3 e evidenciaram também a diminuição da regulação da atividade promotora de CCL2 na presença de estrogênios.

Robinson³⁸ demonstrou que animais inoculados com linhagens tumorais de mama apresentam uma produção de CCL5 elevada e os leucócitos infiltrados apresentam receptores CCR5. A administração de antagonista para este receptor nestes animais proporcionou regressão significativa no tamanho dos tumores, indicando uma participação direta da ativação da CCR5 com crescimento de tumores de mama.

Soria e Bem-Baruch²² estudaram o envolvimento das quimiocinas CCL2 e CCL5 em câncer de mama. Sabendose que células precursoras mesenquimais e osteoblastos do microambiente tumoral expressam CCL2 e CCL5, essas quimiocinas estão envolvidas no processo metastático em câncer de mama, as quais atuam diretamente sobre as células tumorais, promovendo o fenótipo maligno, atuando nas propriedades relacionadas ao aumento de migração e invasão destas células. Portanto, esses autores sugerem que CCL2 e CCL5 como mediadores inflamatórios com atividade prómaligna e devem ser considerados como alvo terapêutico em potencial.

Pinilla⁴³ mostrou, pela primeira vez, que as células tronco mesenguimais, derivadas do tecido adiposo humano. podem estimular as células do câncer de mama pela secreção da quimiocina CCL5 e, desse modo, promover a migração e invasão das células do câncer. No entanto, Yaal-Hahoshen⁴⁹ demonstraram que, em pacientes diagnosticados no estadiamento I do câncer de mama, o CCL5 não tem um valor preditivo para progressão da doença. Ao contrário, em pacientes no estadiamento II, a expressão de CCL5 em células tumorais da mama deve ser considerada como um marcador potencial preditivo da progressão da doença e a análise combinada com a ausência de receptor de estrogênio α (ER-α) melhora o valor prognóstico de cada uma dessas proteínas. especialmente em pacientes diagnosticados no estadiamento II da doença. Além disso, esses autores sugerem que um resultado favorável para os pacientes do estadiamento II deve ser predito em indivíduos que são negativos para a expressão de CCL5, porém positivos para ER-α ou receptor de progesterona (PR).

Trabalho realizado por Eissa⁵, sobre os níveis de IL-18 e CCL5 no soro de pacientes portadores de câncer de mama, demonstrou aumento significativo no nível de IL-18 no soro de pacientes com câncer de mama quando comparado ao grupo controle. Este aumento também foi observado com elevada diferença entre o grupo de pacientes com metástase e sem metástase. O nível de CCL5 encontrado nesse estudo foi significativamente maior em pacientes com câncer sem

metástase em relação ao grupo controle e muito mais elevado em casos de pacientes com metástases quando comparado ao grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa no nível de CCL5 na comparação entre pacientes com metástase e não metástase no câncer de mama, não podendo, dessa forma, ser assegurada a sua função no grau da progressão e metástase do câncer de mama.

Diante de vários estudos sobre a contribuição de CCL5 como fator crítico na progressão do câncer de mama, Jayasinghe *et al.*³⁵ usaram RNA de interferência para modular CCL5 no tumor 4T1 e um transgene CCL5 para induzir a expressão em 168 tumores. Através das análises, seis clones de 4T1 com diminuída expressão de CCL5 e três clones de 168 com expressão aumentada de CCL5 foram avaliados em alterações na taxa de crescimento, expressão de MHC e habilidade de metástase. Foi verificado que a modulação da expressão de CCL5 não influenciou significativamente na progressão da doença.

Gali et al.²¹ demonstraram que a co-expressão de CCL5 e CCL2 no mesmo tumor foi associado com estágios mais avançados da doença, sugerindo que tumores mamários se "beneficiam" a partir de interações entre as duas quimiocinas. Foi verificado também que a CCL2 promoveu significativamente a liberação de CCL5 em um processo ativo que dependia de fontes de cálcio intracelulares e extracelulares.

CONCLUSÃO

Um novo paradigma considera a inflamação crônica, dirigida em parte por quimiocinas e citocinas no local do tumor, um facilitador da progressão tumoral, em vez de um promotor de imunidade antitumoral. Diversas moléculas, dentre as quais se destacam as quimiocinas e seus respectivos receptores, vêm sendo estudas para uma melhor compreensão da patogênese do câncer. Recentes estudos demonstraram que a quimiocina CCL5 possui valor significativo para a predição da progressão do câncer de mama. Achados atuais também levantam a possibilidade de que a análise conjunta de CCL5 e CCL2 possa aprimorar o valor prognóstico para essa patologia. Desse modo, vários estudos sugerem que a determinação e a validação do valor prognóstico das quimiocinas CCL2 e CCL5 será de grande valor para uma melhor identificação do risco de progressão e determinação das implicações terapêuticas em pacientes com câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- 1. A. Ben-Baruch. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. Seminars in Cancer Biology 16 (2006) 38–52. 2. Albert Zlotnik. Chemokines and cancer. Int. J. Cancer: 119, 2026–2029 (2006).
- $3.\,Ali,\,S.,\,\&\,Lazennec,\,G\,(2007).\,Chemokines:\,novel\,targets\,for\,breast\,cancer\,metastasis.\,Cancer\,and\,Metastasis\,Reviews,\,26,\,401-420.$
- 4. Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Taylor Murray, Jiaquan Xu and Michael, J. Thun. Cancer Statistics, 2007 CA Cancer J Clin 2007;57;43-66.
- 5. Azenshtein, E., Meshel, T., Shina, S., Barak, N., Keydar, I., & Ben-Baruch, A. (2005). The angiogenic factors CXCL8 and VEGF in breast cancer: Regulation by an array of pro-malignancy factors. Cancer Letters, 217, 73–86.
- 6. Baggiolini, M. Chemokines in pathology and medicine. Journal of Internal Medicine 250:91-104. 2001.
- 7. Baggiolini, M.; Dewald, B.; Moser, B. Human chemokines: an update. Annual Review of Immunollogy 15:675-705, 1997.
- 8. BAGGIOLINI, M.; Dewald, B.; Moser, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines. Adv. Immunol. 55:97-179, 1994.

- 9. Baldwin, E.T.; Weber, I.T.; St Charles, R.; Xuan, J.C.; Appella, E.; Yamada, M.; Matsushima, K.; Edwards, B.F.; CLORE, G.M.; Gronenborn, A.M. Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. Proc Natl Acad Sci USA88:502-6, 1991.
- 10. Balkwill, F. R., & Burke, F. (1989). The cytokine network. Immunology Today, 10, 299–304.

 11. Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet, 357, 539–545.
- 12. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnk, A., Schall, T.J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C. Nature 385:640-644, 1997.
- 13. Bottazzi, B., Polentarutti, N., Acero, R., Balsari, A., Boraschi, D., Ghezzi, P., (1983). Regulation of the macrophage content of neoplasms b y chemoattractants. Science, 220, 210–212.
- 14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2007.
- 15. Britta Weigelt*, Johannes L. Peterse‡ and Laura J. van 't Veer. Breast Cancer Metastasis: Markers And Models. Nature reviews. Volume 5 | August (2005) 591-602.
- 16. Chavey, C., Bibeau, F., Gourgou-Bourgade, S., Burlinchon, S., Boissiere, F., Laune, D., et al. (2007). Estrogen-receptor negative breast cancers exhibit a high cytokine content. Breast Cancer Research. 9. R15.
- 17. Clark-Lewis, I.; Kim, K.S.; Rajarathnam, K.; Gong, J.H.; Dewald, B.; Moser, B.; Baggiolini, M.; Syke, B.D. Structureactivity relationships of chemokines. J Leukocyte Biol 57:703-11,
- 18. Clore, G.M.; Appella, E.; Yamada, M.; Matsushima, K.; Gronenborn, A.M. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. Biochemistry 29:1689-96I, 1990.
- 19. Dickson, R. B., & Lippman, M. E. (1995). Growth factors in breast cancer. Endocrine Reviews.
- 20. Fanti P, Nazareth M, Bucelli R, Mineo M, Gibbs K, Kumin M, Grzybek K, Hoeltke J, Raiber L, Poppenberg K, Janis K, Schwach C, Aronica SM. Estrogen decreases chemokine levels in murine mammary tissue: implications for the regulatory role of MIP-1 alpha and MCP-1/JE in mammary tumor formation. Endocrine (2003) 22(2):161-8
- 21. Gali Soria, Neora Yaal-Hahoshen, Elina Azenshtein, Sima Shina, Leonor Leider-Trejo, Larisa Ryvo, Efrat Cohen-Hillel, Alex Shtabsky, Marcelo Ehrlich, Tsipi Meshel, Iafa Keydar, Adit Ben-Baruch. Concomitant expression of the chemokines RANTES and MCP-1 in human breast cancer: A basis for tumor-promoting interactions. Cytokine 44 (2008) 191–200.
- 22. G. Soria, A. Ben-Baruch. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. Cancer Letters 267 (2008) 271–285.
- 23. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. Cell 2006;127 4:679-95.
- 24. J.E. Valdivia-Silva Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer:Implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis, Cancer Lett. (2009).
- 25. Kanda, N.,&Watanabe, S. (2003). 17Beta-estradiol inhibitsMCP-1 production in human keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology, 120, 1058–1066.
- 26. Karlmark KR, Wasmuth HE, Trautwein C, Tacke F. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2008 Apr;2(2):233-42.
- 27. Kato, T., Kameoka, S., Kimura, T., Nishikawa, T., & Kobayashi, M. (2003). The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. British Journal of Cancer, 88, 1900–1908.
- 28. K.E. Luker, G.D. Luker . Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. Cancer Letters. 238 (2006) 30–41.
- 29. Kennedy, J.; Kelner, G.S.; Kleyensteuber, S.; Schall, T.J.; Weiss, M.C.; Yssel, H.; Schneider, P.V.; Cocks, B.G.; Bacon, K.B.; Zlotnik, A. A molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. J Immunol 155:203-9, 1995.
- 30. Kim, K.S.; Rajarathnam, K.; Clark-Lewis, I.; Sykes, B.D. Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3. FEBS Lett 395:277-82, 1996.
 31. L. Hao et al. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node
- metastasis in human breast cancer. Cancer Letters 253 (2007) 34–42.
 32. Lin, E. Y., & Pollard, J. W. (2004). Macrophages: Modulators of breast cancer progression. Novartis Foundation Symposium, 256, 158–168; discussion 168–172, 259–269.
- 33. Lindley, I.J.D.; Westwick, J.; Kunkel, S.L. Nomenclature announcement the chemokines. Immunol Today 14:24, 1993.

- 34. Lu, X.; Kang, Y. Organotropism of Breast Cancer Metastasis. J Mammary Gland Biol Neoplasia (2007) 12:153–162.
- 35. Mevan M. Jayasinghe; Jacqueline M. Golden; Priyanka Nair Æ Cara M. O'Donnell Æ Michael T. Werner Æ Robert A. Kurt Tumor-derived CCL5 does not contribute to breast cancer progression Breast. Cancer Res Treat (2008) 111:511–521.
- 36. Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., Barrera J.L., Mohar A., Verastegui E., Zlotnik A., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, 410:50-56, 2001.
- 37. Neora Yaal-Hahoshen, Sima Shina, Leonor Leider-Trejo, Itay Barnea, Esther L. Shabtai, Elina Azenshtein, Iulia Greenberg, Iafa Keydar, and Adit Ben-Baruch. The Chemokine CCL5 as a Potential Prognostic Factor Predicting Disease Progression in Stage II Breast Cancer Patients. Clin Cancer Res 2006;12(15) August 1, 2006
- 38. Robinson SC, Scott KA, Wilson JL, Thompson RG, Proudfoot AE, Balkwill FR.; A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. Cancer Res. 2003 Dec 1;63(23):8360-5.
- 39. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000:18:217–42.
- 40. Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K., & Toi, M. (2001). Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. Cancer, 92, 1085–1091.
- 41. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J Exp Med. 1998;187(6):875-83.
 42. Soheir, A.L. Eissa, M.D.; Samar A. Zaki, M.D.; Shereen M. El-Maghraby, M.D. and Dallia Y. Kadry, M.D. Importance of Serum IL-18 and RANTES as Markers for Breast Carcinoma
- Progression. Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst., Vol. 17, No. 1, March: 51-55, 2005. 43. S. Pinilla et al., Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion, Cancer Lett. (2009).
- 44. Tait, C. R., Waterworth, A., Loncaster, J., Horgan, K., & Dodwell, D. (2005). The oligometastatic state in breast cancer: Hypothesis or reality. Breast, 14, 87–93.
- 45. Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. Clinical Cancer Research, 6, 3282–3289.
- 46. Vaday G.G., Peehl D.M., Kadam P.A., Lawrence D.M. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. Prostate. 2006 Feb 1:66(2):124-34.
- 47. Wallace GR, John Curnow S, Wloka K, Salmon M, Murray PI. The role of chemokines and their receptors in ocular disease. Prog Retin Eve Res. 2004; 23(4):435-48.
- 48. Weidner, N., & Folkman, J. (1996). Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer. In V. T. Devita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (Eds.), Important advances in oncology (pp. 167–190). Baltimore: Lippincott.
- 49. Yaal-Hahoshen N, Shina S, Leider-Trejo L, Barnea I, Shabtai EL, Azenshtein E, The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients. Clin Cancer Res 2006;12:4474–80.
- 50. Zlotnik, A.; Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity (2000) 12:121-7.
- 50. Zlotnik, A.; Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity (2000) 12:121-7.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Maria Angelica Ehara Watanabe (PhD), Professor Associado, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

Telephone/Fax: +55-43-3371-5728 E-mail: maewat@sercomtel.com.br

maewat@uel.br

Influência da alimentação sobre o hemograma*

Influence of feeding in hemogram

Lia Yuki Tomoeda¹, Everson Augusto Krum², Giovani Marino Favero², Railson Henneberg³

RESUMO - Os exames laboratoriais são susceptíveis a variáveis pré—analíticas, analíticas e pós-analíticas. O hemograma é um dos exames pedidos com maior freqüência na clínica médica, porém, ainda é controversa a necessidade do jejum para sua realização. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento dos diversos parâmetros hematológicos avaliados no hemograma em dois períodos distintos, jejum e pós-prandial. Para tanto foram realizadas contagens em aparelho hematológico marca Coulter T-890 para avaliação das possíveis variações no eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas. Demonstrou-se que no período pós-prandial existe um aumento da contagem de leucócitos, provavelmente devido a uma re-orientação destas células do pool marginal para o pool circulante. No grupo feminino, observou-se diminuição na contagem de hemácias, na concentração de hemoglobina e no hematócrito, o que não foi estatisticamente significante para o grupo masculino. A contagem de plaquetas não apresentou diferenças entre os dois períodos estudados. As variações encontradas entre os dois períodos não foram suficientes para a mudança da interpretação clínica do exame, porém, é de suma importância o conhecimento da influência que a ingestão alimentar pode causar nos parâmetros analisados pelo hemograma.

Palavras-chave: hemograma, alimentação, contagem de células.

SUMMARY - A number of factors may affect hematologic measurements. Hemogram is one of the most requested clinical assays in medicine, but overnight fasting is still controversy. The aim of this work is to verify the influence of overnight fasting versus post prandial in the hematological parameters. We have made cell counts with automated hematology analyzer to observe abnormalities in hemogram. After post prandial period we have found increased in white blood cell (WBC), probably due to a shift of leukocytes from the marginal pool to circulating pool. About gender, female have decreased red blood cells (RBC) count, hemoglobin and hematocrit. There is no significantly difference in platelet count between fasting and after lunch. The fluctuations in cells counts for fasting and post-prandial are not fundamental to change the diagnostic interpretation, but is mandatory the knowledge about the influence of food ingestion may cause in hemogram parameters. **Keywords:** hemogram, food ingestion, cells count.

INTRODUÇÃO

O hemograma é um dos exames laboratoriais mais solicitados na clínica, devido à grande quantidade de informações que fornece, pela facilidade de sua realização e custo relativamente baixo. Atualmente as determinações que compõe o hemograma são realizadas em minutos, em instrumentos semi-automatizados ou automatizados, com modificações das técnicas manuais ou tecnologias completamente novas¹.

Como a maioria dos testes laboratoriais, o hemograma avalia as condições fisiológicas em que se encontra certo indivíduo em um determinado momento. Quando os valores encontrados estão acima ou abaixo dos valores de referência, o resultado é considerado anormal, possibilitando ou não confirmar uma condição patológica. Na prática, porém, existem condições onde os resultados de testes laboratoriais não se enquadram nos limites definidos como referência normal, e nem por isto o paciente apresenta uma condição patológica. As razões para que isto ocorra, podem ser divididas em três grupos: fatores pré-analíticos, fatores metodológicos e fatores pós-analíticos.

Conforme alguns autores⁷, variáveis préanalíticas podem ser agrupadas em três categorias: fisiológica, coleta de amostras e fatores interferentes. Dentre os principais fatores pré-analíticos que interferem significativamente no resultado final estão incluídos as condições do indivíduo, o processo de coleta da amostra e sua manipulação¹¹, o exercício anterior a realização do exame, o jejum prolongado, a dieta, o uso de álcool, o tabagismo, drogas, postura, aplicação incorreta de torniquete.

Com relação aos efeitos biológicos (*in vivo*) após uma refeição estão incluídos aumento no potássio e triglicerídeos plasmáticos. Duas a quatro horas após consumir uma refeição rica em gorduras, muitos indivíduos têm um aumento significativo em fosfato alcalino, ou seja, primariamente um aumento da isoenzima intestinal. Uma dieta de carne altamente protéica resulta no aumento de uréia plasmática, amônia e uratos, entretanto não significa um aumento da creatinina sérica⁹. Sabe-se, por exemplo, que a alimentação, o exercício, a apreensão, o medo, a taquicardia, produzem uma leucocitose de maior ou menor intensidade, dependendo de diversos fatores⁴. Outros trabalhos descrevem a existência de leucocitose fisiológica em condições de esforço muscular ou nos períodos pós-prandiais^{8,3}.

Estando um indivíduo em condições basais, ou seja, em repouso físico e psíquico, em jejum de 8 horas e em ambiente de neutralidade térmica, o número de leucócitos está em torno de 7.000 elementos/mm³ de sangue. Essa cifra se mantém constante graças a mecanismos de regulação tipo feedback negativo, que controlam tanto o fluxo de entrada como o de saída dos leucócitos do sangue³.

Devido ao hemograma ser uma análise tão presente na rotina laboratorial, todas as influências que este exame pode sofrer devem ser conhecidas, para que a sua interpretação seja

Recebido em 21/10/2008 Aprovado em 28/02/2011

¹ Farmacêutica-Bioquímica – Laboratório Sugisawa – Curitiba – Paraná

² Professor Adjunto – Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

³ Professor Ássistente – Universidade Federal do Paraná – UFPR

a mais correta possível. Portanto, o estudo da influência da ingestão alimentar sobre os parâmetros do hemograma é de suma importância, o que justifica a realização do presente trabalho.

MATÉRIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados 31 indivíduos, sendo 19 do grupo feminino (61,2%) e 12 do grupo masculino (38,8%), maiores de 18 anos de idade, residentes na cidade de Curitiba e região. atendidos no Laboratório Sugisawa de Curitiba-PR. As análises foram realizadas em período de ieium (mínimo 8 horas) e 2 horas após o almoco. Para o presente estudo as refeições foram preparadas especialmente para a pesquisa, com padronização do valor nutricional da refeição, com valor calórico em torno de 1400 calorias, composta de carboidratos (55 a 60%), proteínas (em torno de 15%) e lipídeos (25 a 30%). Os participantes da pesquisa foram incluídos após entrevista, autorização fornecida através termo de consentimento livre e esclarecido, para então obtenção de dados referentes a idade, sexo, tabagismo, período menstrual, uso de medicamentos. O material biológico (sangue) coletado em K3 EDTA foi submetido a contagem automatizada em aparelho hematológico marca Coulter T 890, onde foram obtidos dados de contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, VCM, HCM, CHCM contagem de leucócitos e contagem de plaquetas. Os dados foram reportados como média (mais/menos) e desvio-padrão (EP) (tabelas 1). A análise estatística foi feita pelo teste t, considerando-se um valor de p > 0,05 como indicativo de diferença estatística significante.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados de todos os grupos formados neste trabalho. Estão demonstradas as médias de todos os parâmetros do hemograma dos grupos feminino e masculino, tanto em jejum como pós-prandial. Em destaque, estão os parâmetros que estatisticamente apresentaram diferenças significativas (p>0,05).

Conforme mostrado nas figuras 1 e 2, a contagem de leucócitos apresentou diferenças estatísticas significantes (p>0,05) comparando-se o período de jejum e o período pósprandial, tanto no grupo feminino quanto no masculino. Tanto o eritrograma quanto a contagem de plaquetas do grupo masculino não apresentou variação significativa nos dois períodos (tabela 1).

O grupo feminino divergiu quanto à análise do eritrograma, quando comparado com o grupo masculino. Houve variações na contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e determinação do hematócrito entre os dois períodos de estudo. A tabela 1 mostra as médias e o desvio-padrão destes parâmetros, sendo estas diferenças significativas (figuras 3,4). Quanto aos índices eritrocitométricos e a contagem de plaquetas, estes parâmetros não apresentaram variações de destaque entre o período de jejum e o pós-prandial (tabela 1).

DISCUSSÃO

Todos os esforços devem ser feitos para minimizar os efeitos das variáveis pré-analíticas em ensaios diagnósticos. O conhecimento dos efeitos do exercício físico, da ansiedade, do fumo, de medicamentos e outros produtos interferentes, é

Contagem de leucócitos(/mm³)

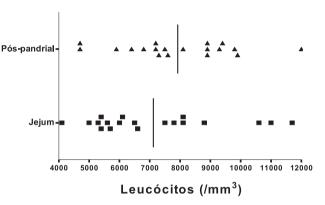


Figura 1 – Contagem de leucócitos – Grupo feminino

Tabela 1 - Valores de Média, EP dos Parâmetros do Hemograma

PARÂMETRO	FEM/JEJUM	FEM/PÓS-PRANDIAL	MASC/JEJUM	MASC/PÓS-PRANDIAL
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	4,61 ± 0,121*	4,46 ± 0,091*	$5,03 \pm 0,0772$	$4,96 \pm 0,0987$
HGB (g/dL)	13,7 ± 0,170*	$13,3 \pm 0,171*$	15.8 ± 0.209	$15,6 \pm 0,292$
HCT (%)	41,8 ± 0,716*	40,7 ± 0,527*	$46,5 \pm 0,698$	$46,0 \pm 0,870$
VCM (fL)	$91,1 \pm 1,089$	$91,4 \pm 1,060$	$92,5 \pm 0,796$	$92,8 \pm 0,951$
HCM (pg)	$30,1 \pm 0,616$	$30,1 \pm 0,5206$	$31,4 \pm 0,2706$	$31,4 \pm 0,3153$
CHCM (g/dL)	$32,9 \pm 0,407$	$32,8 \pm 0,2616$	$33,9 \pm 0,1131$	$33,9 \pm 0,1365$
Leucócitos (/mm³)	7.121 ± 494,4*	7.921 ± 423,0*	6.883 ± 447,4*	7.583 ± 537,1*
Plaquetas (/mm³)	232.368 ± 11134	227.631 ± 9379	231.166 ± 11128	239.083 ± 10483

Contagem de leucócitos(/mm³)

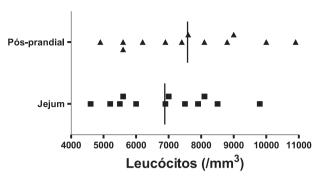


Figura 2 – Contagem de leucócitos – Grupo masculino

Contagem de leucócitos(10⁶/mm³)

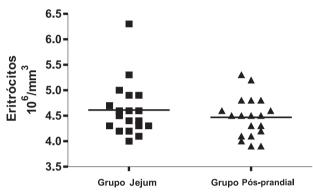


Figura 3 – Contagem de Eritrócitos(10/mm3) nos dois períodos - A linha horizontal representa a média dos valores obtidos.

Concentração de Hemoglobina(g/d\L)

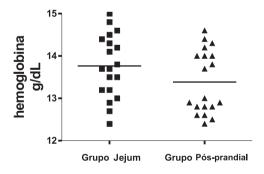


Figura 4 – Concentração de hemoglobina(g/dL) – A linha horizontal representa a média dos valores obtidos.

fundamental para evitar que os resultados do hemograma tenham valores discrepantes⁵. Dentre os principais fatores que podemos destacar incluem a imprecisão analítica, mudanças no estado do indivíduo, fatores endógenos que influenciam o controle biológico, estresses exógenos originados do ambiente externo e as atividades assumidas pelo indivíduo entre as coletas das amostras⁶. Sendo o hemograma um dos exames clínicos mais pedidos, o laboratório deve possuir procedimentos rígidos para assegurar ao máximo a fidelidade dos resultados encontrados, bem como, estabelecer todas as variáveis que

possam influenciar este ou aquele parâmetro analisado neste exame. Portanto, o laboratório clínico deve ter controle sobre todos os aspectos técnicos e fatores relacionados ao paciente para minimizar estas variáveis sobre o resultado final do exame. Para a maioria dos exames realizados na rotina laboratorial, a solicitação de jejum por parte do paciente é muitas vezes decorrente da percepção que a ingestão alimentar acarreta possível alteração ao analito e/ou dosagem a ser determinada. Quanto ao hemograma, ainda é motivo de controvérsia a exigência ou não de jejum, podendo prejudicar a interpretação das diversas informações fornecidas. Na interpretação de resultados alterados, acima ou abaixo dos valores de referência, deve se tomar cuidado quanto a etiologia patológica. fisiológica ou relacionada a outros fatores, como por exemplo, a influência que a alimentação possa ter sobre o resultado final daquele determinado exame, sendo assim, o estudo deste fator pré-analítico (alimentação) torna-se obrigatório para a melhoria da interpretação dos resultados do hemograma.

Em nosso estudo verificou-se um aumento do número de leucócitos no período pós-prandial quando comparados com o período em jejum, tanto para os pacientes do sexo masculino quanto sexo feminino. Esta elevação de leucócitos foi observada anteriormente^{8,3}, com relato da presença de leucocitose fisiológica em condições como esforço muscular (exercício) ou nos períodos pós-prandiais.

Para tentar explicar a etiologia da leucocitose, é sugerido que o aumento seria consegüência de reorientação da população de leucócitos, com passagem de células do compartimento sanguíneo marginal para o compartimento sangüíneo circulante. Considerando que os leucócitos constituem a primeira linha de defesa do organismo, desta forma, em poucos minutos ou em poucas horas aumentam em número no sangue periférico, de forma reacional, frente a grande variedade de estímulos. A maioria dos estímulos fisiológicos, tais como atividade física, estresse emocional, exposição aos extremos de temperatura, que induzem leucocitose neutrofílica parece exercer sua ação pela liberação da epinefrina⁸. Alguns estudos indicam que podem ocorrer variações pequenas durante o dia, mesmo com atividade física comum, porém estas alterações no número de leucócitos seriam insuficientes para elevar a níveis semelhantes aos encontrados em patologias que apresentam leucocitose⁵.

Os leucócitos existentes no sangue venoso, que são os habitualmente contados na leitura do hemograma, representam apenas a população circulante destas células e não indicam, necessariamente, o que ocorre com a população dos leucócitos marginais. A primeira forma de leucocitose decorre da migração de células da população marginal para a população em circulação, Isto é observado após a administração de adrenalina e após exercícios extenuantes. Constitui uma "pseudo neutrofilia", pois não há realmente uma modificação do número total de neutrófilos⁶. Este fenômeno explicaria o aumento do número de leucócitos, visto em todos os grupos estudados (masculino, feminino), porém, sem na maioria dos casos, suficiente para elevar as contagens acima dos valores de referência. Em nosso estudo, dos 31 indivíduos estudados, apenas cinco tiveram elevação da contagem de leucócitos acima de 10.000/mm3 (16%) no período pós-prandial, portanto na maioria das vezes, o aumento no número de leucócitos não é suficiente para alterar a interpretação do leucograma.

Em relação à série vermelha, um aspecto que deve ser levado em conta quando da interpretação do eritrograma é a

possível variação do volume plasmático, pois existem circunstâncias diversas que podem causar falsos aumentos ou diminuições por hemoconcentração ou hemodiluição, respectivamente. Entre as situações que podem provocar a queda do volume plasmático estão a desidratação, transtornos intestinais e acidose diabética enquanto que o aumento do volume plasmático pode ocorrer na gravidez, em algumas anemias carenciais, na insuficiência renal e no ortostatismo. por exemplo². Em nosso estudo, as contagens de hemácias, dosagens de hemoglobina e valor do hematócrito, tiveram diferenças estatísticas significativas, quando da comparação do ieium com o período pós-prandial no grupo feminino (tabela 1 e gráficos 3.4). Esta diferenca poderia ser explicada em parte pelo processo de hemodiluição, onde há aumento do volume plasmático. Porém, não está claro, que durante o dia, pela posição ortostática, atividade física ou outra condição a que possamos estar sendo submetidos, possam igualmente causar certo grau de diluição nas contagens sangüíneas, principalmente porque o grupo masculino não apresentou o mesmo comportamento (Tabela 1). Por isto é necessário mais estudos sobre esta variação ou aumentar o número de indivíduos estudados, onde em nosso estudo, esse número foi de 19 pessoas (grupo feminino). Não houve variação significativa na contagem de plaquetas nos dois períodos estudados em todos os grupos (feminino e masculino), o que demonstra que esta contagem pode ser realizada sem a obrigatoriedade de respeito a um horário específico. A principal diferença encontrada em nosso estudo foi o aumento de leucócitos no período pós-prandial, porém, esta elevação não foi suficiente a ponto de elevações que possam gerar erros diagnósticos em relação a uma leucocitose patológica. Em apenas 16 % dos casos, o número de leucócitos foi superior a 10.000/mm3. Quanto a diminuição na dosagem de hemoglobina, demonstrada no grupo feminino no período pósprandial, em nenhum dos casos houve mudança suficiente para diminuir a concentração de hemoglobina abaixo de 12 g/dL, o que é preconizado pela OMS como diagnóstico de anemia em mulheres.

Apesar das diferenças estatísticas encontradas nas contagens de leucócitos e no eritrograma dos grupos feminino, as elevações ou diminuições encontradas, respectivamente, não foram suficientes para mudar uma possível leitura clínica do hemograma. Importante destacar a necessidade de mais estudos sobre o assunto, pois encontramos dados controversos, como a variação no eritrograma do grupo feminino, que não foi observada no grupo masculino, talvez pelo pequeno número de indivíduos estudados.

CONCLUSÃO

Pelos resultados encontrados em nosso estudo, apesar das variações existentes, principalmente na contagem de leucócitos, demonstra-se que na prática clínica, existem várias razões para que o hemograma possa ser feito a qualquer hora, antes ou depois da alimentação. Dentre estas razões podemos destacar: (a) mesmo nos casos de leucocitose com alimentação, a variação é pequena e diversa de indivíduo para indivíduo (b) em grande número de casos, o exame hematológico é pedido com a finalidade de auxílio diagnóstico em casos em que o doente está febril. Desse modo, a urgência do exame e a tensão nervosa dos familiares, não permitem que se espere o dia seguinte para a colheita do material em jejum, (c) as modificações existentes normalmente no hemograma, relacionadas com a alimentação são pequenas quando comparadas com as produzidas pelos processos tóxicos ou infecciosos. (d) em se tratando de processos do aparelho hematológico propriamente dito, como por exemplo, as leucemias, anemias hemolíticas, anemias constitucionais, não é o fato de colher o exame em jejum ou não que irá alterar o diagnóstico ou produzir resultados diferentes. Nosso estudo demonstra que a alimentação não é fator suficiente para alterar a avaliação clínica do hemograma, principalmente em condições como neoplasias hematológicas respostas a quadros infecciosos, porém o clínico deve estar ciente da influência que a ingesta alimentar possui sobre os dados hematológicos avaliados no hemograma.

REFERÊNCIAS

- 1 BAIN, B.J. Células Sangüíneas. 3° ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- 2 CORRONS, J. Introducción al studio de la anemia. Aspectos generales del diagnóstico. In: J.Sans-Sabrafen. Hematologia Clinica. Mosby/Doyma Libros. Madri, 1994.
- 3-DOUGLAS, C. Tratado de fisiologia aplicado na saúde. 5. ed. São Paulo: Robe, 2002
- 4 JANINI, P. Interpretação Clínica do Hemograma. 10 ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- 5-LEE, G.; WINTROBE, M. Wintrobe Hematologia Clínica. São Paulo: Manole, 1998.
- 6 OLIVEIRA, P. Introdução à fisiopatologia da granulocitopoiese; as neutropenias e a agranulocitose. IN: Oliveira, P.H. Hematologia Clinica. Cap.XIII (253-258), Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Atheneu, 1990.
- 7 PEREIRA, J.; SILVA, C.; PORTO, L. Comparação entre valores obtidos na análise dos exames realizados em amostras de sangue transportadas por motocicletas e automóvel, para validação destes meios de transporte. J. Brasileiro Pat; 37(2): 93-7, abr-jun, 2001.
- 8- SACHER, R.; MCPHERSON, R.; CAMPOS, J. Widmann interpretação clínica de exames laboratoriais. Barueri: Manole, 2002.
- 9 STATLAND, B. Interpretando os resultados laboratoriais: Valores de referência e Tomada de Decisões. In: In: John Bernard Henry. Diagnósticos Clínicos & Tratamento. Cap. 4 , 18. ed., Manole, 1995, p. 79-82.
- 10 VIEIRA, D.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, M.; BARRETO, O. Correção da interferência dos triglicerídeos na dosagem da hemoglobina e na determinação dos índices hematimétricos. Revista Inst. Adolfo Lutz, 61(1): 39-43, 2002.
- 11- VIEIRA, J. Avaliação dos potenciais problemas pré-análiticos e metodológicos em dosagens hormonais. Arq. Brás. Endocrinol. Metab. v. 46, n. 1, Fevereiro, 2002, p. 9-10.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Professor Railson Henneberg Avenida Lothario Meissner, 900 – Jardim Botânico Curitiba - Paraná

Telefone: (41) 3360 - 4084

railson@ufpr.br

Diagnóstico laboratorial da dengue: Situação atual e perspectivas*

Dengue Laboratory Diagnosis: Actual Situation and Perspectives

André S. de Oliveira¹, Nina R. Dutra², Eliziária C. dos Santos³, Marília B. de Paula⁴, Leandro L. de Oliveira⁵, Eduardo de A. Margues⁶, Sérgio O. de Paula^{7*}

RESUMO - O diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue é baseado, em grande parte dos casos, apenas exame clínico do paciente, já que somente alguns poucos grandes centros possuem laboratórios clínicos que disponibilizam testes diagnósticos para confirmar sintomas clínicos de infecção. Atualmente, o diagnóstico laboratorial da dengue pode ser feito por diferentes tipos de testes. Entre eles estão os métodos de pesquisa sorológica, de isolamento viral, de detecção de antígenos virais e do genoma viral. O desenvolvimento continuado de testes diagnósticos baratos, sensíveis, específicos e de fácil execução, que sejam capazes de proporcionar diagnóstico precoce da infecção pelos vírus da dengue, é ainda uma necessidade. Existem também outros obstáculos que não são especificamente relacionados ao desenvolvimento tecnológico dos métodos diagnósticos. Por exemplo, a infra-estrutura dos laboratórios, o treinamento do pessoal técnico e a capacidade de pesquisa ainda são limitados em muitas partes do Brasil e do mundo, onde a dengue é endêmica. Laboratórios clínicos, principalmente os que atendem às regiões de maior incidência da dengue, devem se interar de todos os métodos diagnósticos disponíveis para a rotina atualmente e definir qual se adapta melhor às suas condições de trabalho e população atendida, com o intuito de salvar vidas.

Palavras-chave: Dengue, Diagnosis, Clinical laboratory.

SUMMARY - The diagnosis of the infection caused by the dengue virus relies in most cases on the clinical examination of the patient, since only a few major centers have clinical laboratories providing diagnostic tests to confirm the clinical symptons of infection. Currently, routine laboratory diagnosis can be done by different kinds of testing. Among them the methods of serological research, virus isolation, detection of viral antigens and of viral genome are included. The continued development of diagnostic tests that are cheap, sensitive, specific, easy to perform, and that are capable of giving early diagnosis of the dengue virus infection is still a need. There are also other obstacles not specifically related to the technological development of diagnostic methods. For instance, the laboratories' infrastructure, the workers training and the research capacity are still limited in many parts of Brazil and the world, where dengue is endemic. Clinical laboratories, specially those situated in regions with high incidence of dengue, should be aware of all the diagnostic methods available four routine nowadays, and choose the best one that fulfills their working conditions and populations served, in order to save lives.

Keywords: Dengue, Diagnosis, Clinical laboratory.

INTRODUÇÃO

A dengue é mundialmente a doença mais importante causada por um arbovírus, e apresenta especial importância nas regiões tropicais e sub-tropicais do planeta. É causada por um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV), classificados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os DENV são RNA vírus, pertencentes ao gênero Flavivirus da família Flaviviridae, e seus principais vetores de transmissão são os artrópodes do gênero Aedes, principalmente o Aedes aegypti. As manifestações clínicas da infecção variam desde infecções assintomáticas, passando pela dengue clássica, chegando até a síndromes severas caracterizadas por hemorragia e choque hipovolêmico (síndrome da dengue hemorrágica). A cada ano, estimase que infecções pelos vírus da dengue sejam responsáveis por mais de 100 milhões de casos da dengue clássica e mais de 500 mil casos de dengue hemorrágica, em todo o mundo. Entretanto, a real prevalência não é bem conhecida, uma vez que a notificação em países menos desenvolvidos ainda é considerada insatisfatória (HALSTEAD, 2007).

No Brasil, no ano de 2010, somente até o dia 03 de julho foram notificados 942.153 casos no país. No mesmo do ano anterior foram notificados 593.669 casos, o que representa um aumento de 58,7%. Os estados com maior número de casos foram o Acre (3.619,5 casos por 100 mil habitantes), Mato Grosso do Sul (2.521,1 casos por 100 mil habitantes), Goiás (1.353.1 casos por 100 mil habitantes) Rondônia (1.256.4 casos por 100 mil habitantes), Roraima (1.146,9 casos por 100.000 habitantes) e Mato Grosso (1.095,5 casos por 100 mil habitantes). Esses oito estados concentram 75% dos casos no Brasil. Em relação à Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) foram notificados oficialmente pelas Secretarias Estaduais de Saúde 2.271 casos, com 367 óbitos (alguns ainda em investigação) (www.portal.saude.gov.br). A Figura 1 mostra o número de casos de dengue por semana epidemiológica nas regiões brasileiras no ano de 2009 e 1º semestre de 2010.

Com o objetivo de prevenir e controlar a progressão dessa doença mundialmente, um comitê formado por membros da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs direcionamentos práticos que incluíam o estabelecimento de um sistema de vigilância para casos de dengue (OMS, 1998), na tentativa de se conseguir o diagnóstico preciso e precoce, e a pronta notificação dos casos às autoridades locais de saúde

Recebido em 05/05/2008 Aprovado em 31/01/2011

^{12.3.4} Mestrando(a) do Programa de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa;

^{5,6} Professor de Imunologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa;
⁷ Professor de Virologia e Imunologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa

^{*} Responsável pela publicação: Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa

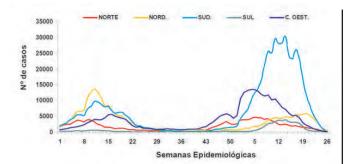


Figura 1. Número de casos de dengue por semana epidemiológica nas regiões brasileiras no ano de 2009 e 1º semestre de 2010. (Fonte: www.portal.saude.gov.br)

pública. Para atender a esse objetivo, é de suma importância que o diagnóstico da dengue seja rápido e acurado e, para tanto, todos os laboratórios clínicos devem tomar conhecimento dos

métodos mais apropriados para tal fim e que sejam adequados à suas realidades, assim como a das populações a que atendem.

Nos tempos atuais, na maioria dos países em que a prevalência das infecções pelos DENV é mais importante, grande parte dos diagnósticos de dengue ainda são feitos com base no julgamento clínico, uma vez que nem todas as localidades contam com a existência de laboratórios para a confirmação dos casos ou, o que é ainda mais preocupante, não contam com laboratórios clínicos que estejam aptos a realizar esse tipo de teste confirmatório. Tomando consciência desse fato, o objetivo desse trabalho é realizar um levantamento das metodologias disponíveis atualmente para esse fim, com o intuito de auxiliar as equipes de analistas clínicos a reconhecer os métodos mais adequados às suas condições e, dessa forma, poder torná-los presentes em sua rotina de trabalho.

Manifestações clínicas e laboratoriais

As características clínicas da infecção pelos DENV variam da ausência de sintomas, passando por um quadro de febre semelhante ao da gripe (dengue clássica) até quadros mais severos, com tendências hemorrágicas (dengue hemorrágica). Essa variabilidade clínica é ainda pouco entendida e parece estar relacionada à idade e genética do indivíduo, mas principalmente ao seu estado nutricional e imunológico (NG et al.,2007).

O período de incubação após a infecção pela picada do vetor infectado é em média de quatro dias. A doença pode se manifestar com febre e manchas maculopapulares na pele, sendo que nessa situação, a diferenciação clínica de outras doenças virais pode não ser possível, porém a recuperação é rápida. Em casos mais severos, a temperatura corporal sobe rapidamente (podendo atingir mais de 39°C) e pode persistir por até cinco ou seis dias. Também pode haver o aparecimento de outros sintomas como dor de cabeça, dor retrorbitária, artralgia, mialgia, manchas avermelhadas pela pele, hepatomegalia e dores abdominais. Nesses casos, os parâmetros laboratoriais geralmente são normais, exceto pela contagem de plaquetas, que pode estar ligeiramente diminuída (por volta de 100.000/mm³), e pelos níveis das enzimas hepáticas séricas (alanina aminotransferase em

particular), que podem estar moderadamente elevados, raramente ultrapassando a concentração de 100UI/mL (KAUTNER et al., 1997). A recuperação acontece geralmente entre sete a dez dias.

dengue, a dengue hemorrágica, os primeiros sintomas são muito semelhantes aos da dengue clássica descritos anteriormente. As manifestações hemorrágicas aparecem usualmente ao redor do terceiro dia de infecção e consistem de petéquias esparsas no tronco, membros e axilas. Essas são normalmente associadas a uma prova do laço positiva, sendo que era algumas vezes a prova do laço já resulta em resultado positivo ainda antes do aparecimento das petéquias, o que torna esse teste muito importante na detecção precoce dessa síndrome hemorrágica (KABRA et al., 1999). Também podem ocorrer sangramentos no local da venopunção, no trato gastrintestinal, nariz e gengivas. Após dois a sete dias, guando a febre começa a ceder, sinais de insuficiência circulatória podem aparecer, o paciente se mostra fatigado e com suor frio nas extremidades. Com tratamento apropriado, essa fase pode se resolver em um a dois dias. Se não, o paciente pode evoluir para

No quadro mais severo da infecção pelo vírus da

choque, como resultado do extravasamento de plasma para o compartimento extravascular e de coagulação intravascular disseminada (NG et al.,2007). A investigação laboratorial da dengue hemorrágica revela trombocitopenia que pode chegar a menos de 20.000 plaquetas/mm³, hemoconcentração com hematócritos aumentados em até 20% ou mais, hipoalbuminemia e elevação moderada na dosagem de aminotransferases e uréia séricas. Os tempos de tromboplastina parcial (TTP) e de trombina (TT) podem estar aumentados. As dosagens de fibrinogênio e de proteínas do Complemento normalmente apresentam-se diminuídas e correlacionam-se com a severidade da doença (CHEN et al., 2007).

O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DENGUE: APLICAÇÕES E IMPLICAÇÕES

O diagnóstico laboratorial acurado e eficiente da infecção pelos DENV é muito importante para os cuidados clínicos do paciente, para a vigilância epidemiológica, para o estudo da patogênese da infecção, para a pesquisa de formulações vacinais, e, além disso, contribui também para a detecção precoce de focos de epidemia, fornecendo informações úteis às autoridades sanitárias em tempo hábil para que sejam feitas a localização e a contenção da disseminação da transmissão do vírus. O uso de ferramentas diagnósticas laboratoriais adequadas para a detecção da infecção pelo vírus da dengue é crítica para a determinação de características importantes, como o número de casos fatais, a(s) cepa(s) viral(is) envolvidas em determinado foco da doença e as estimativas da incidência total de casos durante uma epidemia.

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da dengue pode ser feito seguindo diferentes linhas de pesquisa, entre elas: isolamento do vírus, detecção do genoma viral, detecção de antígenos virais e estudos sorológicos. A sorologia é, hoje em dia, a ferramenta mais amplamente aplicada na rotina laboratorial (GUZMÁN & KOURI, 2004). Obviamente, dados clínicos, geográficos e epidemiológicos sobre o individuo são também de suma importância ao se avaliar o resultado da pesquisa laboratorial.

Pesquisa sorológica

A infecção pelo DENV em indivíduo susceptível (nãoimune) produz uma resposta primária caracterizada pelo desenvolvimento lento de títulos baixos de anticorpos (Acs). O primeiro isotipo de Acs a ser detectado é o IgM anti-dengue. O segundo isotipo, IgG anti-dengue, aparece em títulos baixos por volta do final da primeira semana da doença instalada, os quais aumentam lentamente (CHUNGUE, 1995). Já no caso de uma infecção secundária (ou seja, a infecção pelo DENV em um indivíduo previamente imunizado por outro sorotipo de DENV ou um outro flavivírus, uma vez que, segundo VÁZQUEZ (2007) os Acs para esses vírus apresentam importante reacão cruzada), os títulos de Acs aumentam rapidamente e esses Acs são capazes de reagir amplamente com diferentes flavivírus. Altos títulos de IgG são detectáveis mesmo na fase aguda da doença, e continuam a aumentar durante a duas semanas seguintes, aproximadamente. A cinética dos títulos de IgM antidenque na infecção secundária pelo DENV é mais variável, aparecendo tardiamente durante a fase febril da doença, frequentemente precedido pelo IgG. Algumas reações falsonegativas para IgM antidengue são observadas em infecções secundárias. A detecção da IgM antidengue não é útil para a sorotipagem do vírus, devido à reatividade cruzada apresentada (GUZMÁN & KOURI, 2004).

Segundo CHADWICK et al. (2006), clinicamente, a soroconversão diagnóstica é definida como um aumento (ou queda) de pelo menos 4x no título de Acs anti-dengue dosados em duas amostras de soro por inibição da hemaglutinação (HI), reação de fixação do complemento (RFC), técnica de redução de placas por neutralização (em inglês, PRNT) ou ensaios de imunoadsorção enzimática (em inglês, ELISA). Devido ao compartilhamento de antígenos que produzem reação cruzada por todos os flavivírus, o diagnóstico laboratorial específico não é possível através destas técnicas, com exceção da PRNT, que dentre as técnicas supracitadas é a que apresenta a maior especificidade para a determinação de Acs anti-dengue.

Com o objetivo de determinar a presença e a quantidade de Acs neutralizantes antidengue, vários protocolos foram desenvolvidos. Culturas de células VERO e BHK-21 são freqüentemente usadas. Nos dias de hoje, poucos laboratórios realizam a técnica de PRNT em suas rotinas.

A inibição da hemaglutinação (HI) é a técnica sorológica mais aceita, entretanto, como despende muito tempo, o ELISA se tornou a técnica mais freqüentemente usada para estudos sorológicos (CHADWICK *et al.*, 2006).

A técnica de detecção de IgG anti-dengue pelo ELISA é amplamente utilizada para classificação dos casos com base no tipo de infecção, primária ou secundária. Alguns protocolos utilizam diluições seriadas do soro para a titulação dos Acs IgG

antidengue. Em outros, uma razão IgM/IgG maior que 1,78 é considerada indicativa de infecção primária, enquanto a razão inferior a esse valor seria indicativa de infecção secundária (GUZMÁN & KOURI, 2004).

Já foi demonstrada, por alguns investigadores, a utilidade da detecção de IgA antidengue como indicador de infecção recente (TALARMIN et al., 1998). Talarmin et al. determinaram a presença de Acs IgM e IgA no soro de 178 pacientes com dengue clássica. Acs IgA foram detectados desde o sexto dia após a instalação da febre até o vigésimo quinto dia. Em média, Acs IgM foram detectados no dia 3,8 e Acs IgA no dia 4,6. GROEN e colaboradores (1999) também sugeriram o valor diagnóstico da detecção de IgA no soro utilizando ensaios de imunofluorescência, embora um percentual mais alto de detecção de IgA tenha sido observado em amostras de soro na fase aguda de infecções secundárias.

A detecção de Acs anti-IgM utilizando ELISA representa um dos mais importantes avanços e se tornou uma ferramenta bastante valiosa no diagnóstico laboratorial de rotina para a dengue. Mais especificamente, a técnica de captura de IgM por ELISA (em inglês, MAC-ELISA), que é baseada na detecção específica de IgM anti-dengue no soro através de sua captura utilizado Ac anti-IgM humana previamente adsorvida à fase sólida, tem apresentado em torno de somente 10% de reações falso-negativas e 1,7% de reações falso-positivas (GUZMÁN & KOURI, 2004; NAWA et al., 2001).

No ano de 2007, KUMARASAMY e colaboradores avaliaram uma técnica de MAC-ELISA para a proteína NS1 (PLATELIA™ DENGUE NS1 AG test kit, BIO-RAD, França) dos DENV, na tentativa de demonstrar sua aplicação potencial no diagnóstico laboratorial precoce da infecção por esse vírus. Esse grupo obteve uma sensibilidade geral de 93,4% e uma especificidade de 100%, num total de 354 amostras, sendo 213 delas provenientes de infecção aguda. A técnica foi comparada com o isolamento viral em culturas de células e com a técnica de RT-PCR, obtendo ótimos resultados, além da técnica de ELISA para a detecção de IgG anti-NS1 (Panbio Dengue IgG Capture ELISA, Austrália) (KUMARASAMY et al, 2007).

Laboratórios clínicos de todo o mundo podem fazer uso de diversos "kits" diagnósticos já disponibilizados no mercado por diferentes fornecedores, como os que estão exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1. Diversos "kits" comerciais disponíveis no mercado para a detecção de Acs anti-dengue.

"Kits" comerciais	Isotipo de Ig detectado	Formato
PanBio Dengue Duo	IgM / IgG	ELISA
PanBio Dengue rapid test	IgM / IgG	Teste imunocromatográfico
MRL Diagnostic Dengue	lgM	ELISA
Blot IgM™, Diagnostic Biotechnology Ltd.	lgM	Immunoblot
Venture Technologies Dengue IgM and IgG Dot Blot	lgM / lgG	Immunoblot
Integrated Diagnostics	IgM	Teste imunocromatográfico
Dengue Duo Rapid Strip Test, PanBio	IgM / IgG	Teste imunocromatográfico
UMELISA Dengue IgM	lgM	Ultramicro-ELISA
PanBio Dengue IgG Capture ELISA	lgG anti-NS1	ELISA
PLATELIA [™] Dengue NS1 Ag, BIO-RAD	IgM anti-NS1	MAC-ELISA

Fonte: MODIFICADO de GUZMÁN & KOURI, 2004.

Isolamento viral

A viremia do DENV é curta, usualmente observada de dois ou três dias antes do estabelecimento da febre até no máximo cinco dias depois. Em trabalho prévio, nosso grupo pôde determinar que amostras biológicas destinadas ao isolamento viral devem ser coletadas até, no máximo, quatro a cinco dias após o estabelecimento da doença (DE PAULA & FONSECA, 2002).

Os DENV são termolábeis, portanto deve-se tomar cuidado na manipulação das amostras destinadas ao isolamento viral, tanto com relação ao próprio manuseio quanto com relação ao tempo de entrega e processamento da amostra no laboratório. A amostra pode ser estocada por períodos curtos a 4°C, porém, para estocagem mais longa, a amostra deve ser submetida a temperatura de -70°C (KUMARIA & CHAKRAVARTI, 2005).

A inoculação das amostras em mosquitos é o sistema mais sensível para o isolamento dos DENV, podendo ser usados tanto larvas quanto mosquitos adultos. Em geral, preferem-se os mosquitos Toxorhynchites, pois estes são maiores que os Aedes e não são hematófagos. Porém, machos adultos de A.aegypti e A.albopictus também são utilizados. A prática de inoculação viral em mosquitos requer bastante perícia técnica, e por isso, na maioria das vezes, é preferível realizar-se o isolamento em culturas de células para a rotina diagnóstica laboratorial. As linhagens celulares utilizadas são também provenientes de mosquitos e mostraram-se bastante eficazes no isolamento viral. A linhagem de células C6/36, derivada do A. albopictus, é a linhagem de escolha para a rotina do isolamento do DENV, embora a linhagem AP61, derivada do A. pseudoscutellaris, também tenha sido utilizada com sucesso (GUZMÁN & KOURI, 2004).

O método mais antigo e menos sensível de isolamento do DENV é através da *inoculação intra-cerebral* em filhotes de camundongos, que atualmente só é usado quando nenhum outro método está disponível. Embora muitos animais desenvolvam sintomas de encefalite, a maioria não apresenta nenhum sinal de doença após o procedimento (GUZMÁN & KOURI, 2004).

A identificação da cepa viral isolada é geralmente feita através de técnicas de *imunofluorescência (IF)* utilizando Acs monoclonais antidengue sorotipo-específicos sobre as células em cultura. Em geral, as amostras são primeiramente testadas por IF utilizando um Ac policional como triagem e os positivos são confirmados com Acs monoclonais específicos para cada um dos quatro sorotipos dos DENV. Algumas cepas não são facilmente identificadas devido a baixas concentrações virais. Alguns pesquisadores recomendam uma ou mais passagens por sistema de cultura de célula para aumentar a concentração viral (KORAKA *et al.*, 2002).

De acordo com KAO et al. (2001), a citometria de fluxo também tem sido apontada, recentemente, como um método útil para a identificação de DENV-1, permitindo a

detecção do vírus dez horas antes da IF onde são utilizados Acs monoclonais anti-NS1.

Detecção de antígenos virais

Nos últimos anos, alguns sistemas de detecção de antígenos (Ags) virais bastante sensíveis vem sendo padronizados no formato de ELISA. Em 1995, CHUNGUE (1995) aplicou um ELISA fluorogênico amplificado com estreptavidina e biotina na detecção e identificação de Ags de DENV-3 no soro de pacientes.O método mostrou uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 98% quando comparado ao isolamento viral em cultura de células C6/36.

Já KITTIGUL *et al.*, em 1997, demonstraram que os Ags do DENV podem ser detectados um maior freqüência em células mononucleares do sangue periférico quando comparadas ao soro (53,8% e 18,9%, respectivamente), utilizando também um sistema ELISA estreptavidina-biotina.

Um "kit" comercial baseado em dois sistemas de ELISA, um para detecção de Ags ("kit" azul) e outro para identificação viral ("kit" vermelho), já está disponível no mercado. De acordo com o fabricante, o "kit" azul alcança sensibilidade de 84% e especificidade de 89%, enquanto o "kit" vermelho alcança sensibilidade de 91% e especificidade de 93% (Globio Blue and Red Kit for antigen detection, Globio Corp., Beverly, MA, USA).

Técnicas imuno-histoquímicas, utilizando marcadores peroxidase ou fosfatase alcalina, também se mostraram úteis para a detecção de Ags do DENV em amostras de tecido incluídas em parafina e fixadas em formalina, embora essa tecnologia não seja amplamente utilizada para diagnóstico em países endêmicos (KAUTNER et al., 1997).

Detecção do genoma viral

A reação em cadeia da polimerase (PCR) se tornou uma importante ferramenta para o diagnóstico da dengue e de várias outras doenças virais, assim como para a vigilância epidemiológica, para estudos de eficácia de novos candidatos vacinais e drogas antivirais. No caso do DENV (e de todos os RNA vírus), a amplificação do DNA é precedida por uma reação de transcrição reversa, para a produção de um DNA complementar (cDNA) ao RNA genômico viral. Vários protocolos de PCR já foram padronizados, muitos deles envolvendo uma combinação de "primers" (ou iniciadores) específicos para os quatro sorotipos do DENV ao mesmo tempo. Esses "primers" podem se anelar em diferentes regiões do cDNA viral, como por exemplo, nas regiões de NS1, E, prM e NS5. Alguns protocolos chegam a permitir a detecção de menos de 50 -100 cópias virais por mm³ (BARKHAM et al., 2006)

Quando aplicado corretamente, a PCR apresenta vantagens consideráveis como ferramenta para diagnóstico da dengue. O uso da PCR permite a deteccão de DENV em

Tabela 2. Classificação em subtipos genotípicos.

Sorotipo DENV	Subtipos
DENV-1	I French Polynesia / Fiji / Singapore / Indonésia / Nauru / New Caledonia / Tonga; II Jamaica / French Guyana / New Caledonia / Brasil / México / Aruba / Cuba / Peru / Nicarágua / Thailand / Senegal / Malaysia / Puerto Rico; III Philippines / Thailand
DENV-2	I Puerto Rico / Tahiti / Tonga / Colombia / Mexico / Venezuela / Trinidad ; II Taiwan / Philippines / New Guinea / Thailand ; III Vietnam / Thailand / Jamaica ; IV Indonesia / Seichelles / Burkina Fasos / Sri Lanka ; V Ivory Coast / Burkina Faso / Senegal
DENV-3	I Philippines / Malaysia / Indonesia / Tahiti / Fiji ; II Thailand ; III Sri Lanka / Samoa / India / Mozambique ; IV Puerto Rico / Tahiti
DENV-4	I Thailand / philippines / Sri Lanka ; II Tahiti / Puerto Rico / Brasil / New Caledonia / El Salvador / México / Dominica / Indonesia

Fonte: MODIFICADO de GUZMÁN & KOURI, 2004.

amostras estocadas por longos períodos (ALVAREZ et al., 1996), permite a vigilância entomológica, ou seja, o controle das espécies de mosquitos vetores que estão participando da transmissão do vírus (KOW et al., 2001), permite a identificação do(s) sorotipo(s) responsável(eis) por um dado foco de infecção (McBRIDE et al., 1998) e permite estudar a variabilidade genética das cepas com o objetivo de identificar a origem de epidemias e revelar marcadores de virulência, quando conciliado com seqüenciamento de nucleotídeos. Isso permite classificar os sorotipos do DENV em subtipos de acordo com genótipos, como os que são exemplificados por GUZMÁN & KOURI, em 2004 (Tabela 2).

Por fim, novos protocolos e metodologias de PCR têm aparecido e permitem a rápida detecção e quantificação do RNA viral na amostra. Esses protocolos se baseiam amplamente na metodologia de RT-PCR, ou seja, o PCR precedido de uma transcrição reversa em uma única reação, como já foi descrito por nosso grupo em trabalho publicado em 2002 (DE PAULA & FONSECA, 2002), e por outros autores, como BARKHAM et al. (2006), CHUTINIMITKUL et al. (2005), KUMARIA et al. (2005), PRADO et al. (2005) e LEMMER et al. (2004).

Amostras biológicas para o diagnóstico laboratorial da dengue

Para as metodologias sorológicas, o *soro* é a amostra de escolha, entretanto, outros tipos de amostras como sangue total coletado em papel de filtro, urina e saliva já tenham sido utilizados na detecção de IgM anti-dengue, desde que coletadas no período apropriado (após cinco dias do estabelecimento da febre) (GUZMÁN & KOURI, 2004). OLIVEIRA *et al.*, em 1999, também demonstraram a detecção de Acs IgM antidengue em saliva de 65,8% de 38 pacientes infectados com dengue, com uma maior positividade (≥ 80%) para as amostras coletadas após 5 dias da instalação da febre.

No caso das metodologias de isolamento viral, o soro é mais uma vez a amostra de escolha para a rotina diagnóstica, porém o DENV também pode ser detectado no plasma, leucócitos e em tecidos obtidos através de biópsias (ou autópsias) como fígado, rins, linfonodos, pulmões e timo. As amostras devem ser encaminhadas ao laboratório e processadas o mais rapidamente possível, devido à característica termolábil do DENV.

Para as metodologias de detecção de antígenos virais, soro e plasma têm sido utilizados e, como já foi citado anteriormente, KITTIGUL *et al.* também demonstraram a possibilidade de se detectar esses antígenos em células mononucleares do sangue periférico.

O RNA genômico viral também já foi demonstrado, por PCR, em soro, plasma, células infectadas em cultura, larvas infectadas e mosquitos adultos coletados em campo e em tecidos frescos ou fixados por formalina incluídos em parafina. MIZUNO et al. descreveram um caso em 2007 em que conseguiram detectar, com sucesso, o genoma de DENV-1 na urina e saliva de um paciente infectado no Japão, mas não em amostras de plasma do mesmo, através da metodologia do RT-PCR.PRADO et al. (2005) também conseguiram detectar o genoma viral em amostras de sangue total coletado em papel de filtro por até 9 semanas após a coleta, com as amostras sendo armazenadas tanto à temperatura ambiente quanto a 4°C e a 70°C.

Nosso grupo de pesquisa, em 2002, testou amostras de sangue total, soro e creme leucocitário de 75 pacientes IgM-positivos para a detecção do genoma viral do DENV utilizando a metodologia da RT-PCR, onde foi demonstrado uma maior positividade de detecção nas amostras de soro (de 17 amostras

positivas, 14 eram de soro) (DE PAULA e FONSECA, 2002).

CONCLUSÃO

Os métodos de ELISA de captura de IgM, de isolamento viral em linhagens celulares provenientes de mosquitos, de PCR e os anticorpos monoclonais DENV-específicos representam os maiores avanços nos métodos laboratoriais para o diagnóstico da dengue (GUZMÁN & KOURI, 2004). Entretanto, alguns empecilhos ainda são observados no desenvolvimento de novas soluções no diagnóstico laboratorial da dengue.

O isolamento viral em cultura de células é um processo demorado que mimetiza a replicação do vírus nas células de seu hospedeiro e, por isso, pode não ser o mais desejável na rotina de identificação de infecções agudas. As técnicas de PCR requerem equipamento laboratorial específico e instalações físicas apropriadas, além de demandar uma extensa avaliação dos protocolos adaptados às condições do campo as quais o laboratório atende, uma vez que podem existir diferenças comprovadas entre cepas circulantes em locais diferentes. A detecção do anticorpo IgM requer tempo de coleta apropriado e seus resultados podem ser confundidos por reações falso positivas (uma vez que o IgM anti-DENV apresenta extensa reação cruzada) e por uma presença prolongada desses anticorpos em alguns indivíduos. Assim, alguns kits comerciais ainda precisam ser avaliados criticamente quanto aos seus resultados, custos e viabilidade de reagentes.

O desenvolvimento continuado de testes diagnósticos baratos, sensíveis, específicos e de fácil execução, que sejam capazes de proporcionar diagnóstico precoce da infecção pelos vírus dengue, é ainda uma necessidade. Os seguintes aspectos são os que requerem maior atenção:

- •Desenvolvimento de testes para o diagnóstico precoce da injeção.
- Desenvolvimento de testes sorológicos capazes de diferenciar a infecção pelo DENV da infecção por outros flavivírus, e ainda mais especificamente, de diferenciar entre os sorotipos do DENV.
- Desenvolvimento de protocolos fáceis e baratos para a caracterização genômica e de carga viral, incluindo protocolos para serem utilizados em campo.
- Modificação de protocolos já existente visando simplificar o transporte e a manipulação de espécimes biológicos.
- •Uso de antígenos recombinantes como componentes de testes diagnósticos e como ferramentas para a avaliação desses mesmos testes.
- Desenvolvimento de ferramentas laboratoriais que possam sugerir um prognóstico, permitindo um melhor acompanhamento clínico dos casos.

Além desses itens específicos, também é necessário direcionar atenção para a otimização de mecanismos que visam conferir uma maior viabilidade dos reagentes (antígenos, anticorpos monoclonais, culturas de células, controles séricos positivos e negativos, etc.), assim como para a otimização de métodos de padronização de protocolos diagnósticos em regiões endêmicas, de controle de qualidade e de compartilhamento de informações e experiências entre áreas endêmicas, incluindo o desenvolvimento de projetos de pesquisa em colaboração entre laboratórios.

Existem ainda alguns problemas e necessidades que não são especificamente relacionados ao desenvolvimento tecnológico de métodos diagnósticos. Por exemplo, a infraestrutura dos laboratórios, o treinamento do pessoal técnico e a capacidade de pesquisa ainda são limitados em

muitas partes do Brasil e do mundo, onde a dengue é endêmica. Esses fatores influenciam negativamente a vigilância epidemiológica, o acompanhamento clínico dos casos e o desenvolvimento de novas abordagens ao controle da dengue. Mostra-se urgente a mobilização de fundos governamentais para o aperfeiçoamento da capacidade de atendimento dos serviços de saúde pública, da infra-estrutura de laboratórios, hospitais, postos de atendimento básico, entre outros, além da capacitação pessoal, gerando desta forma um melhor controle e prevenção desta doença.

O problema da dengue é um problema presente em nossa realidade, e por isso, laboratórios clínicos devem se interar de todos os métodos diagnósticos disponíveis para a rotina e definir qual se adapta melhor às suas condições de trabalho e da população atendida, fornecendo desta forma subsídio para que os profissionais de saúde possam intervir tanto de forma curativa quanto preventiva, salvando vidas.

REFERÊNCIAS

1.ALVAREZ, M.; GUZMÁN, M.G.; ROSARIO, D.; VAZQUEZ, S.; PELEGRINO, J.L.; SARIOL, C. Secuenciacion directa a partir de un producto de PCR de una muestra de suero de la epidemia de FHD de 1981. Rev. Cub. Med. Trop., 48:53—5, 1996.

2.ANANDARAO, R.; SWAMINATHAN, S.; FERNANDO, S.; JANA, A.M.; KHANNA, N. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. Prot. Exp. & Purif., 41:136-147, 2005.

3.BARKHAM. T.M.; CHUNG, Y. K.; TANG, K.F.; OOI, E.E. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. R. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 100:142-148, 2006.

4.CHADWICK, D.; ARCH, B.; WILDER-SMITH, A.; PATON, N. Distinguishing dengue fever from other infections on the basis of simple clinical and laboratory features: Application of logistic regression analysis. J. of Clin. Virol., 35:147-153, 2006.

5.CHAKRAVARTI, A.; GUR, R.; BERRY, N.; MATHUR, M.D. Evaluation of three commercially available kits for serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. Diag. Microb. and Infect. Dis., 36:273-274, 2000.

6.CHEN, R.F.; YANG, K.D.; WANG, L.; LIU, J.W.; CHIU, C.C.; CHENG, J.T. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. R. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 101:1106-1113, 2007.

7.CHUNGUE, E. Nouvelles techniques diagnostiques de la dengue. Méd. Mal. Infect, 25:696-701, 1995

8.CHUTINIMITKUL, S.; PAYUNGPORN, S.; THEAMBOONLERS, A.; POOVORAWAN, Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. J. of Virol. Met., 129:8-15,

9.DE PAULA, S.O.; LIMA, D.M.; CLOUTEAU, M.; NETO, R.J.P.; FONSECA, B.A.L. Improved detection of Dengue-1 virus from IgM-positive serum samples using C6/36 cell cultures in association with RT-PCR. Intervirology, 46:227-231, 2003.

10.DE PAULA, S.O. & FONSECA, B.A.L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. The Braz. J. of Infect. Dis., 8 (6):390-398, 2004.

11.DE PAULA, S.O. & FONSECA, B.A.L. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy-coat and serum as clinical samples. J. of Virol. Met., 102:113-117, 2002.

12.DE PAULA, S.O.; NETO, R.J.P.; CORRÊA, J.A.C.T.; ASSUMPÇÃO, S.R.; COSTA, M.L.S.; LIMA, D.M.; FONSECA, B.A.L. The use of reverse transription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection of dengue virus in an endemic region: a validation study. R. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 96:266-269, 2002.

13.FERES, V.C.R.; MARTELLI, C.M.T.; TURCHI, M.D.; SIQUEIRA JR., J.B.; NOGUEIRA, R.M.R.; ROCHA, B.A.M.; SILVA, L.F.F.; SILVA, M.M.J.; CARDOSOS, D.D.P. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. J. of Clin. Virol., 37: 179-183, 2006.

14.GROEN, J.; VELZING, J.; COPRA, C.; BALENTIEN, E.; DEUBEL, V.; VORNDAM, V. Diagnostic value of dengue virus specific IgA and IgM serum antibody detection. Micro. Inf., 1:1085—1090, 1999.

15.GUZM'AN, M.G.~&~KOURI,~G.~Dengue~diagnosis, advances~and~challenges.~International~J.~of~Infect.~Dis.,~8:69-80, 2004.

16.HALSTEAD, S.B. Dengue. Lancet, 370:1644-1652, 2007.

 $17. HALSTEAD, S.B.\ Dengue\ diagnosis,\ treatment\ and\ epidemiology.\ Int.\ J.\ of\ Antimic.\ Agents,\ 26:17-18,\ 2005.$

18.KABRA, S.K.; JAIN, Y.; PANDEY, R.M.; MADHULIKA, T.; SINGHAL, T.; TRIPATHI,P.; BROOR, S.; SETH, P.; SETH, V. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Dheli epidemic. R. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 93:294-298, 1999.

19.KAO, C.L.; WU, M.C.; CHIU, Y.H.; LIN, J.L.; YUEH, Y.Y.; CHEN, L.K. Flow cytometry compared to indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. J. Clin. Microbiol., 39:3672—3677, 2001.

20.KAUTNER, I., ROBINSON, M.J.; KUHNLE, U. Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and prevention, J. of Pediat., 131:516-524, 1997.

21.KITTIGUL, L.; MEETHIEN, N.; SUJIRARAT, D.; KITTIGUL, C.; VASANAVAT, S. Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. Asian Pacif. J. of Allerg. and Immunol., 15:187—191, 1997.

22.KONG, Y.Y.; THAY, C.H.; TIN, T.C.; DEVI, S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. J. of Virol. Met., 138:123-130, 2006.

23.KORAKA, P.; ZELLER, H.; NIEDRIG, M.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; GROEN, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. Microb. and Infect., 4:1209-1215, 2002.

24.KOW, C.Y.; KOON, L.L.; YIN, P.F. Detection of dengue viruses in field caught male Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. J. of Med. Entomol., 38:475—479, 2001.

25.KUMARASAMY, V.; WAHAB, A.H.A.; CHUA, S.K.; HASSAN, Z.; CHEM, Y.K.; MOHAMAD, M.; CHUA, K.B. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen capture-ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. J. of Virol. Met., 140:75-79, 2007.

26.KUMARIA, R.; CHAKRAVARTI, A. Molecular detection and serotypic characterization of dengue viruses by single-tube multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Diag. Microb. and Infect. Dis., 52:311-316, 2005.

27.LAM, S.K.; DEVINE, P.L. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. Clin. and Diag. Virol., 10:75-81, 1998.

28.LEMMER, K.; MANTKE, O.D.; BAE, H.G.; GROEN, J.; DROSTEN, C.; NIEDRIG, M. External quality control assessment in PCR diagnostics of dengue virus infections. J. of Clin. Virol., 30:291-296. 2004.

29.MCBRIDE, W.J.H.; MULLNER, H.; MULLER, R.; LABROOY, J.; WRONSKI, I. Determinants of Dengue 2 infection among residents of Charters Towers, Queensland, Australia. Amer. J. of Epidemiol., 148(11):1111-1116, 1998.

30.MIZUNO, Y.; KOTAKI, A.; HARADA, F.; TAJIMA, S.; KURANE, I.; TAKASAKI, T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. R. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 101:738-739, 2007.

31.NAWA, M.; TAKASAKI, T.; YAMADA, K.I.; AKATSUKA, T.; KURANE. I. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. J. of Virol. Met., 92:65—70, 2001.

32.NG, C.F.S.; LUM, L.C.S.; ISMAIL, N.A.; TAN, L.H.; TAN, C.P.L. Clinicians' diagnostic practice of dengue infections. J. of Clin. Virol., 40:202-206, 2007.

33.OLIVEIRA, S.A.; RODRIGUES, C.V.N.; CAMACHO, L.A.B.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ARAÚJO, E.S.M.; NOGUEIRA, R.M.R. Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin Mantibodies in saliva samples. J. of Virol. Met., 77:81-86, 1999.

34.POERSCH, C.O.; PAVONI, D.P.; QUEIROZ, M.H.; BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; DOS SANTOS, C.N.D.; KRIEGER, M.A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. J. of Clin. Virol., 32:272-277, 2005.

35.PRADO, I.; ROSARIO, D.; BERNARDO, L.; ÁLVAREZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; VÁZQUEZ, S.; GUZMÁN, M.G. PCR detection of dengue vírus using dried whole blood spotted on filter paper. J. of Virol. Met., 125:75-81, 2005.

36.SCHILLING, S.; LUDOLFS, D.; AN, L.V.; SCHMITZ, H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. J. of Clin. Virol., 31:179-184, 2004.

37.TALARMIN, T.; LABEAU, B.; LELARGE, J.; SARTHOU, J.L. Immunoglobulin capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of dengue fever. J. of Clin. Microb., 36:1189—1192, 1998.

38.VÁZQUEZ, S.; CABEZAS, S.; PÉREZ, A.B.; PUPO, M.; RUIZ, D.; CALZADA, N.; BERNARDO, L.; CASTRO, O.; GONZÁLEZ, D.; SERRANO, T.; SÁNCHEZ, A.; GUZMÁN, M.G. Kinetics of antibodies in sera, saliva and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. Int. J. of Infect. Dis., 11:256-262, 2007.

39.VÁZQUEZ, S.; PÉREZ, A.B.; RUIZ, D.; RODRÍGUEZ, R.; PUPO, M.; CALZADA, N.; GONZÁLEZ, L.; GONZÁLEZ, D.; CASTRO, O.; SERRANO, T.; GUZMÁN, M.G. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections, J. of Clin, Virol., 33:132-137, 2005.

40.YAMADA, K.I.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. J. of Clin. Virol., 24:203-209, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Sérgio O. de Paula Laboratório de Imunovirologia Molecular Departamento de Biologia Geral Universidade Federal de Viçosa E-mail: depaula@ufv.br

Tel: 31 3899-2589 Fax: 31 3899-2549

Imunocitoquímica e Imunohistoquímica para o Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Tegumentar

Immunocytochemistry and Immunohistochemistry for Laboratorial Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

S. N. Lunedo¹, V. Thomaz Soccol^{1,2}, E. A.Castro²; J. E. Queiroz Telles³

RESUMO - O aumento significativo do número de casos notificados da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a expansão geográfica da endemia têm motivado o desenvolvimento de novas tecnologias para auxiliar no diagnóstico das leishmanioses, visando minimizar as restrições apresentadas pelos testes diagnósticos disponíveis nos serviços de saúde. O presente trabalho empregou imunocitoquímica e imunohistoquímica (ICQ/IHQ) como métodos diagnósticos laboratoriais para LTA. Amostras de culturas de *Leishmania in vitro* e cortes histológicos de lesões em animais infectados experimentalmente foram submetidos à ICQ/IHQ, utilizando anticorpos policlonais desenvolvidos para este estudo e o complexo avidina-biotina modificado (Ultra Streptavidin®). Em comparação com outras técnicas empregadas para o diagnóstico da LTA, nos casos avaliados, a IHQ apresentou resultados semelhantes aos da histopatologia com coloração HE, com sensibilidade de 33,3% para formas amastigotas. Quando considerada a presença de antígenos de *Leishmania* no padrão celular, a IHQ apresentou uma sensibilidade de 83,3%, significativamente maior que na histopatologia e compatível com métodos padrão ouro de cultura e PCR. As metodologias de ICQ/IHQ desenvolvidas neste trabalho foram capazes de demonstrar em biópsias de lesões, a presença de formas amastigotas e antígenos de Leishmania, oferecendo contribuição adicional ao diagnóstico da LTA, sendo de fácil aplicação e podendo ser utilizada no sistema público de saúde. Palavras Chave: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Diagnóstico Laboratorial. Imunocitoquímica e Imunohistoquímica (ICQ/IHQ).

SUMMARY - The significant increase in cutaneous leishmaniasis (CL) notified cases and the geographic expansion of this endemy has motivated the development of new techniques to help in leishmaniasis diagnosis, seeking the minimization of the restrictions imposed by the diagnostic tests available at the health services. The current study applied immunocytochemistry and immunohystochemistry methods (ICC/IHC) for laboratory diagnosis of CL. Imprints and histological sections from tissue infected with Leishmania were submitted to ICC/IHC methods using polyclonal antibodies developed for this study and a modified avidin-biotin complex (Ultra Streptavidin®). The samples also were submitted for routinely stained hematoxylin and eosin (H&E) specimens and gold standard methods (culture and PCR). Compared with other useful techniques for the CL diagnosis, ICC/IHC showed the same sensitivity results (33%) as H&E stain for amastigotes recognition. When the presence of Leishmania antigens was evaluated, ICC/IHC presented 83,3% sensitivity, i.e., higher than that detected by histopathology and equivalent with gold standard methods (culture and PCR). The ICC/IHC techniques developed in the current study were able to recognize amastigote forms and also Leishmania antigens in lesion biopsies, offering an additional help to CL diagnosis and it can be easily applied in the public health system.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis (CL). Laboratorial diagnosis. Immunocytochemistry and immunohistochemistry (ICC/IHC).

INTRODUCÃO

Os métodos laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da LTA, baseados na pesquisa direta do parasito nas lesões, incluem o exame de esfregaços corados, exame histopatológico, cultura e inoculação em animais. Para o diagnóstico sorológico, aplicável em estudos epidemiológicos, utilizam-se os métodos de ELISA (enzimaimunoensaio) e IFI (imunofluorescência indireta)^{7,19}. Nos métodos para pesquisa do DNA do parasito, a técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) tem sido a mais utilizada, pois, além do diagnóstico, tem permitido a caracterização de diferenças moleculares e bioquímicas do agente etiológico^{5,20}. Para a avaliação da resposta celular, o método de escolha é o teste de Montenegro⁹, apesar de não possibilitar a distinção entre doença ativa e infecção passada.

Todas as metodologias utilizadas apresentam limitações em sua aplicação, seja no aspecto técnico ou no elevado custo financeiro.

Imunocitoquímica e imunohistoquímica (ICQ/IHQ) são definidas como metodologias que utilizam anticorpos conjugados com marcadores para localizar e identificar estruturas teciduais, que funcionam como antígenos, *in situ* ¹⁷.

Considerando prioritariamente o diagnóstico da doença, a utilização de anticorpos policlonais atende aos requisitos técnicos para sua aplicação em ICQ/IHQ, pois além de elevarem a sensibilidade diagnóstica em doenças infecto parasitárias são mais acessíveis, técnica e economicamente, que os anticorpos monoclonais 18. Estas características têm permitido a aplicação dos anticorpos policlonais em ICQ/IHQ para a identificação de amastigotas íntegras e antígenos de *Leishmania* em diferentes tecidos humanos e animais 14.

Recebido em 29/04/2009 Aprovado em 15/04/2011

- 1. Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
 - 2. Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
 - 3. Departamento de Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Nesta perspectiva, o desenvolvimento de insumos e metodologias, de fácil aplicação e interpretação, que colaborem para o diagnóstico da LTA, permitirá a identificação de áreas prioritárias para ações de prevenção, tratamento e controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Histopatologia - Hematoxilina - eosina

As biópsias das lesões cutâneas de casos suspeitos foram fixadas em formol tamponado a 10% e processadas por técnicas histológicas de rotina². As lâminas foram coradas com hematoxilina (Merck, Germany) e solução de eosina (SIGMA, Germany) conforme protocolo². As preparações coradas foram analisadas em microscopia ótica em aumentos de 400 e 1000X.

Cultura in vitro

Para isolamento do parasito, a partir de lesões cutâneas de casos suspeitos, foram feitas biópsias das lesões ou aspiração do fluído tecidual. O material obtido foi macerado em condições assépticas com soro fisiológico (0,85%) e antibiótico (penicilina 25.000 UI/mL). Os materiais foram aliquotados em volumes de 0,5 mL, transferidos para o meio de Tobie — Evans e mantidos a 24 °C em estufa. Na fase exponencial de crescimento (5° ao 7° dia), o material de cultura foi examinado em busca de formas promastigotas, com até quatro repiques sucessivos até o isolamento. Caso negativo, nova pesquisa de promastigotas foi realizada em 15 dias. Nas amostras com resultado negativo o material foi descartado.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de biópsias das lesões, congeladas a -20°C, foram maceradas em solução tampão (Tris - HCl 100 mM, NaCl 150 mM e EDTA 10 mM, pH 7,4). O macerado foi transferido para tubo de células, homogeneizado com tampão e centrifugado (300x g) para obtenção do sedimento. A extração do DNA do sedimento observou a seguinte seqüência: lise celular, remoção de proteínas e RNA e concentração do DNA. Na amplificação do DNA por PCR, foram utilizados os iniciadores b1 (GTGGGCGTATCTGCTGATGAC) e b2 (CAAAAAGCGAGGACTGCGGA) para

(V.) braziliensis¹² em diferentes temperaturas de anelamento. A amplificação foi realizada em termociclador (PCR Express-Hybaid), com 10 ng de DNA em volume final de reação de 25 μL com 20 μL de óleo mineral¹³.

Anticorpos policionais

Para a obtenção de soros hiperimunes, coelhos da raça Nova Zelândia albinos foram inoculados com três doses subcutâneas (0, 30 e 45 dias) de proteínas (1,0 mg) de antígenos insolúveis de L. (V.) braziliensis e L. (L.) amazonensis com adjuvante de Freud completo (1ª dose) e incompleto (2ª e 3ª doses). Foram coletadas amostras sanguíneas dos animais inoculados e dos controles (0, 15, 30, 45 e 55 dias) para

observar a cinética de produção de anticorpos por ELISA. Sangrias de produção foram efetuadas aos 60 e 65 dias após a primeira inoculação e os soros hiperimunes obtidos foram congelados a -20°C até a purificação. As frações IgG dos soros hiperimunes (HPI) (Ag solúvel e Ag insolúvel de L. (*V.*) braziliensis e L. (*L.*) amazonensis) foram extraídas utilizando-se o protocolo modificado da Amersham Biosciences — Antibody Purification Handbook, 2002, empregando a metodologia de Mckinney & Parkinson, 1987. Após diálise (tampão PBS 0,05 M, pH 7,4, a 4°C) e filtração (0.4-0.8 µm) as frações foram submetidas a processo de purificação cromatográfico em coluna, utilizando-se resina de G — sepharose (Sephadex® G-50).

Imunocitoquímica e Imunohistoquímica

As lâminas com distensões e aposições de amostras, fixadas em etanol a 95% e os cortes histológicos mantidos em formol tamponado a 10% foram submetidos aos processos de ICQ e IHQ, utilizando-se os anticorpos policionais obtidos nas etapas de purificação e o complexo avidina-biotina modificado (Ultra Streptavidin®), fabricado por Signet Laboratories Inc. As amostras foram incubadas com reagentes bloqueadores (peróxido de hidrogênio 3% v/v em metanol, soro normal antihorseradish peroxidase - HRP e soro normal antifosfatase alcalina). Em seguida, foi adicionado o anticorpo policional na diluição de 1/100 em PBS pH 7,4 com 0,1% de azida sódica. Após incubação e lavagem, foi adicionado o anticorpo de ligação biotinilado anticoelho (Ultra Streptavidin®), com nova lavagem e adição do reagente de marcação peroxidase estreptavidina (Ultra Streptavidin®) em tampão PBS 0,01M. Após nova lavagem com tampão PBS pH 7,4, o sistema é visualizado pela adição do substrato cromogênico (DAB - 3,3' Diaminobenzidina). As lâminas foram novamente lavadas e contracoradas com hematoxilina. A análise foi realizada em microscopia ótica, com aumentos de 400 e 1000x.

Análise estatística

A sensibilidade de cada método foi calculada considerando o número de testes com resultado positivo dividido pelo número de testes positivos dos métodos de referência (cultura e PCR). Para a comprovação do objetivo desse trabalho, foi utilizada a análise de variância — "teste F" (ANOVA), os testes não-paramétricos "Qui-Quadrado", "Comparação entre duas Proporções" e "Teste de Comparações Múltiplas" (Teste de Tukey), pelo software "Primer of Biostatistics" O nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5% (p<0,05).

RESULTADOS

Na avaliação das amostras PCR positivas para LTA (Figura 1), as preparações ICQ/IHQ apresentaram uma melhor visualização das formas amastigotas em relação à coloração HE (Figura 2). Para os casos avaliados, a histopatologia com HE apresentou sensibilidade de 33% para a detecção de

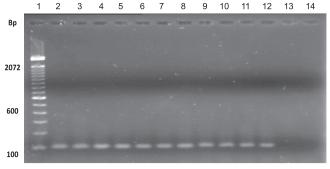


Figura 1 – Perfil dos produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase de biópsias de pacientes com diagnóstico clínico de leishmaniose.

Nota: Amostras de lesões (linhas 2 a 11); *L. (V.) braziliensis* (linha 12); *L.(L.) amazonensis* (linha 13); controle negativo (linha14) e padrões de referência (marcador molecular 100 PB DNA Ladder-Invitrogen) (linha 1).

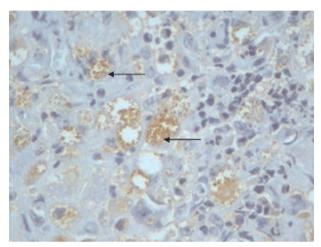


Figura 2 – Imunohistoquímica e histopatológico, com coloração de hematoxilina-eosina, de material de biópsia para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*. Aumento de 400x (a) e 1000x (b). (a) Preparação IHQ

Tabela 1 - Comparação entre metodologias para a identificação de amastigotas e antígenos de *Leishmania* em materiais de biópsias de lesões.

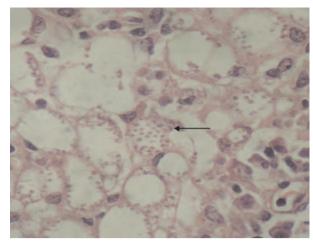
Metodologia						
Casos (n= 26)	HE Presença de amastigotas	IHQ Presença de amastigotas	IHQ Presença de amastigotas		Cultura	
Sensibilidade (%)	33	33	83,3	100	100	

HE = Histopatologia com coloração de hematoxilina – eosina, aumento de 1000x; IHQ = Imunohistoquímica, aumento de 1000x; PCR = Reação em cadeia da Polimerase.

amastigotas, o mesmo resultado observado nas preparações ICQ/IHQ (Tabela 1). No padrão celular (Figura 3), quando é considerada a presença de antígenos de *Leishmania*, a ICQ/IHQ apresentou sensibilidade de 83,3% nas amostras avaliadas, muito superior ao obtido para histopatologia com HE e compatível com os resultados de cultura e PCR (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Os métodos de diagnóstico disponíveis para LTA apresentam, em diversos aspectos, restrições que limitam sua eficácia e possibilidades de aplicação nos serviços de saúde



(b) Coloração HE

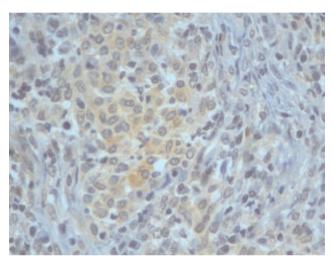


Figura 3 – Imunohistoquímica de biópsia de lesão ativa de LTA, com reação positiva para antígenos de *Leishmania* em citoplasma de células gigantes (padrão celular). Aumento de 1000x.

pública⁶. Na pesquisa direta do parasito nas lesões, a porcentagem de positividade é inversamente proporcional à duração da infecção, sendo que, em lesões recentes, as formas amastigotas podem ser encontradas com major facilidade¹⁵. Os sistemas de diagnóstico imunológico que utilizam métodos de enzimaimunoensaio (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI), pesquisa de DNA e cultura necessitam de uma estrutura técnica laboratorial que nem sempre é disponibilizada nos serviços de saúde pública nos municípios do interior, ficando restritos aos centros de referência. Outro problema com os ensaios sorológicos para diagnóstico da LTA é a ocorrência de reações cruzadas com outras patologias, incluindo leishmaniose visceral e doença de Chagas¹⁵. Os métodos para avaliação da resposta celular (teste de Montenegro) apresentam limitações em sua padronização, além da dificuldade no retorno do paciente para a realização da leitura da reação, após 72 horas¹⁶. Neste contexto, é justificado o desenvolvimento de um método ICQ/IHQ para complementar o conjunto de metodologias disponíveis, visando melhorar o diagnóstico e o coeficiente de detecção da LTA.

Nas metodologias de ICQ e IHQ podem ocorrer reações inespecíficas de fundo (*backgroud*), devidas a atividades enzimáticas endógenas, fixação deficiente, degradação da amostra, presença de anticorpos naturais e proteínas contaminantes^{3,4}. A maioria dos interferentes pode ter sua atividade atenuada ou eliminada nas etapas de execução da metodologia. A interferência devida as proteínas contaminantes, presentes nos soros hiperimunes, pode ser minimizada por um processo eficiente de purificação dos soros. Neste trabalho, o processo de purificação consistiu na extração de imunoglobulinas, segundo metodologia de Mckinney & Parkinson (1987), seguido de purificação cromatográfica em coluna com resina de G—sepharose (Sephadex® G-50).

Na avaliação dos diferentes métodos utilizados para o diagnóstico laboratorial da LTA, a metodologia de IHQ apresenta algumas possibilidades adicionais em relação à metodologia tradicional de histopatologia com coloração por hematoxilina-eosina (HE). Uma vantagem relevante da IHQ é a facilidade de observação das amastigotas em um campo de microscopia que apresente poucos parasitos em meio à reação inflamatória, restos celulares e microrganismos contaminantes. Esta visualização ampliada é decorrente da presença bem definida do substrato cromogênico (DAB) no sítio de interação antígeno-anticorpo, em contraste com o corante de fundo, permitindo um delineamento das estruturas das amastigotas. dando aparência maior (3-5 µm) do que na coloração por HE (2-4 µm)¹⁰. Outra possibilidade da ICQ/IHQ é indicar a presença de reação positiva para antígenos de Leishmania, que ocorre em tecidos com parasitos parcialmente degradados ou em fase de processamento de antígenos, independente da visualização das formas amastigotas íntegras¹⁴. Esta possibilidade de caracterização de antígenos, independente da presença de amastigotas íntegras, elevou a sensibilidade da metodologia neste estudo para 83,3 %, compatível com a sensibilidade de 92,5% encontrada por Schubach et al. (2001).

CONCLUSÕES

Em comparação com a histopatologia (HE) a metodologia de ICQ/IHQ oferece parâmetros adicionais para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. O método proporciona melhor visualização das amastigotas e indica a presença de antígenos de *Leishmania* em tecidos com parasitos parcialmente degradados, resultando em maior sensibilidade (83,3 %) para os casos avaliados.

AGRADECIMENTOS

Ao Seti Leishpar – UGF e ao CNPg pelo suporte financeiro.

4. REFERÊNCIAS

- 1. AMERSHAM BIOSCIENCES. Antibody purification handbook. Piscataway: Pharmacia & Upjohn, 2002.
- 2. BANCROFT, J.D; COOK, H.C. Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application 2. ed. Churchill Livingstone, 1994.
- 3. BOENISCH, T. Handbook of immunochemical staining methods. 3. ed. Dako Corporation, 2001.
- 4.BORGES-FERRO, A. Técnicas Imunocitoquímicas (2005): http://www.amadeuferro.pt.vu/>.
- 5. CASTILHO, T.M; SHAW, J.J; FLOETER-WINTER, L.M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of Leishmania species. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41: 540-546.
- FABER, W; OSKAM, L; VAN GOOL, T; KROON, N; KNEGT-JUNK, K. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. Journal of American Academy of Dermatology 2003; 49:70-74.
- 7. FURTADO, T. Critérios para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. Anais Brasileiros de Dermatologia 1994; 65: 51-86.
- 8. GLANTZ, S.A. Primer of Biostatistics, Version 4.0, McGraw Hill, Fourth Edition. New York 1997: 473 p.
- 99. GONTIJO, B; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003; 36: 71-80.
- 10.KENNER, J.R; ARONSON, N.E; BRATTHAUER, G.L; TURNICK, R.P. Immunohistochemistry to identify Leishmania parasites in fixed tissues. Journal of Cutaneous Pathology 1999: 26: 130-136.
- 11. MCKINNEY, M.M; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascite fluid. Journal Immunology Methods 1987; 96: 271 278. 12. MIMOR,IT; SASAKI, J; NAKATA, M; GOMEZ, E.A; UEZATO, H; NONAKA, S; HASHIGUCHI, Y; FURUYA, M; SAYA, H. Rapid identification of Leishmania species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. Gene 1998; 210:179-186.
- 13.PEREIRA, E.F.A; THOMAZ-SOCCOL, V; LIMA, H,C; SOCCOL, A.T; CASTRO, E.A; MULINARLBRENNER, F; QUEIROZ-TELLES, F; LUZ, E. -Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Paraná state of southern Brazil (p) Published Online: Jul 10 2008 10:06PM DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00744.x
- 14.SCHÚBACH, A; CUZZI-MAYA, T; OLIVEIRA, A; SARTOR,I A; OLIVEIRA-NETO, M; MATTOS, M; ARAÚJO, M.L; SOUZA, W; HADDAD, F; PEREZ, M; PACHECO, R; MOMEN, H; COUTINHO, S; MARZOCH,I M; BELIZIA, K. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American Tegumentary Leishmaniasis patients. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2001; 96: 987-996.
- 15. SINGH, S; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. Journal of Postg Medicine 2003; 49: 55-60.
- 16, SOUZA, W.J.S; SABROZA, P.C; SANTOS, C.S; SOUSA, E; HENRIQUE, M.F; COUTINHO, S.G. Montenegro skin test for American cutaneous Leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. Acta Tropica 1992; 52: 111-119.
- 17. STERNBERGER, L. Immunocytochemistry. 3. ed. John Wiley & Sons. 1986.
- 18. TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. Journal of Immunology Methods, v. 292 (1-2): 17-23, 2004.
- 19. THIERRY, J.; BOREL, E.; COURRIER, P.L.; COURTOIS, D.; MOJON, M. Leishmaniose cutanee sud-americaine diagnostic parasitologique et serologique par immunofluorescence indirecte (IFI) et enzyme-linked immuno assay (ELISA): À propos de 94 cas. Medicine Tropicale 1991: 51: 43-48.
- 20. THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Leishmania species in two regions of Paraná State, Brazil: biochemical characterisation by isoenzyme electrophoresis. In: ROUSSOS, S. et al. (Ed.). New Horizons in Biotechnology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, p. 4290-439 (chapter 35), 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Sandro Nelson Lunedo

Rua Gonçalves Dias, 395/52

Curitiba/PR - CEP 80240-340

Email: slunedo@uol.com.br; slunedo@brturbo.com.br

Freqüência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas: análise de 213 casos diagnosticados na Fundação Hemope

Frequency of aberrant immunophenotypes in acute leukemia: analysis of 213 cases diagnosed in Fundação Hemope

Joel Henrique Teles dos Santos^{1,2}, Diogo Castelo Branco Alves Torres¹, Maria Amélia Batista Neves¹ Ana Elita de Brito¹, Rosane Costa Porto de Araújo¹, Cíntia Gonsalves de Faria Machado^{1,2}

RESUMO - As leucemias agudas (LAs) são doencas clonais do tecido hematopoético caracterizadas por proliferação anômala de progenitores das diferentes linhagens. O diagnóstico das LAs se baseia em achados citomorfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos em células da Medula Óssea (MO) e/ou Sangue Periférico (SP). Cerca de 30 a 50% das LMAs e LLAs, bem caracterizadas pelo imunofenótipo, exibem expressão de antígenos aberrantes e esta situação deve ser distinguida das leucemias bifenotípicas, que têm atualmente critérios de diagnóstico bem definidos. A detecção dos antígenos aberrantes não parece ter implicação prognóstica, mas é uma importante ferramenta para a detecção de doença residual mínima (DRM). O objetivo deste trabalho foi relatar a frequência de Fenótipos Aberrantes (FA) em LAs nos pacientes diagnosticados na Fundação Hemope, correlacionar este achado com a idade e identificar os antígenos aberrantes predominantes. O estudo contou com 213 pacientes de ambos os sexos e sem restrição de faixa etária ou raça. A imunofenotipagem utilizou amostras de SP e/ou MO, sendo a análise realizada por citometria de fluxo multiparamétrica. Para as LMAs, LLAs B e LLAs T as frequências de FA encontradas foram de 47%, 40% e 52%, respectivamente. Os antígenos aberrantes predominantes foram CD7 e CD56 para as LMAs e CD13 e CD33 para as LLAs. A fregüência de antígenos aberrantes (45%) e a predominância de antígenos linfocitários T e NK na LMAs e de antígenos mielóides nas LLAs, condizem com a literatura. Por outro lado, o predomínio de FA entre os adultos parece sugerir mais uma característica da amostra, onde esta faixa etária predominou, que uma característica biológica das leucemias analisadas. Finalmente, este estudo, definindo melhor o perfil imunofenotípico de nossos pacientes, possibilita o uso deste conhecimento na avaliação de DRM.

Palavras-Chave: Leucemias Agudas, Imunofenótipos Aberrantes, Citometria de Fluxo.

SUMMARY - Acute leukemias (AL) are clonal diseases of the hematopoietic tissue characterized by anomalous proliferation of precursors of different lineage. The diagnosis of AL is based on morphological, citochemical and immunophenotypical findings in cells of Bone Marrow (BM) and/or Peripheral Blood (PB). About 30 to 50% of AML and ALL, well-characterized by immunophenotype, display aberrant expression of antigens and this situation should be distinguished from biphenotipic leukemias, which are currently well-defined criteria for diagnosis. The detection of aberrant antigen does not seem to have prognostic implication, but it is an important tool for the detection of minimal residual disease (MRD). The objective of this study was to report the frequency of aberrant phenotypes (AP) at AL in patients diagnosticated by Fundação Hemope, correlate this finding with age and identify the predominant aberrant antigens. The study included 213 patients of both genders and without restriction of age or race. The immunophenotyping used samples of PB and/or BM, being the analysis by multiparametric flow cytometry. For AML, B-ALL and T-ALL the frequencies of FA found were 47%, 40% and 52% respectively. The predominant aberrant antigens for AML were CD7 and CD56 and for ALL were CD33 and CD13. The frequency of aberrant antigens (45%) and the predominance of lymphocyte T and NK antigens in AML and myeloid antigens in ALL, matches with the literature. Moreover, the prevalence of AP among adults, who are the predominant age group, seems to be more suggestive of a characteristic of the sample, than a biological feature of leukemias that were analyzed. Finally, this study, defines better the immunophenotypical profile of our patients and allows the use of this knowledge in the evaluation of MRD.

Keywords: Acute Leukemia, Aberrant Immunophenotypes, Flow Cytometry.

INTRODUÇÃO

As leucemias agudas (LAs) são doenças clonais do tecido hematopoético caracterizadas por proliferação anômala de progenitores de diferentes linhagens. São doenças bastante heterogêneas e com curso clínico variável¹⁻².

O diagnóstico das LAs se baseia em achados clínicos, citomorfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos em células da Medula Óssea (MO) e/ou Sangue Periférico (SP)².

A presença de antígenos específicos caracteriza as diferentes linhagens e assim, as leucemias agudas humanas são amplamente definidas como tendo diferenciação mielóide ou linfóide de acordo com a expressão de antígenos de superfície e/ou citoplasmático associados com as expressões antigênicas normais mielóides ou linfóides B/T³.

De acordo com relatos anteriores, aproximadamente 46% dos casos das leucemias linfoblásticas agudas (LLAs) e 48% dos casos das leucemias mielóides agudas (LMAs) têm expressão aberrante de pelo menos um antígeno associado a uma outra linhagem celular, sendo mais comuns as expressões do CD7, CD56 e CD20, na LMA e Cd33, na LLA⁴⁵

Recebido em 03/03/2008 Aprovado em 15/02/2010 ¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – Hemope ²Universidade de Pernambuco – UPE A definição de fenótipos aberrantes está freqüentemente associada às leucemias identificadas com: 1) co-expressão de marcadores que raramente ou nunca são encontrados simultaneamente na diferenciação hematopoética normal, 2) com a superexpressão de um marcador específico de linhagem celular, ou 3) com a ausência de um marcador, que configura assincronia maturativa da célula ⁶⁻⁹.

Por outro lado, para distinguir casos de leucemias bifenotípicas daqueles casos de LLA e LMA que possuem expressão aberrante de antígenos, o Grupo Europeu de Caracterização Imunológica das Leucemias Agudas (EGIL) estabeleceu um sistema de escore em que antígenos detectados pela imunofenotipagem, por citometria de fluxo, eram pontuados em 0,5, 1 e 2 pontos dependendo da sua especificidade (tabela 1) para as linhagens mielóide, linfóide B e linfóide T. Casos tendo escore maior que 2 tanto para os antígenos mielóides como antígenos de linhagem celular B ou T são designados como leucemias agudas bifenotípicas ¹⁰⁻¹¹.

O mecanismo pelo qual ocorre a expressão de FA no desenvolvimento das LAs ainda permanece obscuro, no entanto, já é possível estabelecer associações entre estas expressões incomuns e outras características biológicas da doença, como as associações com translocações cromossômicas. Além disso, os imunofenótipos aberrantes são reconhecidamente instrumentos de grande importância na detecção de doença residual mínima (DRM) ¹²⁻¹³.

Com a intenção de avaliar a freqüência de FA em diversas faixas etárias nos diferentes subtipos de leucemias, foram analisados os imunofenótipos de 213 pacientes portadores de leucemias agudas diagnosticados na Fundação Hemope, auxiliando na definição de um perfil da doença em nossa região e na detecção de DRM.

Tabela 1: Sistema de pontuação EGIL para definição de leucemias mistas ou bifenotípicas.

PONTUAÇÃO	LINFÓIDE B	LINFÓIDE T	MIELÓIDE
0,5	TdT	CD1a	CD117
	CD24	CD7	CD64
		TdT	CD15
			CD14
1	CD19	CD2	CD13
	CD10	CD5	CD33
	CD20	CD8	CDw65
		CD10	
2	CD79a	CD3 (cyt/m)	anti-MPO
	IgM (cyt)	anti-TCR α/β	
	CD22 (cyt)	anti-TCR γ/δ	

Fonte: EGIL, 1995

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS: O estudo contou com amostras de SP e MO, sem restrição de idade, sexo ou etnia. A análise de todos os pacientes foi feita no momento do diagnóstico estando estes isentos de tratamento quimioterápico e radioterápico.

CITOMORFOLOGIA E CITOQUÍMICA: A análise inicial para validação de leucemia aguda foi feita com base nos critérios

estabelecidos pela OMS e também foram empregadas as técnicas citoquímicas do Sudan-Black ou mieloperoxidase, esterases inespecíficas (ANAE e butirato) e PAS.

IMUNOFENOTIPAGEM: O estudo dos antígenos celulares foi feito em SP ou MO, utilizando um amplo painel de Anticorpos Monoclonais (AcMos) para identificar linhagens mielóide e linfóide, e teve como instrumento o citômetro de fluxo do tipo FACS-Calibur, da Becton-Dickinson (S. Jose, CA).

O processamento das amostras para a imunofenotipagem obedeceu as seguintes etapas:

O sangue total foi submetido a centrifugação com Ficoll-Hypague (Sigma, St. Louis, MO; densidade 1077), onde as células foram separadas por gradiente de densidade. A camada de células mononucleares foi retirada e posteriormente lavada em RPMI (RPMI-medium 1640/Sigma, St. Louis, Missouri, USA) suplementado com soro bovino fetal a 10%. O "pellet" celular foi ressuspendido, sendo a suspensão ajustada para uma quantidade de 2000 células por mm3. O painel de AcMos foi aplicado e as amostras foram incubadas em local protegido de luz durante 20 minutos. A avaliação no citômetro utilizou o software CellQuest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), As células de interesse foram delimitadas através da análise do gráfico de dispersão frontal e lateral de luz (FSC x SSC), sendo adquirido um total de 10.000 células por amostra. A análise dos dados foi feita através do percentual de células positivas para determinado marcador celular, considerando-se expressão positiva um percentual igual ou maior a 20% de células marcadas na população. Para avaliação do antígeno mieloperoxidase (MPO) o "cut-off" foi de 10%.

RESULTADOS

A imunofenotipagem dos 213 casos mostrou expressão aberrante de antígenos em 96 casos, correspondendo a 45% das amostras (figura 1).

Quanto a linhagem celular 118 (55,5%) eram LMAs e 95 (44,5%) LLAs, dentre estas, 70 eram de linhagem B e 25 de linhagem T.

Entre as LMAs, 55 casos (47%) exibiram FA, e considerando a faixa etária esta expressão predominou na idade adulta, 18 a 65 anos (figura 2).

Para as LLAs B os FA foram encontrados em 28 casos (40%), predominando entre os adultos, conforme a figura 3.

As LLAs T foram as menos freqüentes entre as leucemias analisadas, com apenas 25 casos, porém a presença de FA neste grupo foi maior, sendo evidenciada em 13 pacientes (52%). Quando relacionado com a idade, verifica-se que a faixa etária com maior presença de FA foi também a do adulto, com freqüência de 69% (figura 4).

Ao analisar quais antígenos aberrantes foram mais expressos verificou-se que nas LMAs predominaram os antígeno CD7 E CD56. Com relação às LLAs, observou-se tanto nas de linhagem B quanto nas T maior expressão do CD33 seguido de Cd13.

- Leucemias Agudas sem Expressão Aberrante de Antígenos
- Leucemias Agudas sem Expressão Aberrante de Antígenos



Figura 1: Percentagem de FA nos pacientes com LAs

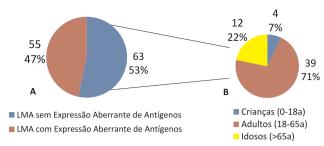


Figura 2: A) Distribuição de FA entre as LMAs B) Relação entre FA nas LMAs e faixa etária

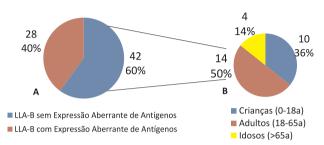


Figura 3: A) Distribuição de FA entre as LLAs B B) Relação entre FA nas LLAs B e faixa etária

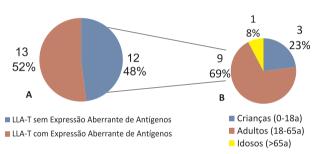


Figura 4: A) Distribuição de FA entre as LLAs T B) Relação entre FA nas LLAs T e faixa etária

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A freqüência de antígenos aberrantes nas LAs diagnosticadas na Fundação Hemope, foi de 45% e correspondeu àquela relatada na literatura onde essa expressão varia entre 30 a 50% ¹³⁻¹⁷.

A maior freqüência de LMA é observada no adulto aumentando progressivamente com a idade, e a literatura não aponta predomínio de expressão aberrante de antígenos por diferentes faixas etárias neste tipo de leucemia ¹⁴. Assim a maior freqüência de FA entre os adultos no presente estudo parece representar apenas o predomínio desta faixa etária e não um fenômeno biológico.

A LLA-B predomina na faixa etária de 0-18, onde segundo a literatura ocorre a maior freqüência de FA¹², porém no adulto a observação de antígenos aberrantes também é freqüente sendo acompanhada muitas vezes por alterações genotípicas como a presença do cromossomo Philadelphia².

No presente estudo observou-se uma inversão na incidência da LLA-B quanto à faixa etária, onde 50% dos pacientes eram adultos e desta forma atribuímos a esta característica da amostra o predomínio de FA neste grupo.

A LLA-T corresponde de 20 a 25% dos casos de leucemias agudas no adulto². Neste estudo, o predomínio de

pacientes adultos pode ter contribuído para a maior freqüência de FA nesta faixa etária, uma vez que não há relatos na literatura de predominância de FA na LLA-T em nenhum grupo etário¹⁴.

A maior freqüência de expressão aberrante de CD7 e CD56 nas LMAs e de CD33 e CD13 entre as LLAs , é também relatada em outros trabalhos 12,13,18 .

Finalmente, a presença de antígenos aberrantes mielóides em leucemias linfóides e antígenos aberrantes linfóides em leucemias mielóides apesar de aparentemente não significar nenhuma característica biológica específica e nem influenciar o curso clínico, mostra-se uma ferramenta útil e importante na detecção da DRM, a ser aplicada no nosso servico.

REFERÊNCIAS

- 1. JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC, p.17-26, 2001.
- 2. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Leucemia Mielóide Crônica. Variantes da Leucemia Mielóide Crônica. In: Hematologia Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 48, p.539-550, 2004.
- 3. HRUSAK, O.; MACDONALD, A.P. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Leukemia. 16:1233-58, 2002.
- KHALIDI, H.S.; CHANG, K.L.; MEDEIROS, L.J. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French-American-British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. Am J Clin Pathol. 111:467–476, 1999.
- 5. FRATER, J.L.; YASSEN, R.N.; PETERSON, L.C.; TALLMAN, M.S.; GOOLSBY, C.L. Biphenotypic acute leukemia with coexpression of CD79a and markers of myeloid lineage. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 127 (3), 356-359, 2002.
- BRADSTOCK, K.F.; KIRK, J.; GRIMSLEY, P.G.; KABRAL, A.; HUGHES, W.G Unusual immunophenotypes in acute leukaemias: incidence and clinical correlations. Br J Haematol. 72:512-8, 1989
- 7. TERSTAPPEN, L.W.; KÖNEMANN, S.; SAFFORD, M.; LOKEN, M.R.; ZURLUTTER, K.; BÜCHNER, T.; HIDDEMANN, W.; WÖRMANN, B. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part 1. Significance of light scattering properties. Leukemia. 5:315-21, 1991.
- R. CAMPANA, D.; COUSTAN-SMITH, E.; JANOSSY, G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood. 76:163-71, 1990.
- DREXLER, H.G.; THIEL, E.; LUDWIG, W.D. Acute myeloid leukemias expressing lymphoidassociated antigens: diagnostic incidence and prognostic significance. Leukemia. 7:489-98, 1993.
- 10. BRUNNING, R.D.; MATUTES, E.; BOROWITZ, M.J. Acute leukemias of ambiguous lineage. Pathology and Genetics of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press. 106–107. 2001.
- 11. BENE, M.C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia. 9:1783–1786, 1995.
- 12.EMERENCIANO, M.; BOSSA, Y.; ZANROSSO, C.W.; ALENCAR, D.M.; CAMPOS, M.M.; DOBBIN, F.; CARRIÇO, K.; OLIVEIRA, M.S.P. Freqüência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. Revista Brasileira de Cancerologia. 50 (3), 183-189, 2004.
- 13.CHEN, S.W.; LI, C.F.; CHUANG, S.S.; TZENG, C.C.; HSIEH, Y.C.; LEE, P.S.; CHEN, C.H.; HHUANG, W.T.; HWANG, W.S.; TSAO, C.J. Aberrant co-expression of CD19 and CD56 as surrogate markers of acute myeloid leukemias with t(8;21) in Taiwan. International Journal of Laboratory Hematology. doi:10.1111/j.1751-553X.2007.00913.x. 2007.
- 14.KUREĆ, A.S.; BELAIR, P.B.; BARRET, D.M.; DAVEY, F.R.; STEFANU, C.; DUBOWY, R.L. Significance of aberrant immunophenotypes in childhood acute lymphoid leukemia. Cancer. 67, 3081-3086, 1991.
- 15.DOGRA, S.; MANGIPUDY, J.P; ASATIANI, E.; GAMES, R.; COHEN, P.; KESSLER, C.; MAVROMATIS, B.; SHAD, A.; CHESON, B.D.; OZDEMIRLI, M. Aberrant immunophenotype in acute myeloid leukemia (AML): High frequency and association with dysplasia. Journal of Clinical Oncology, 25 (18), 2007.
- 16.UCKUN, F.M.; GAYNON, P.; SATHER, H.; ARTHUR, D.; TRIGG, M.; TUBERGEN, D.; NACHMAN, J.; STEINHERZ, P.; SENSEL, M.G.; REAMAN, G.R. Clinical features and treatment outcome of children with biphenotypic CD2+ CD19+ acute lymphoblastic leukemia: A children's cancer group study. Blood. 89 (7), 2488-2493, 1997.
- 17.ZHU, H.; NIU, T.; MENG, W.; XU, C.; LEI, S. Immunophenotype of acute leukemia and its clinical significance. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12599447, acesso em 29 de fevereiro de 2008.
- 18,CAMPANA, D. & BEHM, F.G. Immunophenotyping of leukemia. J Immunol Methods. 243:59-75, 2000.

ENDERECO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Joel Henrique Teles dos Santos

Laboratório de Imunofenotipagem, Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE), Fundação Hemope

Rua Joaquim Nabuco,171 - Graças

Recife/PE - CEP 52011-900

Tel.: (81) 3416-4655 Fax.: (81) 3416-4638

Email: jhteles@hotmail.com

Difusão de Microrganismos, Inibição do Crescimento e Atividade Biocida do "Cianoacrilato Super Bonder[®]"

Microorganisms Diffusion, Growth Inhibition and Biocide Activity of the "Super Bonder® Cyanoacrylate"

Lucas do Amaral Santos¹, Leonardo de Souza Vasconcellos², Andy Petroianu³

RESUMO - Os objetivos do presente trabalho foram avaliar se o Super Bonder® apresenta algum risco de veiculação de microorganismos em humanos e se possui alguma atividade bactericida ou bacteriostática para cocos gram-positivo. Foi testada a esterilidade de dez tubos do adesivo nos meios de cultivo BHI, agar sangue, agar Sabouraud com cloranfenicol e Mycosel. A provável ação bactericida ou bacteriostática do adesivo Super Bonder®, *in vitro*, foi verificada utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* e *staphylococcus epidermidir*, semeadas em meio de cultura agar sangue e agar Müeller-Hinton. Não foi observado crescimento de microrganismos nos meios de cultura contendo somente gotas de Super Bonder®. No agarsangue, observou-se ausência de beta-hemólise e de crescimento bacteriano nas áreas de sobreposição do adesivo. Em agarMueller-Hinton, houve rarefação de colônias ao redor das gotas do cianoacrilato. Os dados deste trabalho mostram que a cola de cianoacrilato Super Bonder® parece ser livre de contaminação por microrganismos e apresenta possível atividade bacteriostática *in vitro*.

Palavras-Chave: Super Bonder®; Cianoacrilato; Esterilidade, Difusão de microorganismos, Inibição do crescimento, Atividade bactericida, Atividade bacteriostática.

SUMMARY - The purposes of the present study were to verify the human's risk of the Super Bonder® microorganisms' diffusion and the probably biocide or bacteriostatic adhesive's activity for gram-positive cocci. The sterility of ten tubes of the adhesive was tested in BHI culture tube and blood-agar, agar-Sabouraud with cloranfenicol and Mycosel culture plates. The biocide or bacteriostatic activity of the Super Bonder® adhesive, in vitro, was verified using cultures of Staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis, seeded on blood-agar and agar-Müeller-Hinton culture plates. No microorganisms' growth was observed in the culture plates containing only drops of the Super Bonder®. In agar-Müeller-Hinton, zones with reduced number of colonies were noticed around the cyanoacrylate's drops. In blood-agar, absence of haemolysis-beta and bacterial growth were observed in the covered areas of the adhesive. According to the results of this investigation, the Super Bonder® cyanoacrylate is free of microorganisms' diffusion and probably inhibits in vitro the bacterial growth.

Keywords: Super Bonder[®]; Cyanoacrylate; Sterility; Microorganisms' diffusion, Growth inhibition, Bactericide activity, Bacteriostatic activity

INTRODUÇÃO

A utilização de adesivos teciduais em concomitância ou substituição às suturas com fios convencionais abriu nova forma de abordagem de feridas cirúrgicas ou traumáticas^{3,5}. Com a utilização das colas biológicas, os anestésicos locais para os procedimentos de síntese não são mais necessários, reduzindo a dor e a ansiedade do paciente^{22,23}. As colas biológicas também aboliram a retirada dos pontos, reduziram o emprego de materiais cirúrgicos e, conseqüentemente, diminuíram os custos desses procedimentos^{18,30}.

A adoção de adesivos para a síntese de tecidos, passou a ser estudada mais intensamente a partir da década de 1940⁴. Inicialmente, utilizaram-se as colas de origem biológica e, a partir de 1962, os polímeros sintéticos, principalmente os compostos de metil, butil, isobutil e etil-cianoacrilato³.

A cola comercial Super Bonder® (Henkel Loctite Adesivos Ltda., Brasil) é constituída basicamente de éster

de cianoacrilato (etil-cianocrilato), que se polimeriza rapidamente durante o processo de adesão por mecanismos aniônicos².²⁴. Como adesivo, ela apresenta vasta aplicação em metais, porcelana, plásticos, madeira, couro e papelão, dentre outros⁴. Embora ainda não seja preconizada a sua utilização em tecidos biológicos, é crescente o número de trabalhos na literatura que aborda o uso tópico desse adesivo em seres humanos^{6,11,15,22,24,25,29,30}.

Muitos trabalhos recomendam a utilização do Super Bonder[®] na reparação de perfurações de córnea^{7,8,10,17}, por acreditar que não seja tóxico e por apresentar custos inferiores quando comparado com técnicas de sutura convencionais, que chegam a custar de cinco a dez vezes mais³⁰. Por outro lado, alguns pesquisadores sugerem um efeito tóxico desse adesivo em uso humano^{19,28,29}. GARRIDO *et al.*¹⁰, alertaram que o uso exagerado desse adesivo, em perfurações de córnea maiores

Recebido em 26/03/2009 Aprovado em 26/07/2010

¹Acadêmico de Medicina da Faculdade de Medicina da UFMG

²Professor Assistente do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG, Patologista Clínico, Sócio da SBPC/ML,
Doutorando em Medicina pela UFMG, Representante Científico do Departamento de Patologia Clínica da Associação Médica de Minas Gerais.

³Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina - UFMG, Docente Livre da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Docente
Livre da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP, Doutor em Fisiologia e Farmacologia – ICB / UFMG, Pesquisador IA do CNPq.

que 3 mm, há maior risco à toxicidade, com presença de reações inflamatórias intensas, vascularização e necrose da córnea ao redor da área tratada¹⁰.

Além de sua controversa toxicidade^{1,17}, outro fator que deve ser bem avaliado antes de sua indicação na correção de feridas humanas consiste na possível veiculação de microorganismos para o tecido já lesado^{17,18,19}. Isso, porque o Super Bonder[®], na forma como é comercializado, não apresenta em sua embalagem indicações de esterilização ou técnicas que autorizam seu uso em tecidos humanos^{10,11}. Do mesmo modo, não há relatos de autorização da ANVISA ou de qualquer órgão regulador nacional ou regional quanto à sua adoção para finalidades médicas.

Mesmo diante dessas lacunas, o Super Bonder® vem sendo frequentemente utilizado por vários profissionais de diversas áreas da saúde: na oftalmologia^{8,7,10,17,19,29,30}, na otorrinolaringologia^{2,22,23,28}, nas cirurgias plástica^{6,18}, geral^{24,27} e cardiovascular^{3,6,14}, na ortopedia^{11,19,25} e na neurocirurgia^{15,19}, dentre outras. Na odontologia¹, especialmente na reparação de próteses dentárias, este adesivo também vem mostrando bons resultados, não sendo evidenciados sinal de inflamação ou toxicidade local⁵. Seu eficiente e rápido poder adesivo aliado à simplicidade de manuseio, o baixo custo e sua ampla disponibilidade também contribuíram para sua maior adoção¹8.

Alguns autores relataram efeito bactericida *in vitro* dos adesivos à base de cianoacrilato, principalmente quanto aos microrganismos gram-positivo^{7,12,13,14,17,29}. Estudos *in vitro* encontraram efeito inibitório, tanto do isobutil-cianoacrilato quanto do alquil-2-cianoacrilato, contra microrganismos grampositivos¹⁷. Entretanto, poucos trabalhos avaliaram essa possível função nos adesivos à base de etil-cianoacrilato^{17,29}.

A emergente utilização do adesivo Super Bonder® nas diversas áreas da saúde e da carência de trabalhos na literatura que confirmem a segurança de seu uso em seres humanos, motivaram este estudo.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o Super Bonder® apresenta algum risco de veiculação de microrganismos em humanos, ou seja, se é estéril, bem como se possui alguma atividade bactericida ou bacteriostática para gram-positivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas dez bisnagas de Super Bonder® novas e fechadas de fábrica, todas dentro do prazo de validade, de acordo com a embalagem.

Para o teste de ausência de veiculação de microorganismos, foram aplicadas cinco gotas de cada bisnaga em quatro diferentes meios de cultura: meio de cultivo líquido BHI (Brain Heart Infusion - Biobrás®), agar sangue (Biobrás®), agar Sabouraud com cloranfenicol (Diagnostics Pasteur®) e Mycosel (Merck®). Após a inoculação, os meios BHI e agar sangue foram incubados a 37°C durante sete dias e examinados diariamente para verificação de crescimento microbiano. Os meios agar Sabouraud e Mycosel foram incubados a 25°C, durante 30 dias. No BHI, avaliou-se a

transparência e a coloração pelo Gram. Nos demais, observouse possível crescimento de colônias. Para cada tipo de meio utilizado no teste estudou-se um segundo similar, como controle, sem a presença do adesivo de cianoacrilato.

Para verificar a provável ação bactericida ou bacteriostática do adesivo Super Bonder® investigaram-se, in vitro, dois tipos comuns de bactérias Gram-positivas: Staphylococcus aureus e Strepcococcus epidermids. Para cada uma das dez bisnagas do adesivo testado, confeccionaram-se duas placas: uma contendo agar Müeller-Hinton e outra com agar sangue.

Em cada metade das placas de agar Müeller-Hinton foram semeadas com alça de platina, pela técnica de esgotamento, colônias das duas bactérias estudadas. Posteriormente, foram pingadas duas gotas do Super Bonder® sobre cada área semeada. A presença de crescimento bacteriano e a formação de halos de inibição ao redor de cada gota do adesivo foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37°C. Na porção mediana de cada placa, região preservada de semeadura, pingou-se uma gota do adesivo como controle.

Nas placas contendo agar sangue semeou-se Staphilococcus aureus na superfície e em micro escavações com a alça de platina. Posteriormente, a cola de cianoacrilato foi gotejada sobre essas semeaduras e microescavações, de modo a cobri-las totalmente. O crescimento bacteriano foi avaliado após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37° C. Decorrido esse prazo, os adesivos foram removidos e foi coletada amostra de material logo abaixo da área de aplicação do adesivo para análise microbiológica por meio da coloração pelo Gram.

RESULTADOS

Em todos os meios, ocorreu polimerização do adesivo logo após a sua aplicação. Não se observou crescimento de microrganismos nos meios BHI e ágarsangue em presença da cola de cianoacrilato, durante os sete dias de acompanhamento (Fig. 1A). Nos meios seletivos para fungos, também não se observou crescimento, decorridos os 30 dias de estudo. Nos controles, também não houve crescimento bacteriano ou fúngico.

Nas placas de agar Mueller-Hinton, houve crescimento bacteriano de ambas as cepas testadas, sendo observada rarefação de colônias ao redor das gotas do adesivo, ou seja, a formação de pequenos halos adjacentes ao Super Bonder® (Fig. 1B).

Nas placas com agar sangue, houve crescimento das semeaduras de *S. aureus* na ausência do adesivo, evidenciada pela presença de beta-hemólise. Já nas áreas das semeaduras e das microescavações recobertas pelo cianoacrilato, esse crescimento mostrou-se limitado (Fig. 1C). Nos materiais retirados logo abaixo do local de aplicação do adesivo foram identificados alguns cocos gram positivo.



Figura 1 – A) Ausência de microbiota após 72 horas de experimento, em agar-sangue.

B) Na área destacada há rarefação de colônias de Streptococcus epidermids em torno da gota de Super Bonder®, em agar-Müeller-Hinton. C) Ausência de beta-hemólise e de crescimento de Staphilococcus aureus nas áreas de sobreposição do cianoacrilato, em agar sangue.

DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa sobre cicatrização e utilização de adesivos biológicos e sintéticos^{21,26}. Dentre os adesivos teciduais mais utilizados na clínica cirúrgica, a cola de fibrina, a base de gelatina, resorcina e formaldeído (GRF-Colagel®) e os adesivos à base de cianoacrilato (Hystoacril Blue®) possuem como vantagem as propriedades hemostáticas e vedantes, além da comprovação de sua não toxicidade³.¹¹². Por outro lado, o custo elevado e sua pouca disponibilidade tornam sua utilização menos freqüente¹³. Como conseqüência, é cada vez mais frequente a busca por novos adesivos sintéticos para uso em humanos³.⁵.

Ao contrário do uso *in vivo*, já estabelecido para várias colas biológicas, as recomendações técnicas do adesivo Super Bonder® não indicam a sua utilização em humanos^{2,16}. Além de sua controversa toxicidade, essa limitação decorre de não passar por processo de esterilização durante sua fabricação^{1,18,29}.

No presente trabalho, quatro tipos distintos de meios de cultura foram estudados. O meio líquido BHI foi adotado com a finalidade de pesquisar crescimento de microrganismos em geral. O meio de cultura agar sangue teve como objetivo a busca por bactérias Gram-positivo. Já os meios agar Sabouraud com cloranfenicol e o Mycosel foram necessários para pesquisa específica de fungos e, por isso, cultivados em estufa a 25°C, cuja temperatura é pouco adequada para crescimento bacteriano. Tendo em vista que os fungos apresentam crescimento mais retardado do que as bactérias, aguardou-se um período maior para sua avaliação²⁰.

Embora não seja apresentado como um produto "estéril", os dez tubos de Super Bonder® testados no presente trabalho não mostraram veiculação de microrganismo nos meios pesquisados, corroborando alguns achados da literatura 17,29. UEDA *et al.*, (2004), avaliando a esterilidade do Super Bonder® após sete dias de incubação em placas de agar sangue, agar chocolate e agar Sabouraud, concluíram que esse adesivo poderia ser utilizado de forma segura em humanos 29. Em outras áreas cirúrgicas, muitos autores que haviam incorporado esse adesivo em suas rotinas, também não observaram risco de infecção 22,23.

Quanto às propriedades bactericida e bacteriostática dos adesivos à base de etil-cianoacrilato, poucos são os trabalhos na literatura^{7,17,29}. Alguns autores estudaram, *in vitro*, a possibilidade de o Super Bonder[®] apresentar ação biocida para os seguintes microrganismos: Staphylococcus xylosis,

Staphylococcus aureus e Pseudomonas aerugina. Porém, não foram demonstrados efeitos bacteriostático ou bactericida desse adesivo nessas bactérias, alertando para a necessidade da manutenção de antibioticoterapia apropriada²⁹.

No presente trabalho, apenas dois tipos de bactérias gram-positivo foram avaliadas: *S aureus e S epidermids;* devido à facilidade de sua obtenção, bem como por serem agentes constituintes da microbiota infectante humana^{17,20}. Por limitações técnicas, não foi possível avaliar a esterilidade do Super Bonder[®] em meios de cultura especiais para pesquisa de outros patógenos, tais como anaeróbios, protozoários e micobactérias.

A aparente rarefação de colônias ao redor das gotas de cianoacrilato nas placas de agar Müeller-Hinton poderia ser compreendida como provável ação bactericida ou bacteriostática do Super Bonder® para as duas cepas testadas. Entretanto, esse achado deve ser interpretado com cautela, tendo em vista que não houve a formação de um halo de inibição verdadeiro, com ausência completa de bactérias, como aqueles encontrados em testes rotineiros de antibiograma²º. Contrapondo alguns trabalhos na literaturam, seria prudente concluir que os dados apresentados podem indicar uma possível interferência do Super Bonder® no crescimento dos cocos gram positivo estudados.

O provável efeito bactericida ou bacteriostático do adesivo também foi pesquisado quanto a presença de betahemólise após cultivo de S aureus em agar sangue, seja na forma superficial (por semeadura), seja profunda (nas microescavações). A ausência de crescimento bacteriano. superficial ou em áreas mais profundas do agar, aliada à não formação de beta-hemólise, foram dados importantes que poderiam corroborar apenas o efeito bacteriostático do Super Bonder[®]. Isso, porque a identificação de alguns cocos Gram positivo nas áreas sobrepostas à cola, logo após sua retirada, contrapõe-se à possível ação bactericida do cianoacrilato. Outra justificativa seria a provável permanência dos microorganismos em forma latente ao serem envolvidos pelo cianoacrilato polimerizado4. Caso essa hipótese realmente ocorra, também reforçaria a ação bacteriostática desse adesivo. Entretanto, julgamos prudente que novos trabalhos sejam necessários para a pesquisa da ação bactericida do Super Bonder®.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, concluiu-se que a cola comercial de cianoacrilato Super Bonder® parece ser livre de contaminação por bactérias e fungos, pelos meios de cultura avaliados. Uma possível ação bacteriostática do adesivo de cianoacrilato pode ser corroborada pela dificuldade de crescimento *in vitro* das bactérias Gram positivo testadas. Entretanto, para confirmar sua provável ação bactericida, novos trabalhos serão necessários.

REFERÊNCIAS

- 1. AZEVEDO, C.L.; MARQUES, M.M.; BOMBANA, A.C. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials: an in vitro analysis. Pesqui. Odontol. Bras., 17 (2), 13-8, 2003
- 2. CARVALHO FILHO, I.B.; CALDAS JÚNIOR, A.F.; VIDAL, H.G. Uso do etil-cianoacrilato (Super Bonder) na cicatrização de feridas de línguas de ratos. Rev. do CROMG; 3(1):10-3, 1997. 3. COOPER, C.W.; FALB, R.D. Surgical adhesives. Ann. New York Acad. Sci., 146(2), 214-24, 1968
- 4. COOVER JUNIOR, H.W.; JOYNER, F.B.; SHEARER JUNIOR, N.H.; WICKER JUNIOR, T.H. Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesive. Spe. J., 5(3), 413-7, 1959.
- 5. CUETO, H.I. A little bit of history: the first direct bonding in orthodontia. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., 98 (3), 276-7, 1990.
- 6. DIAZ BARREIRO, P.G.; SERVIN RAMIREZ, J.F.; DIAZ LOPEZ, D.E. Experience with 10 cases of cutaneous suture with ethyl-cyanoacrylate adhesive. Ginecol. Obstet. Mex., 63(1), 10-
- 7. EIFERMAN, R.A.; SNYDER, J.W. Antibacterial effect of cyanoacrylate glue. Arch. Ophthalmol., 101 (6), 958-60, 1983.
- 8. FELBERG, S.; LAKE, J.C.; LIMA, F.A.; ATIQUE, D.; NAUFAL, S.C.; DANTAS, P.E.C.;
- NISHIWAKI-DANTAS, M.C. Adesivo de cianoacrilato no tratamento de afinamentos e perfurações corneais: técnica e resultados. Arq. Bras. Oftalmol., 66 (3), 345-9, 2003.
 9. FERRIGNO, C.R.A.; STOPIGLIA, A.J.; BECHARA, G.H.; FUTEMA, F. Comparação entre os
- efeitos da mistura gelatina-resorcina-formaldeído e do N-butil-cianoacrilato em angiorrafias de veia jugular externa de coelhos (Oryctolagus cuniculus). Acta. Cir. Bras., 18 (3),1-7, 2003. 10. GARRIDO, C.; TELES, D., KOJI, W., FREITAS, D. Cola terapêutica de cianoacrilato nas
- perfurações corneanas. Arq. Bras. Oftalmol., 62 (6), 683-6, 1999.
- 11. GONZALES, E.; ORTA, J., NIEMSHIK, L.; GALERA, R.; ONAY, R.; ROJAS, O. Ethyl-2cyanoacrylate fixation of the cranial bone flap after craniotomy, Surg. Neurol., 53 (3), 288-9.
- 12. JANDINSKI, J.; SONIS, S. In vitro effects of isobutyl cyanoacrylate on four types of bacteria. J. Dent. Res., 50, 1557-8, 1971.
- 13.KAPLAN, G.: BORCHARDT, K.A. The antibacterial properties of methyl 2-cyanoacrylate in the nonsuture closure of experimentally infected wounds: preliminary report. Plast. Reconstr. Surg., 38 (6), 507-11, 1966,
- 14. KAPLAN, M.; BAYSAL, K. In vitro toxicity test of ethyl 2-cyanoacrylate, a tissue adhesive used in cardiovascular surgery, by fibroblast cell culture method. Heart Surg. Forum, 8 (3), 169-72,
- 15.LANDERGREN, T.; RISLING, M.; BRAGE, A.; PERSSON, J.K. Long-term results of peripheral nerve repair: a comparison of nerve anastomosis with ethyl-cyanoacrylate and epineural sutures. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg., 40 (2), 65-72, 2006. 16.MAIA, C.C.; CRUZ FILHO, M.; ABRAHÃO, S.; BAPTISTA SILVA, J.C.C.; GOMES, P.O.;
- SOUFEN, M.A.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y. Efeito do etil-cianoacrilato na parede venosa de cães. Acta. Cir. Bras., 17(1), 55-61, 2002.

- 17 MANZANO, R.P.A.; NAUFAL, S.C.; HIDA, R.Y.; GUARNIERI, L.O.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C. Antibacterial analysis in vitro of ethyl-cyanoacrylate against ocular pathogens. Cornea, 25
- 18.MORANDINI, W.; ORTIZ, V. Adesivos biológicos em cirurgia. Acta. Cir. Bras., 7(2), 80-5, 1992
- 19 MOSCHOS M. DROUTSAS D. BOUSSALIS P. TSIOULIAS G. CLINICAL experience with cyanoacrylate tissue adhesive, Doc. Ophthalmol., 93 (3), 237-45, 1996.
- 20.MURRAY, R.P. Microbiologia médica. Rio de Janeiro, R.J.: Guanabara-Koogan, 2000.
- 21.PETROIANU, A.; SILVA, A.A.; VASCONCELLOS, L.S. Comparação entre cola biológica e sutura em cicatrização da pele. Rev. Col. Br. Cir., 28 (4), 249-253, 2001.
 22.RONIS. M.L. HARWICK, J.D.: FUNG. R.: DELLAVECCHIA. M. Review of cvanoacrylate
- tissue glues with emphasis on their otorhinolaryngological applications. Laryngoscope, 94 (2), 210-3, 1984
- 23.SAMMARTINO, R.T.; TORRISI, V.; DISCA, C.; VASILE, S. Use of tissue adhesives in oral
- surgery. Stomatol. Mediterr., 10 (4), 287-90, 1990. 24.SANTOS, G.M.; LACAZ NETTO, R.; SANTOS, L.M.; OKAMOTO, T.; ROCHA, R.F. Uso do Super-Bonder no reparo das feridas cirúrgicas. Rev. Gaúcha Odontol., 38 (6), 435-9, 1990.
- 25. SASKA, S.; ROSLINDO, E.B.; BOLINI, P.D.A.; MINARELLI-GASPAR, A.M. Uso do adesivo à base de etil-cianoacrilato na reparação óssea. Rev. Br. Ortop., 38 (8), 461-7. 26.SOUZA, T.F.C.; SILVA, A.L. Estudo experimental das entero-anastomose com o metil-2-
- cianoacrilato, em cobaias. Acta. Cir. Bras., 3 (1), 80-8, 1988.
- 27. TEBALA, G.D.; CERIATI, F.; CERIATI, E.; VECCHIOLI, A.; NORI, S. The use of cyanoacrylate
- tissue adhesive in high-risk intestinal anastomoses. J. Surg., 25 (12), 1069-72, 1995 28.TORIUMI, D.M.; RASLAN, W.F.; FRIEDMAN, M.; TARDY, M.E. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives; a comparative study Arch, Otolaryngol, Head Neck Surg., 116 (5), 546-50,
- 29.UEDA, E.L.; HOFLING-LIMA, A.L.; SOUSA, L.B.; TONGU, M.S.; YU, M.C.Z.; LIMA, A.A.S. Avaliação de um cianoacrilato quanto à esterilidade e atividade biocida. Arq. Bras. Oftalmol., 67 (3), 397-400, 2004.
- 30.UEDA. E.L.; OTTAIANO, J.A.A. Comparação dos gastos com material para reparação de perfurações de córnea com cola de cianoacrilato e sutura de córnea, Arg. Bras. Oftalmol. 67 (1), 97-101, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Andy Petroianu

Av. Afonso Pena, nº 1626, Apto 1901

CEP 30130-005, Belo Horizonte, Minas Gerais

FONE/FAX: (31) 3274-7744

E-MAIL: petroian@medicina.ufmg.br

Estudo Epidemiológico da Pitiríase Versicolor na Cidade de João Pessoa, PB, de 1999 a 2008*

Epidemiological studies of Pityriasis Versicolor in the city of João Pessoa, PB, from 1999 to 2008

Lizandro Leite Brito1; Edeltrudes Oliveira Lima2; Egberto Santos Carmo3; Fátima F. P. Carvalho4; Priscilla B. S. de Albuquerque5; Mariana M. P. de Figueirêdo5

RESUMO - A Pitíriase Versicolor (PV) é uma micose superficial causada por leveduras do gênero *Malassezia*. Caracterizase por manchas de tonalidades diversas, arredondadas, que podem formar placas, com descamação furfurácea. O diagnóstico de PV é clínico, associado ao exame micológico direto e cultura. Buscou-se avaliar a epidemiologia da PV na cidade de João Pessoa, PB, correlacionando sexo, faixa etária, raça, localizações das lesões e exame direto e cultura. O estudo exploratório e descritivo foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS da Universidade Federal da Paraíba de 1999 a 2008. Em 196 pacientes com suspeita clínica de PV, houve predomínio no gênero feminino (62,24%). A faixa etária de 21 a 30 anos de idade foi a mais acometida. Houve registro de 53,57% pardos, 46,42% brancos, sem registro de negros. A região anatômica mais envolvida foi o tronco (71,36%). O exame direto e cultura foram realizados para confirmar o diagnóstico. A PV ocorre em todas as idades, em especial adolescentes e adultos, sendo o gênero feminino e indivíduos da cor parda os mais afetados.

Palavras-Chave: Pitiríase Versicolor, Malassezia, epidemiologia.

SUMMARY - Pityriasis versicolor (PV) is a superficial mycosis caused by yeasts of the genus Malassezia. It is characterized by round patches of various shades, which can form plaques with desquamation furfuracea. The diagnosis of PV is clinical and it is associated with the direct mycological examination and culture. The exploratory and descriptive study was conducted at the Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences /CCS, Universidade Federal da Paraíba from 1999 to 2008. In 196 patients with clinical suspicion of PV, there was a predominance in females (62.24%). The age group 21 to 30 years of age was the most affected. There was record of 53.57% brown, 46.42% white, with no record of blacks. The most involved anatomical region was the trunk (71.36%). The direct examination and culture were performed to confirm the diagnosis. The PV occurs in all ages, especially adolescents and adults, being the females of brown color the most affected individuals.

Keywords: Pityriasis Versicolor, Malassezia, epidemiology.

INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos vivos resistentes que decompõem a matéria orgânica, vivendo no solo, em animais e no homem, no qual pode causar doenças através de contato direto⁷.

As micoses são doenças provocadas por fungos. Podem ser superficiais ou profundas. Acometem a epiderme e seus anexos, afetando a derme e, mais raramente, outros órgãos internos. Com frequência, são transmitidas por contato direto⁹.

A Pitíriase Versicolor (PV) é uma micose superficial causada por leveduras do gênero *Malassezia*. Trata-se de um fungo lipofílico, dimorfo, oportunista. Na pele humana vive saprofiticamente¹³. Hereditariedade, *Diabetes Mellitus*, obesidade, imunossupressores, desnutrição, gestação e doenças crônicas, incluindo tuberculose são fatores predisponentes da doença¹⁰.

A levedura distribui-se em áreas seborréicas do

corpo humano, onde, após assumir a forma patogênica, determina o aparecimento da PV, descrita como máculas de tonalidades diversas, em geral arredondadas, que formam ou não placas, com descamação furfurácea característica. Nas escamas da lesão as leveduras do gênero *Malassezia* são reconhecidas pelo exame micológico direto^{11,13}. As lesões disseminam facilmente e distribuem-se nos membros superiores e pescoço¹⁵.

As leveduras do gênero *Malassezia* não produzem lipídios, portanto, exigem sua adição ao meio de cultura¹³. A temperatura ótima para o seu crescimento é 37°C¹¹, com colônias de textura cremosa, friável, convexa e de coloração branco-fosco¹³.

O diagnóstico da PV é baseado no aspecto clínico, no exame micológico direto e na cultura. No exame direto observam-se escamas obtidas pela raspagem da lesão e clarificadas pela solução aquosa de hidróxido de potássio a 10%, ou pelo método da fita gomada¹³.

O diagnóstico diferencial inclui entidades que levam à

Recebido em 13/07/2009
Aprovado em 06/01/2011
*Laboratório de Micologia/DCF/CCS/UFPB. João Pessoa – PB.

¹Graduando em Medicina. Bolsista CNPq. Laboratório de Micologia. /DCF/CCS/UFPB.

²Professora Adjunta de Micologia. Laboratório de Micologia. /DCF/CCS/UFPB.

³Professor Auxiliar de Microbiologia. UFCG.

⁴Farmacêutica. Laboratório de Micologia. /DCF/CCS/UFPB.

⁵Graduanda em Biomedicina. Faculdade Santa Emília de Rodat - FASER.

despigmentação cutânea, como vitiligo e pitiríase alba, bem como hanseníase indeterminada, principalmente na face. Outras possibilidades incluem psoríase, dermatite seborréica, papilomatose reticulada e confluente (Gougerot-Carteaud), eritrasma e dermatofitose⁶.

Dentro desse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a epidemiologia da PV na cidade de João Pessoa, PB, correlacionando as variáveis sexo, faixa etária, raça, localizações das lesões e exame direto e cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo exploratório e descritivo foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba através de dados registrados de 1999 a 2008. A amostra foi composta de 196 pacientes, e a coleta dos dados obedeceu às variáveis sexo, idade, raça, localizações das lesões, exame direto e cultura.

RESULTADOS

Foram analisados dados de 196 indivíduos com suspeita clínica de Pitiríase Versicolor (PV), sendo 74 (37,75%) do sexo masculino e 122 (62,24%) do sexo feminino. Em relação às idades, foram distribuídos em seis faixas etárias (tabela 1).

Observou-se que a população jovem foi a mais acometida pela PV, como revelam 48 casos na faixa etária de 11 a 20 anos e os 71 casos na faixa de 21 a 30 anos de idade.

Em relação aos 74 indivíduos do sexo masculino, 36 apresentaram exame direto e cultura para *Malassezia spp. positivos*. Quinze indivíduos tiveram positividade ao exame direto, sem, no entanto, apresentar crescimento da levedura na cultura; 23 tiveram resultado do exame direto negativo.

Tabela 1. Distribuição da faixa etária dos 196 indivíduos com suspeita clínica de PV.

FAIXA ETÁRIA	N	FREQUÊNCIA (%)
0 – 10	16	8,16
11 – 20	48	24,48
21 – 30	71	36,22
31 – 40	29	14,79
41 – 50	17	8,67
> 50	15	7,65

Entre os 122 indivíduos do sexo feminino, 41 apresentaram positividade tanto no exame direto, quanto na cultura; 28 foram positivos apenas no exame direto e 53 tiveram resultado negativo.

No que diz respeito à cor dos indivíduos com suspeita clínica de PV, observou-se que 105 (53,57%) eram pardos, 91 (46,42%) brancos e não houve registro de negros. Apresenta-se na tabela 2 a localização, número e freqüência em ordem decrescente de lesões de PV.

Tabela 2. Localização das lesões e sua freqüência de aparecimento nos 196 indivíduos com suspeita clínica de PV.

LOCAL DA LESÃO	N	FREQUÊNCIA (%)
Tronco anterior	102	44,15
Tronco posterior	54	23,37
Membros superiores	31	13,41
Membros inferiores	17	7,35
Face	16	6,92
Pescoço	11	4,76

DISCUSSÃO

A incidência das micoses superficiais é alta na população em geral. Exames clínicos e micológicos são realizados de rotina e em conjunto a fim de que sejam diagnosticados corretamente os agentes causais⁷.

A PV é uma doença cosmopolita causada por *Malassezia* spp. Sua freqüência varia de 5 até 50% em lugares quentes e úmidos. Observa-se desde lactantes até anciãos, pouco frequente antes dos cinco anos de idade e em maiores de 60 anos, predominando dos 15 aos 30 anos¹. No estudo, as faixas de idade mais acometidas por PV são semelhantes a tais dados, pois a faixa etária de 11 a 30 anos foi a mais afetada.

No presente estudo, percebe-se uma maior incidência de PV em mulheres, com 62,24% do total. Em estudo em uma comunidade pesqueira da região semi-árida do Estado de Falcón, Venezuela, Quintero⁸ encontrou também maiores porcentagens de infecção no gênero feminino (65,7% vs. 34,3%). As mulheres estavam discretamente mais afetadas (56,72%) em estudo epidemiológico realizado na cidade de Manaus/AM³. Tais dados, entretanto, sofrem críticas, uma vez que a maior parte dos pacientes procura o clínico somente por queixas cosméticas², o que torna a real influência do sexo na PV de difícil avaliação.

A PV já foi descrita em todas as raças, porém, parece ocorrer mais frequentemente na raça negra. Uma possível explicação para este fato seria um maior número de glândulas sebáceas nos indivíduos negros¹⁴. Entretanto, em estudo populacional venezuelano, a cor negra não predominou: ficou em segundo lugar (12,64%), atrás da cor parda (78,05%); a cor branca apresentou 9,31%⁸. No presente estudo, observou-se, como no estudo venezuelano, maior incidência de PV em pardos, correspondendo a 53,57% da amostra estudada. Entretanto, a falta de pacientes negros com suspeita de PV chama atenção.

Pacientes com PV geralmente apresentam múltiplas lesões no tronco, com regiões intercaladas de pele normal. As lesões podem também surgir no pescoço e extremidades superiores proximais. Sua distribuição normalmente é paralela à das glândulas sebáceas, com ocorrência maior no tórax, dorso e face. A localização na face é mais comum em crianças. A distribuição também ocorre em áreas normalmente cobertas por roupas, enfatizando a teoria de que a oclusão das glândulas tenha um papel nessa doença. As lesões podem ser hipo ou hiperpigmentadas, eritematosas ou marrom-escuro, justificando a denominação versicolor⁶.

Os troncos anterior (44,15%) e posterior (23,37%) foram as localizações mais freqüentes das lesões de PV. Em estudo venezuelano, com amostra composta por 902 indivíduos, as regiões anatômicas mais afetadas foram face (57,9%) e tórax (27,1%)⁸. No presente estudo, o acometimento de face ficou em quarta posição, com 8,07% do total. Na cidade de Santo Domingo, República Dominicana, registrou-se franco domínio de lesões no tronco e membros superiores¹. Em estudo epidemiológico na cidade de Manaus, em ordem decrescente, foram observadas as seguintes freqüências: disseminada (31,50%), tronco (20,65%), membros superiores (13,75%), membros inferiores (9,50%), face (8,85%), couro cabeludo (4,90%), axilas (2,9%), abdômen (1%), região retroauricular (0,70%), pés (0,50%) e mãos (0,50%)³. Ainda, no estado de Mato Grosso, ocorreu maior incidência em região de tronco².

O exame micológico direto e a cultura são realizados para confirmação diagnóstica da PV. Para desenvolver-se, as leveduras do gênero *Malassezia* spp. exigem a presença de lipídeos no meio. Foram os primeiros microrganismos descritos com tal característica.

Microscopicamente, as leveduras são globosas, ovóides ou cilíndricas, de parede grossa, constituída por várias camadas; os blastoconídios, de base larga, formam-se por um mecanismo simpodial, deixando uma cicatriz no sítio polar de gemulação da célula mãe⁴. As colônias apresentam textura glabrosa, relevo às vezes rugoso e coloração variável, com matiz amarelo-creme e reverso da mesma cor⁵.

No estudo em questão, 77 (39,28%) dos 196 indivíduos tiveram exame direto e cultura positivos; 43 (21,96%) apresentaram exame direto positivo e cultura negativa e 76 (38,77%) foram negativos ao exame direto. Tais dados mostram que nem sempre a cultura será positiva, quando do exame direto positivo.

CONCLUSÕES

A Pitiríase Versicolor é freqüente no meio analisado, ocorre em todas as idades, em especial adolescentes e adultos. Em relação ao sexo, ambos são atingidos, sendo observada uma maior incidência no sexo feminino. Os indivíduos pardos foram mais afetados e não houve registro de pacientes negros com suspeita clínica de PV. O tronco foi a região anatômica mais atingida, tanto na face anterior, quanto na posterior.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, pela organização do estudo, e a todos aqueles que fazem parte do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

REFERÊNCIAS

- 1. ARENAS, R.; ISA, R.I.; CRUZ, A.C. Pitiriasis versicolor en Santo Domingo, República Dominicana. Datos morfológicos de Malassezia spp. in vivo en 100 casos. Rev Iberoam Micol, 18: 29-32, 2001.
- 2. FORJAZ, M.H.H.; FREIRE, E.L.; GAMA, M.P.; FISCHMAN, O.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Pitiríase Versicolor. I. Estudo epidemiológico em voluntários da Universidade Federal de Mato Grosso (Brasil). An bras Dermatol, 58 (6): 249-252, 1983.
- 3. FURTADO, M.S.S.; CORTÊZ, A.C.A.; FERREIRA, J.A. Pitiríase Versicolor em Manaus, Amazonas Brasil. An bras Dermatol, 72 (4): 349-351, 1997.
- 4. HERNÁNDEZ, F.H.; TOVAR, L.J.M.; MORA, E.B.; LÓPEZ, A.A.; BERMEJO, A.V.; MARTÍNEZ, R.L. Especies de Malassezia asociadas a diversas dermatosis y a piel sana en población mexicana. Rev Iberoam Micol, 20: 141-4, 2003.
- MIRANDA, L.G.A, MAGALHÃES, V.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, N.M.C., VIEIRA, W.G. Pitiríase Versicolor: abordagem clínica e laboratorial. Revista de Patologia Tropical, 33 (3): 265-275, 2004
- 6. OLIVEIRA, J.R.; MAZOCCO, V.T.; STEINER, D. Pitiríase Versicolor. An bras Dermatol, 77 (5): 611-8, 2002.
- 7. PECHER, S.A.; CASTRO, G.B.; BORRÁS, M.R.L. Prevalência de micoses em escolares de localidades da região amazônica ocidental (fronteira Brasil-Colômbia). An bras Dermatol, 57 (1): 13-18, 1982.
- 8. QUINTERO, M.E.A.; PERFETTI, D.J. Aspectos clínico-epidemiológicos de la pitiriasis versicolor (PV) en uma comunidad pesquera de la región semiárida del Estado Falcón, Venezuela. Rev Iberoam Micol, 21: 191-194, 2004.
- 9. RAMOS-E-SILVA, M. Infecções cutâneas por fungos micoses superficiais. Apoio à Residência Médica, 1 (1): 5-10, 1995.
- 10. SCHECHTER, M.; MANRANGONI, D. Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1994, vol. 1, 500 p.
- 11. SCHLOTTFELDT, F. S, TRAMONTIN S, W, NAPPI, B. P, SANTOS, J. I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero Malassezia: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 38 (3): 199-204, 2002
- 12. SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica. 1º Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 1999. vol. 1. p. 171-190.
- 13. SODRÉ, S.T.; ASSIS, T.L.; AZULAY, R.D. Pitiríase Versicolor Atualização. An bras Dermatol, 59 (6): 275-280, 1984.
- 14. TROPE, B.M.; ASSIS, T.L.; MARQUES, A.S. Pitiríase Versicolor Atualização bibliográfica. An bras Dermatol. 67 (4): 159-166. 1992.
- 15. VERONESI, R.; KRITSKI, A. L.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 2º Ed. (2002). São Paulo: Ed. Atheneu, 1996, vol. 2, 962 p.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Lizandro Leite Brito

Rua Abdias dos Santos Passos, 280,Cristo João Pessoa/PB CEP: 58070-340 Tel: (83) 32315235 / (83) 88092545

E-mail: lizandrob@gmail.com

Perfil Antimicrobiano de Cepas de *Escherichia coli* Isolados de Pessoas com Suspeita de Infecção do Trato Urinário*

Antimicrobial profile of *Escherichia coli* strains isolated of peoples with suspect of urinary tract infections

MALDANER, Nádia Ione¹, CAVALLI, Vanessa², ROSSI, Eliandra Mirlei³, SCAPIN, Diane⁴, SARDIGLA, Cassius Ugarte⁵

RESUMO - A infecção do trato urinário (ITU), situa-se entre as mais frequentes doenças bacterianas, sendo *Escherichia coli* um dos principais microrganismos causadores de ITU. Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a incidência de cepas de *E. coli* na urina de indivíduos com suspeita de infecção urinária e avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobiano dessas cepas. Foram analisadas 280 uroculturas, sendo 140 hospitalares e 140 de pessoas da comunidade, em três cidades do extremo oeste de Santa Catarina, Brasil. As urinas foram semeadas em ágar Macconkey, incubadas por 48 horas a 36 ± 1°C. Colônias características foram identificadas por coloração de Gram e testes bioquímicos. O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizada através da técnica de Kirby-Bauer conforme recomendações do CLSI 2005. Das 280 uroculturas analisadas, 79 (28,2%) foram positivas para *Escherichia coli*, destas 32 (40,5%) foram provenientes de amostras hospitalares e 47 (59,5%) de origem comunitária. O antimicrobiano de maior eficiência foi o imipenem e os antimicrobianos ampicilina, cefalotina e amicacina apresentaram maior índice de ineficácia para ambos os ambientes de coleta, demonstrando que o uso continuo e errôneo dos antimicrobianos favorecem o desenvolvimento de cepas resistentes, porque normalmente esses são drogas de primeira escolha e já não são mais eficientes nos tratamentos de ITUs.

Palavras-Chave: Infecção do trato urinário, Escherichia coli, antimicrobianos.

SUMMARY - The urinary tract infection (UTI) is among the most frequent of all bacterial diseases and Escherichia coli is one of the main microorganisms which causes the infection. Thus, the objective of this study was to verify the incidence of strains of E. coli in the individual's urine when urinary infection is suspected and to evaluate the susceptibility profile of the antimicrobials of these strains. A total of 280 urine cultures were analyzed. Half the cultures were taken from hospital patients and half were taken from people in communities located in three cities of the extreme west of Santa Catarina, Brazil. The urine had been sown in Macconkey agar and incubated for 48 hours at 36± 1 °C. Characteristic colonies had been identified by Gram coloration and biochemists tests. The susceptibility profile of the antimicrobials was carried through the technique in agreement with the Kirby-Bauer recommendations of CLSI 2005. Of the 280 analyzed urine cultures, 79 (28.2%) were positive for E. coli. Of these, 32 (40.5%) had come from hospital samples and 47 (59.5%) were of community-acquired origin. The antimicrobial with the most efficiency was imipenem. The ones with the worst efficiency were ampicillin, cephalothin and amikacin. This was true for cultures taken from both environments. It demonstrated that the continued and erroneous use of the antimicrobials contributed to the resistance development of strains, because these are normally drugs of first choice and already are less efficient in the treatment of ITUs.

Keywords: Urinary tract infection, Escherichia coli, antimicrobials.

INTRODUÇÃO

Ainfecçção do trato urinário (ITU) caracteriza-se por invasão e multiplicação bacteriana, acometendo os rins e as vias urinárias⁸. Em pessoas saudáveis, o trato urinário acima da uretra é estéril³.

As ITUs estão entre as doenças infecciosas mais frequentes dos seres humanos que podem ser de origem comunitária ou hospitalar^{11,12}, responsáveis por significativa mortalidade²².

As principais bactérias responsáveis pela ocorrência de ITUs são as Gram-negativas, usualmente as enterobactérias sendo *Escherichia coli*, responsável por 75% a 90% dos casos^{22,20}. Originária da microbiota intestinal coloniza a mucosa genital, podendo penetrar no

sistema urinário, aderir-se e colonizar a mucosa urogenital por meio de fímbrias ou pilli e adesinas, permitindo que a bactéria seja capaz de resistir à eliminação pelo fluxo urinário^{5,14}.

A frequência de ITU é maior em mulheres do que em homens, devido a questões anatômicas, como a uretra feminina ser mais curta, favorecendo assim a colonização pela microbiota fecal, havendo também a probabilidade de contaminação bacteriana da uretra feminina no ato sexual. A condição mais comum na predisposição dos pacientes a infecções urinárias é um fluxo urinário comprometido mecânica ou funcionalmente, como obstrução da bexiga, estrangulamento da uretra, hipertrofia prostática, expansão do útero durante a gravidez e nefropatia diabética ou poliomielite^{2,18}.

Recebido em 17/08/2009 Aprovado em 16/03/2011

*Universidade do Oeste de Santa Catarina - Unoesc, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia

12.4 Bióloga, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC

Bióloga, Especialização em Tecnologia e Controle de Qualidade de Alimentos, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- UFGRS

Biólogo, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

O uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de ITU induz a uma pressão seletiva sobre as cepas bacterianas, favorecendo o aparecimento de microrganismos resistentes e consequentemente dificulta o controle dessa infecção^{10,23}. As bactérias isoladas em infecções hospitalares são mais resistentes aos antimicrobianos que as comunitárias^{1,7}. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é uma das provas mais importantes do laboratório de microbiologia clínica, pois avalia a suscetibilidade dos microrganismos contra diferentes agentes antimicrobianos. Os resultados desses testes influenciam diretamente na escolha da terapêutica antimicrobiana¹⁶. O desenvolvimento da resistência bacteriana pode ser diminuído, evitando o uso indiscriminado de antimicrobianos³.

Por tanto, é importante se traçar um perfil, com o objetivo de se conhecer os antimicrobianos que apresentam ou não uma boa eficácia frente às diversas infecções bacterianas.

Há dificuldade no controle de infecções urinárias não complicadas, que em geral é iniciado empiricamente, com conseqüente consumo elevado de antibióticos e um significativo impacto sócio-econômico²².

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de *E. coli* isoladas de urina proveniente de pacientes com suspeita de infecção urinária.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos foram efetuados no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste-SC.

Foram realizadas 280 uroculturas, sendo 140 amostras hospitalares e 140 amostras de origem comunitária, provenientes de três cidades da região extremo oeste de Santa Catarina, Brasil, no período de abril a agosto de 2006.

As amostras foram homogeneizadas lentamente, posteriormente uma alíquota de 100µl de urina de cada amostra foi semeada em ágar MacConkey e incubadas a 36±1°C por 48 horas. Foram consideradas culturas positivas, aquelas apresentando contagem de colônias igual ou superior a 10⁵ UFC/mL. Colônias características foram identificadas por coloração de Gram e provas bioquímicas^{9,13}. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo método de difusão de discos, de Kirby-Bauer, segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*⁴.

Os antibióticos testados foram: amicacina, ampicilina, cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína e norfloxacina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 280 uroculturas analisadas, 79 (28,2%) foram positivas para *Escherichia coli*, destas 32 (40,5%) foram provenientes de amostras hospitalares e 47 (59,5%) de origem comunitárias.

A maioria dos pacientes com ITUs foram do sexo feminino, representando 84,82% (n= 67) das amostras, destas

58,20% (n= 39) foram de origem comunitária e 41,80% (n= 28) de hospitalar e, apenas 15,19% (n=12) das amostras foram do sexo masculino. As mulheres são mais suscetíveis a ITU, devido a questões anatômicas, como a uretra feminina ser mais curta e facilmente atingível pelas bactérias da região perianal, além da probabilidade de contaminação bacteriana da uretra feminina no ato sexual^{21,18}.

A faixa etária predominante de pacientes com ITUs causada por *E. coli* foi de 21-40 anos com positividade para 40,5% das amostras. Esses resultados são semelhantes a diversos estudos que revelam que os pacientes mais acometidos com ITU são adultos^{21,18}.

A suscetibilidade aos antimicrobianos para os isolados de infecções comunitárias e hospitalares são demonstrados na tabela 1.

Os antimicrobianos ampicilina, cefalotina e amicacina foram os que apresentaram maior índice de resistência, principalmente nos isolados de pacientes internados quando comparados com os comunitários. Esta elevada resistência a estes antimicrobianos também foi relatada por outros autores que para amicacina, justificando que o uso freqüente dos antibióticos é uma das principais causas para o desenvolvimento de cepas resistentes, uma vez que, esses antimicrobianos, incluindo a cefalotina, são muito utilizados na terapia empírica de ITU não complicada^{21,17,19}.

Das 79 cepas de *E.coli* isoladas, 29 (36,7%) apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano. Destas 16 (55,2%) foram de origem hospitalar e 13 (44,8%) da comunidade.

As maiores sensibilidades tanto para as amostras provenientes do ambiente hospitalar quanto às da comunidade, foram para os seguintes antimicrobianos: imipenem, ceftriaxona, norfloxacina, cefoxitina, ciprofloxacina e gentamicina. Diversos estudos revelam uma eficaz ação desses antimicrobianos^{3,5,1,2}. A excelente atividade demonstrada pelo imipenem pode ser atribuida à rápida penetração do antimicrobiano na célula bacteriana e alta afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina, mecanismo de ação deste antibiótico⁶.

A sensibilidade para as quinolonas (Ciprofloxacina e norfloxacina) é relatada por outros estudos¹⁵. Entretanto destaca-se que tem sido encontrado cepas de *E. coli* resistentes para este antimicrobiano tanto em ambiente hospitalar como na comunidade, uma vez que, normalmente nos tratamentos empíricos e de curta duração essas drogas são errôneamente utilizadas, contribuindo significativamente para aquisição de resistência a esses antimicrobianos^{7,15}.

Tabela 1: Suscetibilidade antimicrobiana de 79 amostras de E.coli isoladas de pacientes com ITU de origem comunitária e hospitalar.

ANTIBIÓTICO	SENS	IVEL	RESISTENTE		
ANTIBIOTICO	Comunitário	Hospitalar	Comunitário	Hospitalar	
Amicacina	24 (51,1%)	13 (40,6%)	23 (48,9%)	19 (59,4%)	
Ampicilina	15 (31,9%)	5 (15,6%)	32 (68,1%)	27 (84,4%)	
Cefalotina	14 (29,8%)	9 (28,1%)	33 (70,2%)	23 (71,9%)	
Cefoxitina	41 (87,2%)	27 (84,4%)	6 (12,8%)	5 (15,6%)	
Ceftriaxona	43 (91,5%)	30 (93,7%)	4 (8,5%)	2 (6,3%)	
Ciprofloxacina	39 (83,0%)	26 (81,3%)	8 (17%)	6 (18,7%)	
Gentamicina	37 (78,7%)	24 (75%)	10 (21,3%)	8 (25%)	
Imipinem	46 (97,9%)	32 (100%)	1 (2,1%)	0 (0%)	
Nitrifurantoína	38 (80,8%)	22 (68,8%)	9 (19,2%)	10 (31,2%)	
Norfloxacina	41 (87,2%)	29 (90,6%)	6 (12,8%)	3 (9,4%)	

Ressalta-se que os uropatógenos vem desenvolvendo uma resistência crescente tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, fato preocupante para o controle das ITUs¹⁷.

Os resultados encontrados demonstram que cepas de *E. col*i causadoras de infecção urinária podem ser resistentes a diversos antimicrobianos, o que consequentemente dificulta a eficácia do tratamento de ITUs.

Nosso estudo mostrou que, bactérias isoladas do ambiente hospitalar são mais resistentes aos antimicrobianos do que bactérias isoladas em pessoas da comunidade, demonstrando que a pressão seletiva exerce importante papel no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- 1. BAIL, L.; ITO, C. A. S. & ESMERINO, L. A. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. Rev. Bras. Anál. Clín., 38 (1): 51-56 2006
- 2. BLATT, J. M. & MIRANDA, M. C. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. Rev. Panam. Infectol., 7 (4): 10-14, 2005.
- 3. CHAVES, J. M.; MENEZES, E. A.; MOREIRA, A. A.; CUNHA, F. A.; CARVALHO, T. M. J. P. Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos utilizados em infecções urinárias de pacientes do hospital de referência São Lucas da cidade de Crateús-Ceará. Infarma 15, (1-2): 09-10, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/ NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Sasceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S156. Pennsylvania, USA, 2005.
- ESMERINO, L. A.; GONÇALVES, L. G. & SCHELESKY, M. E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de Escherichia coli isoladas de infecções urinária comunitárias. Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, 9,(1):31-39, 2003.
- 6. GALES, A. C., MENDES, R. E., RODRIGUES, J., SADER, H. S. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos J. Bras. Patol. Med. Lab., 38. (1): 13-20. 2002.
- 7. GALES, A. G., GALESA, A. C., JONESA, R. N., GORDONA, K. A., SADERB, H. S., WILKEA, W. W., BEACHA, M. L., PFALLERA, M. A., DOERNA, G. V. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998). JAC., v. 45, 295-303, 2000.
- 8. GUIDONI, E. B. M. & TOPOROVSKI, J. Infecção Urinária na Adolescência. J. Pediatr., 77(2): 165-169, 2001.
- 9. KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, William M. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465 p.

- 10. LAPCHIK M. S., NISHIURA, J. L., HEIBERG, I. P., PANCOTTI, S. L., AJZEN, H., SCHOR, N. Tratamento da Infecção Urinária não Complicada (ITU); estudo comparativo entre Ciprofloxacina (CIPRO) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (SZM +TMP) com 2 esquemas de duração terapêutica. J. Bras. Nefrol., 17(1); 31-34, 1995.
- 11. LOPES, H. V. & TAVARES, W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. Rev. Assoc. Med. Bras. 51(6): 306-308, 2005.
- 12. MABBETT, A. N. ULETT, G. C., WATTS, R. E., TREE, J. J., TOTSIKA, M., ONG, C. Y., WOOD, J. M., MONAGHAN W., LOOKE, D. F., NIMMO G. R., SVANBORG, C., SCHEMBRI, M. A. Virulence properties of asymptomatic bacteriuria Escherichia coli. IJMM, n. 299, 53–63, 2009.
- 13. MACFADDIN, J. F. Biochemical tests for identifications of medical bactéria. 3 ed. Philadelphia:LippincottWilliams&Wilkins, 2000. 912p.
- 14. MD RONALD, A. The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. Am. J. Med., 113(1A): 14-19, 2002.
- 15. PIRES, M. C. S., FROTA, K. S., JUNIOR, P. O. M., CORREIRA, A. F., ESCALANTE, J. J. C., SILVEIRA, C. A. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. Rer. Soc. Bras. Med. Trop., 40(6): 643-647, 2007.
- 16. SEJAS, L. M., SILBERT, S., REIS, A. O. SADER, H. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. Rev. Bras. Patol. Med. Lab., 39(1): 27-35, 2003.
- 17. STAMM, W. E. & NORBBY, S. R. Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. J. Infect. Dis., 183(1):S1-S4, 2001.
- 18. SOARES, L. A.; NISHI, C. Y. M.; WAGNER, H. L. Isolamento de bactérias causadoras de infecções urinárias e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. SBMF.,2 (6), 84-92, 2006.
- 19. TSENG M. H, LO W.T, LIN, W. J, TENG C.S, CHU, M. L, WANG C,C. Changing trend in antimicrobial resistance of pediatric uropthogens in Taiwan. Pediatr. Int., v.50, 797-800, 2008.
- 20. TURNIDGE J., BELL J., BIEDENBACH D. J, JONES R. N. Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary tract infection isolates in the Asia-Western Pacific Region:report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998 /1999. Int. J. of Antimicrob. Agents, v. 20, 10-17, 2002.
- 21. COSTA, L. C., BELÉM, L. F., FREITAS E SILVA, P. M., PEREIRA, H. S., JÚNIOR, E. D. S., LEITE T. R., PEREIRA, G. J. S. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA. Rev. Bras. Anál. Clín., 39(2):119-121, 2007.
- 22. VIEIRANETO, O. M. Infecção do Trato Urinário. Medicina, v. 36, 365-369, 2003.
- 23. YUKSEL, S., OZTURK, B., KAVAZ, A., OZÇAKAR, Z. B, ACAR, B., GURIZ, H., AYSEV, D., EKIM, M., YALÇINKAYA, F. Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and evaluation of empirical treatment in Turkish children with urinary tract infections. Int. J. of Antimicrob. Agents. v. 28, p. 413-416, 2006.

ENDERECO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Nádia Ione Maldaner

Aspectos clínico-laboratoriais de crianças com Doença Falciforme

Clinical and laboratorial aspects in children with sickle cell disease

Anacleto de Carvalho Neto¹, Marcelo Land¹, Marcos Fleury²

RESUMO - As doenças falciformes compreendem a interação do gene S com diversas hemoglobinopatias, e talassemias. No Brasil, cerca de 0,1% a 0,3% da população negra é afetada pela doença e estima-se a existência de pelo menos dois milhões de portadores da hemoglobina S. Foram estudados 109 pacientes acompanhados clínica e laboratorialmente no Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPPMG-UFRJ), com diagnóstico de doença falciforme. A observação dos resultados hematológicos e bioquímicos confirma de modo evidente as diferenças entre as diversas doenças que compõem o grupo das Doenças Falciformes. Dentre as principais complicações presentes na doença falciforme, a mais freqüente no grupo foi a infecção bacteriana observada em 94,5% dos pacientes. As transfusões foram utilizadas em 72,5% dos pacientes. A deficiência de ferro prejudica a síntese das hemoglobinas, diminuindo a concentração de hemoglobina S no interior dos eritrócitos o que causa menos afoiçamento. O estado de ferropenia diminui a hemólise melhorando várias das complicações que acompanham estes pacientes.

Palavras-Chave: Doença falciforme, transfusões, ferro sérico, hemólise.

SUMMARY - Sickle cell disease (SCD) is due to the interaction of the S gene with another hemoglobinopathies and thalassemias. In Brazil, 0,1 to 0,3% of the black population is affected by this disease and there will be about 2 millions of sickle cell trait patients. We studied 109 SCD patients from Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPPMG-UFRJ). The biochemical and hematologic values showed the differences among this group of diseases. One of the most important complication of SCD is the bacterial infection which was observed in 94,5% of the patients. Blood transfusions were also very frequent and used in 72,5% of the patients. The iron deficiency results in an impaired hemoglobin synthesis, decreasing the Hb S concentration leading to less sickling. The iron deficiency decreases the hemolysis improving the life quality of these patients.

Keywords: Sickle cell disease, blood transfusion, serum iron, hemolysis.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina S causa um grupo de doenças denominado de Doença Falciforme (DF) onde o estado de homozigose, a anemia falciforme, é a doença mais importante do grupo por ser a mais grave e com maior morbidade e mortalidade.

As doenças falciformes compreendem a interação do gene S com diversas hemoglobinopatias, assim como a hemoglobinopatia C, outras variantes de cadeia beta, as talassemias beta e alfa, além de outras.

O gene S ocorre comumente, mas não exclusivamente, em indivíduos de origem africana. Todos os anos cerca de 300.000 crianças nascem com uma síndrome falciforme e a prevalência de anemia falciforme em crianças varia de 0,1/1000, em países não endêmicos, a 20/1000 em algumas partes do continente africano. Na verdade, de 19 a 27% da população africana carrega o gene S¹. Nos EUA, o traço falciforme ocorre em 9% dos afro-americanos e 1 em cada 600 apresentam anemia falciforme². No Brasil, cerca de 0,1% a 0,3% da população negra é afetada pela doença e estima-se a existência de pelo menos dois milhões de portadores da hemoglobina S (heterozigotos)³.⁴. Na região sudeste, a prevalência estimada de heterozigotos é de 2% na população geral e, entre os negros, de 6% a 10%⁵. Em um

estudo realizado em Minas Gerais foi descrita a incidência de 1 caso de homozigose para cada 2800 nascimentos⁶, no Rio de Janeiro esta relação foi de 1: 1196 nascimentos⁷.

Indivíduos com doença falciforme apresentam uma expectativa de vida reduzida. Em 1994, o instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) realizou um estudo onde foi estimada uma expectativa de vida para os doentes de anemia falciforme de 42 anos para o sexo masculino e 48 para o feminino. A mortalidade relacionada à doença falciforme em crianças contribuiu significativamente para esta sobrevida mais curta. Há trinta anos, por exemplo, somente metade das crianças com anemia falciforme atingia a idade adulta².

A anemia falciforme é uma importante causa de morbidade e mortalidade na infância. A história natural da doença está bem descrita em estudos realizados na Jamaica e nos EUA que demonstram que a identificação precoce das crianças afetadas, um acompanhamento cuidadoso, aliados a intervenções relativamente simples reduziram substancialmente a morbidade e da mortalidade nesta faixa etária⁸.

Avanços e melhorias no acompanhamento clínico e laboratorial juntamente ao uso de medicamentos mais avançados permitiram o aumento significativo da expectativa de vida de crianças com anemia falciforme. Estas medidas incluem o diagnóstico precoce da doença através do screening neonatal, uso de penicilina profilática para prevenir a sépsis

Recebido em 26/02/2010 Aprovado em 13/09/2010 ¹Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira – UFRJ ²Faculdade de Farmácia - UFRJ pneumocócica, educação dos pais e familiares e os cuidados médicos gerais. Mais modernamente, outros avanços passaram a fazer parte do arsenal de tratamento das doenças falciformes como o uso da hidroxiuréia, o transplante de células tronco e a utilização de programas de transfusão.

O estudo clínico e laboratorial de crianças com anemia falciforme facilita o tratamento e o aconselhamento dos pacientes e de suas famílias, direciona políticas públicas de saúde e promove as bases para pesquisas científicas futuras².

O programa desenvolvido pelo Serviço Nacional de Saúde da Inglaterra (NHS) abrange o screening neonatal e o acompanhamento de crianças e adolescentes com anemia falciforme. As crianças comparecem a consultas trimestrais para avaliação clínica quando é realizada a instrução de pais e familiares sobre os cuidados específicos com o paciente por meio de palestras e distribuição de material impresso.

Os pais são sistematicamente questionados sobre a ocorrência de qualquer um dos principais sintomas associados à anemia falciforme como a dactilite, episódios dolorosos ou infecções. Também, recebem treinamento na palpação esplênica objetivando o controle das complicações mais freqüentes e na decisão de quando procurar um serviço de emergência⁸.

Um aspecto menos estudado nestes casos é a extensão dos danos que a hemoglobina S pode causar aos precursores eritróides e ao processo eritropoético. O conhecimento do impacto da anemia falciforme na eritropoese torna-se uma ferramenta bastante importante para o desenvolvimento de terapias e para o acompanhamento destes casos⁹.

A influência dos níveis de ferro sérico e de ferritina nos pacientes falcêmicos repercutem diretamente na síntese da hemoglobina e, consequentemente, na concentração de hemoglobina S no interior das hemácias (CHGM-S)¹⁴.

O monitoramento de enzimas, como a desidrogenase lática (DHL), surge como um marcador importante do curso da doença, relacionado ao risco de vasculopatia cerebral. Em crianças falcêmicas, a DHL se relaciona significativamente aos níveis de hemoglobina, aspartato amino transferase (AST) e creatinina¹⁰.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 109 pacientes acompanhados clínica e laboratorialmente no Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPPMG-UFRJ), com diagnóstico de doença falciforme. O diagnóstico de doença falciforme foi determinado a partir de eletroforese de hemoglobinas, em pH alcalino e ácido, do paciente e de seus pais. Os genótipos encontrados foram os seguintes: 3 pacientes com associação do gene S e beta talassemia $(S\beta^*)$; 3 pacientes com associação do gene S com a talassemia beta $(S\beta^*)$; 9 pacientes heterozigotos para genes S e C (SC); 1 paciente apresentando a associação entre os genes S e D (SD) e 93 pacientes homozigotos para o gene S (SS).

O grupo estudado é composto por 51 (46,7%) meninas e 58 (53,3%) meninos com idades variando de 3 a 16 anos (Tabela 1).

Os dados referentes aos exames hematológicos, bioquímicos e às características clínicas foram obtidos por meio da revisão dos prontuários médicos no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008. Os resultados de hemograma, eletroforese de hemoglobinas, dosagens de hemoglobinas A2 e Fetal, contagem de reticulócitos além das dosagens bioquímicas foram colhidos, computados e utilizados na formação de um banco de dados com o objetivo de fornecer informações sobre o perfil laboratorial destes pacientes. A Tabela 2 apresenta alguns dos dados hematológicos obtidos.

RESULTADOS

A observação dos resultados hematológicos e bioquímicos confirma, de modo evidente, as diferenças entre as diversas doenças que compõem o grupo das Doenças Falciformes. Nota-se que a associação $S\beta^{*},$ apresenta os melhores valores hematológicos apresentando anemia mais branda (Hb = 9,67 g/dl), a menor média de reticulócitos (5,8%) e a menor média de bilirrubina indireta (0,83mg%). Em contrapartida, outras doenças mais graves cursam com anemia mais grave e valores bastante aumentados de bilirrubina e reticulócitos, como nos grupos SS e $S\beta^{\circ}$. As Doenças Falciformes também diferem em relação às complicações clínicas, variando entre pacientes oligossintomáticos e casos bem mais graves.

Dentre as principais complicações presentes na doença falciforme, a mais freqüente no grupo foi a infecção bacteriana observada em 94,5% dos pacientes. As três principais causas de infecção foram identificadas como sendo: pneumonia 92,7%, infecção urinária 68,8% e osteomielite 60,6%. Somente um paciente evoluiu para um quadro de infecção sistêmica apresentando hemocultura positiva.

Os episódios dolorosos também representaram uma intercorrência bastante frequente ocorrendo em 75,2% dos pacientes sendo as dores articulares, a dor torácica e a abdominal as principais queixas.

As transfusões foram utilizadas em 72,5% dos pacientes sendo o grupo SS o que apresentou a maior freqüência da utilização deste recurso com média de 9,9 indicações / paciente. No grupo S β^0 este procedimento também foi bastante utilizado representando uma média de 8,3 indicações / paciente.

Os pacientes que receberam pelo menos 1 transfusão apresentaram média de ferro sérico significativamente superior ao grupo que não recebeu transfusões: 125, 59 μ g% e 102,43 μ g% respectivamente, p= 0,0452.

Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com os valores de referência de ferro sérico em Baixo, Médio e Alto. Grupo Baixo - ferro sérico abaixo de 50 \square g%; Grupo Normal - ferro sérico entre 50 e 150 μ g% e Grupo Alto – ferro sérico acima de 150 μ g%. (Tabela 4)

Tabela 1 - Características da população estudada

Genótipo	Sβ [⁺]	Sβ ⁰	sc	SD	SS	Total
N°	3	3	9	1	93	109
Masculino	3	2	4	1	48	58
Feminino	0	1	5	0	45	51
Média de idade	10,67	10,70	7,78	7,0	9,8	9,65

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão dos parâmetros hematológicos de acordo com o genótipo dos pacientes.

Genótipo	Hm (10 ⁶ /μl)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VGM (fL)	HGM (pg)	CHGM (%)	Hb F (%)	Ret (%)
Sβ ⁺	4,35	9,67	30,07	69,13	22,53	32,53	3,63	5,8
	(± 0,163)	(±1,041)	(±1,716)	(±2,122)	(±1,002)	(±1,193)	(±2,173)	(±5,37)
Sβ ⁰	3,40	7,53	24,0	71,23	22,37	31,40	8,27	16,1
	(± 0,471)	(±0,503)	(±1,473)	(±5,880)	(±1,818)	(±0,200)	(±4,661)	(±5,92)
sc	3,43	8,97	26,57	78,21	26,20	33,52	3,41	11,39
	(± 0,801)	(±1,968)	(±5,385)	(±5,887)	(±1,503)	(±1,485)	(±3,731)	(±5,73)
SD	2,05	6,50	18,20	88,70	31,70	35,70	9,90	24,0
SS	2,51	7,37	21,94	88,09	29,62	33,59	7,99	19,47
	(± 0,396)	(±0,845)	(±2,660)	(±8,031)	(±3,214)	(±1,762)	(±7,830)	(±7,64)
Total	2,66	7,65	22,57	86,29	28,96	33,52	7,52	18,37
	(± 0,593)	(± 1,118)	(± 3,42)	(± 9,00)	(± 3,533)	(± 1,743)	(± 7,742)	(± 7,954)

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos observados no grupo de pacientes de acordo com os genótipos

Genótipo	BT	BD	BI	Fe	CTLF	IST	Ferritina
	(mg%)	(mg%)	(mg%)	(μg%)	(µg%)	(%)	(µg/l)
Sβ⁺	1,27	0,43	0,83	88,6	290,0	30,0	69,7
	(± 0,451)	(±0,153)	(±0,379)	(±47,54)	(±20,0)	(±15,52)	(±38,63)
Sβ ⁰	3,07	0,63	2,43	108,3	276,0	38,3	97,3
	(± 1,124)	(±0,115)	(±1,106)	(±48,08)	(±70,31)	(±10,97)	(±39,26)
sc	1,70	0,54	1,16	82,5	297,2	27,22	120,7
	(± 0,442)	(±0,15)	(±0,371)	(±34,71)	(±27,68)	(±10,33)	(±31,85)
SD	2,20	6,50	1,1	130,0	315,0	41,0	110,0
SS	2,73	0,66	2,06	123,9	309,3	37,9	152,0
	(± 1,346)	(±0,370)	(±1,195)	(±79,82)	(±44,69)	(±12,83)	(±109,81)
Total	2,61	0,65	1,95	119,22	306,95	36,85	145,52
	(± 1,313)	(± 0,351)	(± 1,167)	(± 75,917)	(± 43,652)	(± 12,848)	(± 103,587)

BT = Bilirrubina Total; BD = Bilirrubina Direta; Bilirrubina Indireta; Fe = Ferro sérico; CTLF = Capacidade Total de Ligação ao Ferro; IST = Índice de Saturação

Tabela 4 – Valores de bilirrubina indireta (BI) e reticulócitos de acordo com os valores de ferro sérico

Grupo	N° Pacientes	ВІ	Reticulócitos
Baixo	5	1,10 mg%	9,80%
Normal	81	1,93 mg%	17,80%
Alto	23	2,21 mg%	22,00%

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos exames hematológicos e bioquímicos do grupo de pacientes com Doença Falciforme mostram, de forma inequívoca, a variabilidade deste grupo de doenças. A frequência e a gravidade das manifestações clínicas variam bastante entre as várias doenças do grupo ou mesmo entre pacientes com a mesma doença.

A morbidade das Doenças Falciformes está diretamente relacionada aos fenômenos vaso-oclusivos. A frequência e a intensidade das crises hemolíticas estão diretamente relacionadas a algumas das principais complicações destas doenças¹².

O acompanhamento clínico e laboratorial com o monitoramento de marcadores hematológicos e bioquímicos contribui para o prognóstico e a prevenção de muitas das complicações mais freqüentes^{11,13}.

Embora deficiência de ferro seja uma complicação frequente da doença falciforme causada pela hemólise intravascular e, consequente perda de ferro pela urina 12 , este fato não é observado neste grupo de pacientes. As médias de ferro sérico (119,2 $\mu g\%$) e ferritina (145,5 $\mu g/l$) não demonstram valores inferiores aos valores de referência. Somente 5 (4,6%) dos pacientes apresentaram valores de ferro sérico abaixo da normalidade.

Este fato pode ser explicado pela elevada média de

transfusões por paciente (9,19 / paciente). As transfusões representam um grande aporte de ferro ao organismo. Cada 500 ml de sangue transfundido equivale a 0,25 g de ferro administrado por via parenteral.

O fato das transfusões terem sido um recurso bastante utilizado reflete diretamente nos níveis de ferro. Do grupo estudado, 79 (72,5%) pacientes receberam transfusões enquanto 30 (27,5%) não foram submetidos a este procedimento. Desta forma, existe uma diferença significativa dos níveis de ferro sérico entre o grupo transfundido e o não transfundido (p = 0,0452).

A polimerização da hemoglobina S está diretamente relacionada à sua concentração intra-eritrocitária. Quanto maior o CHGM-S mais facilmente ocorre a fenômeno do afoiçamento. A deficiência de ferro prejudica a síntese das hemoglobinas, diminuindo a concentração de hemoglobina S no interior dos eritrócitos o que causa menos afoiçamento. O estado de ferropenia diminui a hemólise melhorando várias das complicações que acompanham estes pacientes.

Esta diminuição na hemólise pode ser constatada quando os valores médios de bilirrubina indireta são comparados entre os grupos formados de acordo com os níveis de ferro sérico. Foi demonstrado que existe uma hemólise menor no grupo com ferro sérico baixo em comparação aos grupos Normal (p=0,0468) e Alto (p=0,0204).

A menor hemólise é evidenciada pelo menor percentual de reticulócitos quando comparamos os grupos: Baixo X Alto (p= 0,0006), Baixo X Normal (p= 0,0148) e Normal XAlto (p= 0,0030).

O fato dos níveis de ferritina não apresentarem diferenças significativas entre os grupos transfundidos e não transfundidos pode ser explicado pela menor sensibilidade deste marcador em pacientes com anemia falciforme. As crises dolorosas podem causar um aumento dos níveis séricos de ferritina que pode persistir por 1 a 3 semanas¹⁴. Sendo assim, o diagnóstico de anemia ferropriva usando-se a ferritina como único parâmetro pode ser subestimado nestes casos.

Os episódios dolorosos foram muito frequentes no grupo estudado (75,2%) o que poderia contribuir na falta de associação da ferritina entre os grupos de transfundidos e não transfundidos. Na verdade, a comparação das médias de ferritina mostra que o grupo com crises dolorosas apresenta ferritina superior ao grupo sem dor (p= 0,0526). Este valor revela uma tendência importante o que confirma, de certa forma, os dados da literatura^{14,12}.

REFERÊNCIAS

- 1. Colombatti R, Pozza LVD, Mazzucato M, Sainati L, Pierobon M, Facchin P. Hospitalization of children with sickle cell disease in a region with increasing immigration rates. Haematologica 2008; 93(3): 463-464
- 2. Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. Blood. 2004; 103 (11) 11: 4023-4027
- 3. Naoum PC, Alvarez F, Domingos CRB, Ferrari F, Moreira HW, Sampaio Z, ET AL. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. Rev. Bras. Patol. Clin. 1987; 23(3):68-73
- 4. Ramalho AS, Magna LA, Paiva e Silva RB. A portaria no 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. Cad. Saúde Pública 2003; 19(4):1195-1199.
- 5. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília (DF): ANVISA; 2002: 9-11.
- 6. Paixão MC, Cunha Ferraz MH, Januário JN, Viana MB, Lima JM. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C and Hb D in a pioneering population-based program of the newborn screening in Brazil. Hemoglobin 2001; 25(3): 297-303
- 7. Lobo CLC, Bueno LM, Moura P, Ogeda LL, Castilho S, Carvalho SMF. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Panam. Salud Publica. 2003; 13: 154-159
- 8. Telfe P, Coen P, Chakravorty S, Wilkey O, Evans J, Newell H, Smalling B et al. Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. Haematologica 2007;92(07):905-911.
- 9. Wu CJ, Krishnamurti L, Kutok JL, Biernacki M, Rogers, Zhang W, Antin JH, Ritz J. Evidence for innefective erithropoiesis in severe sickle cell disease. Blood. 2005; 106 (10): 3639-3645
- 10. O'Driscoll S, Height SE, Dick MC, Rees DC. Serum lactete dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease. British J. Haematol. 2007; 140: 206-209
- 11. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, McMahon LC, Farrer LA, Taylor JG, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. Blood. 2007;110(7): 2727-2735

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Marcos Fleury

UFRJ - Edifício do CCS

Av. Carlos Chagas Filho, 373 - bloco A - sala 47

Rio de Janeiro/RJ

E-mail: marcos.fleury@yahoo.com.br

Resistência a Fluoroquinolonas em *Escherichia coli* isoladas em cultura de urina*

Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from urine culture

Fagna Amorim de Oliveira^{1,2} & Keite da Silva Nogueira^{1,3}*

RESUMO - A infecção do trato urinário é uma das infecções mais comuns na prática clínica, sendo *Escherichia coli* o principal agente etiológico. As fluoroquinolonas são agentes antimicrobianos de amplo espectro utilizados na terapia empírica destas infecções, porém a resistência a estes fármacos vem aumentando de forma preocupante em todo o mundo. Neste estudo avaliou-se o perfil de susceptibilidade às fluoroquinolonas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de culturas de urina, pelo método de disco-difusão, segundo CLSI 2009. Foram testados ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino e norfloxacino. Das 167 amostras de *E. coli*, 49 (29,3%) foram consideradas resistentes a pelo menos uma quinolona testada. Os resultados demonstram a necessidade do conhecimento de padrões de resistência a fim de aperfeiçoar o tratamento.

Palavras-Chave: infecção urinária, resistência às quinolonas, Escherichia coli.

SUMMARY - Urinary tract infection is the most common infections in pratical clinical. Escherichia coli is also the main etiologic agent. The fluoroquinolones are broad-spectrum antibacterial agents used in the empirical theraphy of these infections. Antimicrobial resistance has been increasing in worldwide. This study evaluated the profile susceptibility to fluoroquinolones in samples of Escherichia coli isolated from urine culture. Used the method was disk diffusion. The following fluoroquinolones has been tested: ciprofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and norfloxacin. In a total of 167 E. coli samples, 49 (29,3%) had been considered resistant at least one quinolone tested. Based on these preliminary results, likely resistance standards are recomended in order to obtain a perfect treatment.

Keywords: urinary infection, quinolones resistance, Escherichia coli.

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma resposta inflamatória do epitélio, comumente devida à invasão bacteriana, podendo também ser causada por vírus, fungos e parasitas⁸. Os patógenos bacterianos comuns incluem gram-negativos tais como *Escherichia coli, Klebsiella spp, Proteus spp, Enterobacter spp, Pseudomonas spp e Serratia spp* e gram-positivos tais como *Enterococcus sp, Staphylococcus aureus e Streptococcus* do grupo B⁸.

A ITU sintomática afeta 30% das mulheres com idade entre 20 e 40 anos, uma prevalência 30 vezes maior do que em homens⁸. Normalmente está associada a microrganismos da microbiota fecal, que expressem fatores adicionais de virulência propiciando a instalação no trato urinário e posterior infecção⁹.

Os antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacino, cefalosporinas, penicilinas semi-sintéticas, nitrofurantoína e fosfomicina são os mais utilizados no tratamento das ITUs adquiridas na comunidade¹. Porém, o mesmo tem se tornado difícil devido ao aumento da resistência antimicrobiana aos beta-lactâmicos e a sulfametoxazol-trimetoprim entre os uropatógenos ao longo dos últimos anos. Como

conseqüência, as fluoroquinolonas têm sido utilizadas como primeira escolha no tratamento empírico de ITUs ³. Existindo, no entanto, evidências de que o aumento do uso de fluoroquinolonas como ciprofloxacino está associado à resistência a esta classe de antimicrobianos².

O objetivo principal deste trabalho é alertar para os riscos do uso empírico das quinolonas para tratamento das infecções do trato urinário, mesmo em pacientes ambulatoriais, devido ao elevado índice de resistência de *Escherichia coli* a esses antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Isolados de *E. coli*, obtidos em exames bacteriológicos de urina realizados no Laboratório Municipal de São Bento do Sul, durante o período compreendido entre Julho de 2007 e Maio de 2008. A origem dos pacientes era ambulatorial.

Cultura

As amostras de urina foram semeadas de forma quantitativa em ágar CLED, comercializado pela Newprov

Recebido em 05/06/2009 Aprovado em 13/04/2011

*Universidade Federal do Paraná e Laboratório Municipal de São Bento do Sul

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR

²Laboratório Municipal de São Bento do Sul

³Seção de Bacteriologia – Unidade de apoio Diagnóstico – HC UFPR

(Pinhais-Brasil), e incubadas por 18-24 horas a 37° C. Após este período avaliou-se o crescimento bacteriano, considerando-se bacteriúria significativa o valor de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) $\geq 10^{\circ}$ /mL. Foi considerada contaminação bacteriana quando o valor de UFC/mL era $\leq 10^{\circ}$ ou quando se observava o crescimento de dois ou mais tipos de colônias, sendo neste caso, solicitada nova amostra.

Identificação

Para a identificação bacteriana fez-se uso da bacterioscopia das colônias e foram realizadas provas bioquímicas para identificação das Enterobactérias com o kit comercial da Newprov (Pinhais-Brasil).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado por disco difusão em ágar, utilizando os discos de antibióticos (Laborclin-Pinhais-PR): Ciprofloxacino 05 μg, Gatifloxacino 05 μg, Levofloxacino 05 μg, e Norfloxacino 10 μg, pelo método Kirby-Bauer conforme recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2009.

Foram considerados resistentes às quinolonas todos os isolados com halo de inibição menor ou igual a 15 mm para ciprofloxacino, menor ou igual a 14 mm para gatifloxacino, menor ou igual a 13 mm para levofloxacino, menor ou igual a 12 mm para norfloxacino (CLSI, 2009).

RESULTADOS

No período compreendido entre julho de 2007 e maio de 2008 foram analisadas no Laboratório Municipal de São Bento do Sul 1530 amostras de urina para exame bacteriológico. Destas, o resultado foi negativo em 1286 amostras (84,05%) e positivo, com contagem superior a 10⁵ UFC/mL, em 209 amostras (13,66%). A porcentagem de amostras contaminadas foi de 2,29% (Fig. 1). Entre as amostras positivas, *Escherichia coli* foi o microrganismo mais isolado, totalizando 167 amostras (79,9%). Os isolados de *E. coli* foram avaliados para sensibilidade às quinolonas, sendo observada resistência *em E. coli* a pelo menos uma quinolona em 49 amostras (29,34%). Foi observada resistência às quatro quinolonas testadas em 37 amostras, conforme visualizado na Tabela 1.

Tabela I - Susceptibilidade dos isolados de E. coli às quinolonas

	CIP	NOR	GTF	LEV	TOTAL
1	R	R	R	R	37
2	R	s	s	s	7
3	R	R	s	s	5

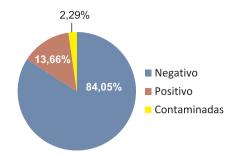


Figura 1 – Resultados das uroculturas

DISCUSSÃO

A porcentagem de amostras negativas foi elevada, provavelmente devido à grande quantidade de uroculturas que se realizam como controle pós-tratamento e nas gestantes. A baixa taxa de contaminação das amostras (2,29%) reflete o correto procedimento de coleta e transporte do material.

A distribuição percentual dos microrganismos obtidos neste estudo apresenta similaridade com o registrado por outros autores, ou seja, *E. coli* é o microrganismo mais frequentemente isolado em infecções do trato urinário, seguido de outros pertencentes à família *Enterobacteriaceae*⁶.

Os antimicrobianos ciprofloxacino, gatifloxacino, levofloxacino e norfloxacino, pertencentes ao grupo das quinolonas, apresentaram uma alta percentagem de resistência para *E. coli*, que pode ser atribuída a sua utilização massiva e indiscriminada na prática clínica, desde a sua introdução comercial. Dada a alta resistência destes microrganismos frente às quinolonas, a sua utilização como antimicrobianos de primeira escolha no tratamento de ITUs deve ser revista.

Como pode ser visualizado na Figura 2, houve discordância nas taxas de sensibilidade das diferentes quinolonas, o que pode ser explicada pelo mecanismo de aquisição da resistência em *E. coli*, uma vez que o nível de resistência depende da enzima-alvo afetada, e do número de mutações acumuladas. Além disso, há uma relação entre o nível de resistência e a potência específica de cada fármaco, principalmente para as quinolonas mais novas⁷. As novas quinolonas como gatifloxacino e levofloxacino possuem maior potência e consegue atuar em duas enzimas simultaneamente,

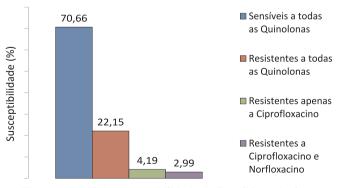


Figura 2- Perfil de susceptibilidade de E. coli às quinolonas

Legenda: (CIP) ciprofloxacino, (NOR) norfloxacino, (GTF) gatifloxacino, (LEV) levofloxacino, R, resistência; S, sensibilidade.

com isso a bactéria terá que apresentar mutações nas duas enzimas para expressão da resistência, uma vez que a atuação em qualquer uma das enzimas será suficiente para inibir a bactéria⁴. É conveniente lembrar que esse novo grupo de quinolonas é utilizado para infecções respiratórias e não para infecções urinárias, tendo sido testadas apenas com objetivo de verificar a presença de múltiplos mecanismos de resistência.

A resistência aos antimicrobianos tem aumentado em bacilos gram-negativos em todo o mundo. Este é um dos maiores problemas de saúde pública e uma das causas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. Uma terapia empírica adequada requer o conhecimento de padrões de provável resistência bacteriana⁵.

CONCLUSÕES

Diante da grande incidência de falha terapêutica e visto que o tratamento inicial é empírico, impõe-se a cada serviço o conhecimento da prevalência e freqüência dos agentes envolvidos em infecções urinárias e também o perfil de sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica, buscando assim a otimização do tratamento e a redução do aparecimento de novos casos de resistência.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o índice de resistência de *E. coli* isoladas de trato urinário às quinolonas é elevado na população ambulatorial de São Bento do Sul, não devendo, portanto, estes antimicrobianos serem utilizados como primeira escolha pelos clínicos da região na terapia empírica de infecção do trato urinário, sendo indicada a realização de culturas e antibiograma.

REFERÊNCIAS

- 1-ARSLAN, H.; AZAP, O. K.; ERGÖNÜL, Ö.; TIMURKAYNAK, F. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-adquired urinary tract infections in Turkey, Journal of Antimicrobial Chemotheraphy, vol. 56, p.914-918, 2005.
- 2- DREWS, S. J.; POUTANEN, S. M.; MAZZULLI, T.; MCGEER, A. J.; SARABIA,A.; PONG-PORTER, S.; RZAYEV, Y.; WILLEY, B.; GREEN, K.; LOW, D. E. Decreased prevalence of virulence factors among ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. Journal of Clinical Microbiology. vol. 43, p.4218-4220, 2005.
- 3- HOOTON, T. M. Fluoroquinolones and resistance in the treatment of uncomplicated urinary tract infection. International Journal of Antimicrobial Agents. Vol.22, S65-S62, 2003.
- 4- HOOPER, D.C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases and anti-topoisomerase resistance. Clinical Infectious Diseases. Chicago,v.27, (Suppl 1): S54-63, 1998.
- 5- LOCKHART S. R.; ABRAMSON, M. A.; BEEKMANN, S. E.; GALLAGHER, G.; RIEDEL, S.; DIEKEMA, D. J.; QUINN, J. P.; DOERN, G. V. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. Journal of Clinical Microbiology. vol. 45, p.3352-3359, 2007.
- 6-NYS, S.; MERODE, T.V.; BARTELDS, A. I. M.; STOBBERINGH, E. E. Urinary tract infections in general practice patients: diagnostic tests versus bacteriological culture. Journal of Antimicrobial Chemotheraphy. vol. 57, p. 955-958, 2006.
- 7- SANDERS, C. C. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. Clinical Infectious Diseases. Chicago, v. 32 (suppl 1), p.S1-8, 2001.
- 8- WALSH, P.C.; RETIK,A.B.; VAUGAN,E.D.; WEIN,A.J. Campbell's Urology. 8 ed. vol 1. cap 14.p 513-590, 2002.
- 9-ZORC, J.J.; KIDDOO, D.A.; SHAW, K. N. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infections. Clinical Microbiology Reviews. vol. 18, p. 417-422, 2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Keite da Silva Nogueira

R. Comendador Macedo, 275 Ap.63 Curitiba/ PR CEP 800060-030 E-mail: fagnaamorim@yahoo.com.br

Prevalência de *Diabete Mellitus* e correlação entre testes de glicemia em pacientes idosos atendidos no Ambulatório do Instituto de Geriatria e Gerontologia, PUCRS*

Prevalence of *diabetes mellitus* and correlation between tests of glucose in elderly patients treated at the Institute of Geriatrics and Gerontology - PUCRS

Kim Suso¹, Paula Engroff², Luisa Ely³, Yukio Moriguchi⁴, Geraldo A. De Carli⁵, Fernanda B. Morrone⁶

RESUMO - Este artigo visa correlacionar os diferentes testes de glicemia em pacientes idosos atendidos no Ambulatório do IGG, PUCRS, bem como demonstrar a prevalência de *Diabete Mellitus* nesta população. Entre 355 idosos avaliados no estudo, 66 (18,59 %) foram diagnosticados diabéticos. Foram avaliadas a glicemia de jejum, a glicemia media estimada (GME) e o hemoglicoteste (HGT) de 33 pacientes sendo 28 mulheres e 5 homens, com uma idade media de 74 anos. Os resultados da GME, HGT e glicemia, apresentaram valores acima das metas em 16 (48,0 %), 9 (27,0 %) e 7 (21,0 %) pacientes, respectivamente. A análise estatística demonstra uma diferença significativa nos resultados apresentados por homens e mulheres, estando as mulheres em uma situação considerada adequada em relação aos níveis glicêmicos e os homens apresentando valores muito acima das metas. O estudo estatístico demonstrou existir uma correlação muito significativa (p < 0,0001) entre os valores da glicemia de jejum e da hemoglobina glicada (A1c) das mulheres, embora a correlação entre a A1c e o HGT não seja significativa (p < 0,59). A correlação entre os valores da glicemia de jejum e da A1c demonstrou não ser significativa (p < 0,75). Entretanto a A1c e o HGT demonstraram-se fortemente correlacionados (p < 0,01).

Palavras-Chave: Diabete Mellitus, idosos, glicemia.

SUMMARY - This paper aims to correlate the different tests of blood glucose in elderly patients treated at the IGG, PUCRS, as well as to demonstrate the prevalence of DM in this population. Among 355 individuals evaluated in the study, 66 (18.59%) were diagnosed with diabetes. We have measured the fasting blood glucose, the estimated average glucose and hemoglucotest of 33 patients with 28 women and 5 men, with a mean age of 74 years. The results of eAG, HGT, showed values above the targets in 16 (48.0%), 9 (27.0%) and 7 (21.0%) patients, respectively. The statistical analysis showed a significant difference in the results presented by men and women, with women in a situation deemed appropriate in regard to the blood glucose levels and men with values well above the targets. Statistical analysis demonstrated that there was a very significant correlation (p <0.0001) between the values of fasting blood glucose and A1c women, although the correlation between A1c and HGT is not significant (p <0.59). The correlation between the values of fasting plasma glucose and A1c showed not significant (p <0.75). However, the A1c and HGT showed to be strongly correlated (p <0.01). **Keywords** – Diabete Mellitus, elderly, blood glucose.

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas²⁰.

O DM está se tornando a epidemia do século e já afeta cerca de 285 milhões de pessoas em todo o mundo. Até 2030 a previsão é de que esse número chegue a 439 milhões¹⁷. No Brasil, a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2 %, prevalência que aumenta com a idade, atingindo 20,7 % da população com idade superior a 60

anos²⁷. Com o progresso da doença aumenta o risco do desenvolvimento de complicações crônicas características, tais como: retinopatia, angiopatia, doença renal, neuropatia, proteinúria, hiperlipêmia e doença aterosclerótica²⁰.

Os níveis de glicose sanguínea persistentemente elevados são tóxicos ao organismo por três mecanismos diferentes: mediante a promoção da glicação de proteínas, pela hiperosmolaridade e pelo aumento dos níveis de sorbitol dentro da célula²⁴.

Os idosos são aqueles que apresentam a maior gama de patologias e recebem o maior número de medicamentos quando comparados a outros grupos de pacientes. Alterações nas funções cognitivas, redução dos hormônios contra-regulatórios e redução do glicogênio

Recebido em 23/12/2009
Aprovado em 03/03/2011

* Fonte Financiadora: CNPq, Projeto nº 484367/07-2º

¹Acadêmico do Curso de Farmácia da PUCRS

²Farmacêutica-Bioquímica do Instituto de Geriatria e Gerontologia do Hospital São Lucas

³Mestranda do Instituto de Geriatria e Gerontologia do Hospital São Lucas

⁴⁵Professor Doutor do Instituto de Geriatria e Gerontologia do Hospital São Lucas

⁴⁵Professor Doutor da PUCRS

hepático são alterações que ocorrem devido ao envelhecimento, e que evidenciam que esta população possui particularidades que demonstram que cuidados e considerações especiais sejam mais enfatizados em estudos sobre o DM^{5,12,8}.

Um bom controle glicêmico é fundamental para a melhora na qualidade de vida do diabético, principalmente nos idosos, pois além do maior risco de desenvolver as complicações crônicas do DM, devido a altas taxas de glicose no sangue, a hipoglicemia é uma situação muito perigosa, sendo a glicemia de jejum, o HGT (hemoglicoteste) e a A1c (hemoglobina glicada) métodos muito utilizados para o controle glicêmico^{11,7,13}.

AA1c é uma importante ferramenta para a avaliação da efetividade do tratamento do diabete. Este exame reflete uma média da glicemia dos 2-3 meses anteriores ao teste. Quanto maiores os níveis de A1c, como também é conhecida, maiores os riscos do desenvolvimento das complicações crônicas do diabete^{20,4,25}.

Com base nos estudos *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT)⁹ e *United Kingdom prospective Diabetes Study* (UKPDS)^{1,26}, ficou estabelecido que os níveis de A1c acima de 7 % estão associados a um maior risco de complicações crônicas. Por esta razão, o conceito de tratamento define 7% como o limite superior do valor aceitável para um paciente com DM bem controlado²².

Em 2008, foi publicado um estudo denominado A1c-Derived Average Glucose Study Group (ADAG) demonstrando a linearidade dos valores de A1c e correspondentes níveis de glicemia em mg/dL, sendo introduzido o conceito de glicose media estimada (GME)³.

Devido aos resultados do estudo ADAG, a *American Diabetes Association* (ADA), a *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) e a *International Diabetes Federation* (IDF) lançaram, em junho de 2008, uma intensa campanha de divulgação do conceito de glicemia média estimada (GME) como uma nova forma de expressar os resultados (mg/dL), para substituir a expressão usual em percentual de A1c²¹. Esta nova forma de visualização dos valores vem para facilitar a compreensão dos pacientes e demonstrar, de uma forma mais usual, como se comporta a taxa de glicose dos diabéticos³.

A grande variedade de métodos e a escassez de valores de referência relativos aos idosos evidenciam a necessidade de estudos que relacionem as metodologias utilizadas e que divulguem metas para as diferentes populações acometidas pelo diabete.

A correlação entre os valores da glicemia de jejum, do HGT e da A1c serve para demonstrar a variabilidade glicêmica, caracterizada pela amplitude de oscilações dos níveis de glicemia nos diversos horários do dia. Estas variações constituem um fator de risco isolado e independente dos níveis médios de glicemia em termos de potencial de risco para a função endotelial, favorecendo as complicações cardiovasculares no paciente diabético 14,15,16.

Portanto, este artigo visa correlacionar os diferentes testes de glicemia em pacientes idosos atendidos no Ambulatório do Instituto de Geriatria e Gerontologia, PUCRS,

bem como demonstrar a prevalência de DM nestes pacientes.

PACIENTES E MÉTODOS

Foi realizado um estudo prospectivo, quantitativo e descritivo com pacientes idosos diabéticos atendidos no Ambulatório do Instituto de Geriatria e Gerontologia (IGG) da PUCRS, durante os meses de abril a novembro de 2009.

Os diabéticos foram selecionados aleatoriamente seguindo as consultas agendadas durante o período do estudo, através da analise dos prontuários dos idosos.

Os indivíduos incluídos no estudo eram diabéticos do tipo I ou tipo II de ambos os sexos com idade superior a 60 anos, conscientes, orientados e em boas condições clínicas. Os pacientes com fatores que pudessem limitar a qualidade e a quantidade de potenciais anos de vida, como sequelas importantes de acidente vascular cerebral (AVC), paralisia, demência ou outra que inviabilize esquemas terapêuticos complexos, necessários para um controle glicêmico ideal, foram excluídos do estudo 19.

Inicialmente estes pacientes foram entrevistados utilizando um questionário com dados como idade, gênero, cor, escolaridade, tabagismo, presença de doenças crônicas adjacentes e o número de medicamentos utilizados. Neste mesmo momento foi mensurado o HGT, utilizando um aparelho accu-check active® devidamente aferido.

Estas entrevistas foram realizadas durante as primeiras horas da tarde, entre 13.30 h e 15.30 h, para que obtivéssemos um valor de glicemia fora do jejum.

As amostras de sangue, coletadas respeitando a necessidade de jejum de 8 horas, foram processadas no laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Lucas, Porto Alegre, RS.

Os valores de A1c expressos em porcentagem foram convertidos em mg/dL através da equação: 28,7 X A1c – 46,7 = GME, disponibilizada no site da ADA³.

A classificação dos parâmetros bioquímicos para a glicemia de jejum e pós-prandial esta baseada nas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), para pacientes idosos com co-morbidades (2007)¹². Os parâmetros de A1c estão baseados nos valores da ADA.

Os dados foram analisados utilizando as ferramentas de analise do Excel (correlação e regressão), assim como o teste qui-quadrado, para comparação entre os grupos, com significância para p<0,05.

RESULTADOS

Durante o período do estudo o Ambulatório do IGG do Hospital São Lucas atendeu 355 pacientes, entre estes 66 (18,59%) com diagnóstico de DM. Entre os diabéticos 33 possuíam os exames e as características adequadas para inclusão no estudo. As características de gênero, idade media, doenças crônicas adjacentes, número médio de medicamentos utilizados por paciente e perfil dos medicamentos hipoglicemiantes, estão apresentadas na Tabela 1. Nenhum paciente relatou ser tabagista.

Os resultados da A1c, HGT e glicose de jejum, apresentaram valores acima das metas em 16 (48,0%), 9 (27,0%) e 7 (21,0%) pacientes, respectivamente. Isto demonstra que metade dos pacientes considerados com um controle glicêmico inadequado quando avaliados pela A1c, apresentaram valores dentro das metas se avaliados pelo teste de glicemia de jejum. A estatística demonstra uma diferença significativa nos resultados apresentados por homens e mulheres (Tabela 2).

O valor de A1c estabelecido como limítrofe foi 7,0%, devido ao fato de todos os participantes do estudo apresentaram boas condições clínicas, pois provavelmente estes seriam os que mais se beneficiariam de um controle glicêmico intensivo, sem riscos de hipoglicemia²⁸.

Embora, os valores médios encontrados nos exames realizados nas mulheres estivessem dentro dos valores considerados normais, os valores dos homens apresentaram-se totalmente descontrolados e com uma grande diferença entre a glicose de jejum e a glicemia média estimada, que apresentou valores próximos do HGT.

Os valores da glicemia média estimada foram correlacionados aos valores da glicemia de jejum e do HGT, também foi calculada a significância desta relação (Tabela 3).

Tabela 1. Características gerais e medicamentosas dos pacientes (n=33)

Características	Homens	Mulheres	
Número de pacientes	5 (15,16%)	28 (84,84%)	
Idade Media	73,4 (DP=7,6)	74,5 (DP=6,3)	
Presença de patologias adjacentes	5 (100%)	27 (96,42%)	
Nº médio de medicamentos	6,2 (DP=2,5)	7 (DP=1,9)	
Uso de medicamentos			
Insulina	1 (20%)	3 (10,7%)	
Hipoglicemiante oral	4 (80%)	24 (85,7%)	
Hipoglicemiante oral + insulina	0 (0%)	1 (3,6%)	

Tabela 2. Características glicêmicas dos pacientes (n=33)

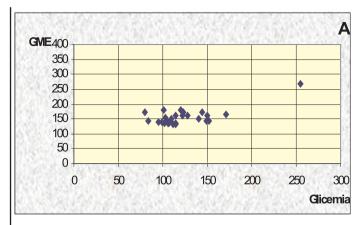
Características	Homens	Mulheres	р
Glicemia (mg/dl)	167 (DP=68)	122 (DP=34)	0,028*
HGT (mg/dL)	262 (DP=120)	131 (DP=54)	0,000**
A1c (%)	10,7 (DP=3,0)	7,0 (DP=1,0)	0,000**
GME (mg/dL)	260 (DP=86)	155 (DP=27)	0,000**

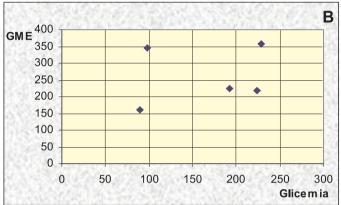
^{*}p<0,05, **p<0,01

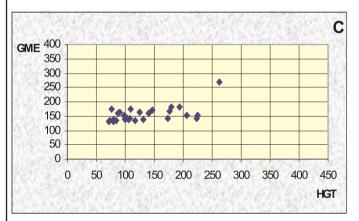
Tabela 3. Correlação dos valores de glicemia, HGT e GME (n=33)

	Mulheres		Homens	
	Glicemia de jejum x GME	HGT x GME	Glicemia de jejum x GME	HGT x GME
Correlaçã o	0,72	0,57	0,20	0,95
Р	< 0,0001**	< 0,59	< 0,75	< 0,01**

^{**}p<0,01







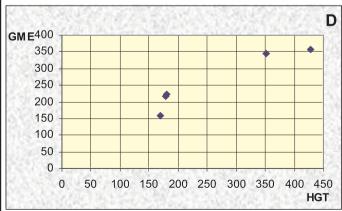


Figura 1. Correlação entre os valores de glicemia por dispersão (A) Glicemia de jejum x GME em mulheres, (B) Glicemia de Jejum x GME em homens, (C) HGT x GME em mulheres, (D) HGT x GME em homens. Foi considerado significativo p<0,05 para teste de correlação e regressão.

O teste estatístico demonstrou existir uma correlação muito significativa (p<0,0001) entre os valores da glicemia de jejum e da GME das mulheres, com uma correlação de 0,72, o que indica que 52% dos valores possuem uma relação mutua. Porém, a correlação entre a GME e o HGT foi pequena (0,57), apresentando uma relação de 32% entre os valores, não sendo significativa (p=0,59) (Tabela 3 e Figura 1).

O resultado estatístico dos valores referentes aos pacientes do sexo masculino apresentou-se diferente do encontrado nas pacientes do sexo feminino, sendo a correlação entre os valores da glicemia de jejum e da GME de 0,20, o que seria uma relação de 4% entre ambas, demonstrando não ser significativa (p=0,75). Entretanto a GME e o HGT demonstraram-se fortemente correlacionados (p<0,01), com uma relação mutua de 91 % e correlação de 0,95.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A prevalência de idosos diabéticos no Ambulatório do IGG-PUCRS (18,59 %) demonstrou-se abaixo da prevalência nacional (20,7 %) divulgada pelo Ministério da Saúde em 2009²⁷. O número médio de medicamentos utilizados pelos idosos do estudo foi de 6,2 (±2,5) medicamentos por homem e 7,0 (±1,9) medicamentos por mulher, apresentando-se muito acima dos 2,9 medicamentos/paciente demonstrados por Marin *et. al.* em 2008¹⁸.

O baixo número de pacientes do sexo masculino atendidos no Ambulatório comparado ao número de pacientes do sexo feminino, alerta para a falta de conscientização dos homens em relação à importância de um acompanhamento especializado para evitar as complicações provenientes do envelhecimento e do diabete, comprovada pelo descontrole glicêmico apresentado por 100 % dos homens. As mulheres apresentaram um melhor controle glicêmico, com níveis médios dentro das metas em todos os exames do estudo.

Por outro lado, os valores do HGT próximos a GME, ambos considerados acima das metas de um bom controle glicêmico, e o resultado da glicemia de jejum, com valores muito próximos a estas metas, evidenciam que foram mantidas taxas muito elevadas de glicemia por longos períodos, deste modo, desenvolvendo os altos valores de A1c apresentados no estudo. Isto demonstra as oscilações hiperglicêmicas reconhecidas como importante fator de risco para complicações cardiovasculares¹⁶.

Aglicemia pós-prandial apresentou-se fora dos valores de referência em 80 % dos pacientes do sexo masculino, e em 21,5 % das pacientes do sexo feminino, o que pode contribuir para o inadequado controle glicêmico, sendo um fator de risco para doenças microvasculares e macrovasculares. Um fato importante é que a glicemia pós-prandial foi realizada 2 a 4 horas após o almoço, tempo suficiente para que os valores da glicemia estivessem próximos aos pré-prandiais^{2,6,10,23}.

Estas observações sinalizam que uma forma mais abrangente de controle glicêmico, tanto por parte dos pacientes, realizando o HGT diariamente em diferentes momentos para avaliar a eficiência do plano alimentar e evitar prolongamentos de altos níveis glicêmicos, como dos profissionais da saúde, utilizando todas as ferramentas disponíveis para avaliar tanto a

situação glicêmica momentânea como de longos períodos, seja realizada, prevenindo complicações causadas por níveis elevados e/ou oscilações bruscas da glicemia, proporcionando uma melhor qualidade de vida.

Concluímos que, embora exista correlação entre os valores dos testes de glicemia, a utilização de mais de um método é necessária para obter-se um panorama completo do perfil glicêmico dos pacientes, e que a GME é uma importante ferramenta para a compreensão do comportamento glicêmico.

AGRADECIMENTOS

Às secretarias do ambulatório do IGG Carmem e Marlene e a professora Nulce Regina Benvenutti. Este trabalho teve apoio financeiro através do CNPq, Projeto Nº 484367/07-2.

ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da PUCRS (n°07/03671) e só participaram da pesquisa os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

REFERÊNCIAS

- 1. ABE, M.; MATSUMOTO, K. Glycated hemoglobin or glycated albumin for assessment of glycemic control in hemodialysis patients with diabetes? *Nat Clin Pract Nephrol*, 4: 482-3, 2008. Disponível em: http://www.medscape.com/viewarticle/580573. Acessado em: 10 Nov. 09.
- 2. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes, 2007. Disponivel em: http://care.diabetesjournals.org/content/30/suppl_1/S4.full. Accessado em: 04 de Dezembro de 2009.
- 3. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. estimated Average Glucose, eAG. Disponível em: http://professional.diabetes.org/glucosecalculator.aspx. Acessado em 30 de Novembro de 2009.
- 4. ANDRIOLO, A.; VIEIRA, J.G.H. Diagnóstico e acompanhamento laboratorial do diabetes *mellitus*. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar/medicina laboratorial. 1. ed. São Paulo, Manole, 37-42, 2008.
- 5. BISSON, M.P. Farmacologia Clínica & Assistência Farmacêutica. 2. ed. Barueri: Manole, 2007.
- $6.\,BONORA, E.\,Post-prandial\,peaks\,as\,a\,risk\,factor\,for\,cardiovascular\,disease:\,epidemiological\,perspectives.\,Int\,J\,Clin\,Pract\,Suppl.\,29:\,5-11,\,2002.$
- 7. BRY, L.; CHEN, P.C.; SACKS, D.B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivates on assay for glycohemoglobin. Clin Chem, 47: 153-63, 2001.
- 8. CALIFORNIA HEALTHCARE FOUNDATION/AMERICAN GERIATRICS SOCIETY PANEL ON IMPROVING CARE FOR ELDERS WITH DIABETES. Guidelines for Improving the Care of the Older Person with Diabetes Mellitus. Journal of the American Geriatrics Society, 51: 265-79, 2003
- 9. DCCT RESEARCH GROUP. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of Diabetes on the development and progression of the long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 329: 977-86. 1993.
- 10. DINEEN, S.F. The postprandial state: mechanisms of glucose intolerance. Diabet Med, 14: 19-24, 1997.
- 11. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da SBD: Avaliação do Controle Glicêmico, 2008.
- 12. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da SBD: Tratamento ao paciente idoso diabético, 2007.
- 13. FORSMAN, R.W. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? Clin Chem, 42: 813-816, 1996.
- 14. GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA-A1C. A importância da hemoglobina glicada (A1C) para a avaliação do controle glicêmico em pacientes com diabetes *mellitus*: aspectos clínicos e laboratoriais. Posicionamento Oficial (versão 2003). Disponível em: ">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=8&tp=3>">http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id

- 15. GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA-A1C. A importância da hemoglobina glicada (A1C) para a avaliação do controle glicêmico em pacientes com diabetes *mellitus*: aspectos clínicos e laboratoriais. Posicionamento Oficial (versão 2004). Disponível em: http://www.sbpc.org.br/profissional/noticia.diverso.php?id=5&tp=3. Acessado em 29 de Outubro de 2009.
- 16. HANEFELD, M.; CAGATAY, M.; PETROWITSH, T.; NEUSER, D.; PETZINNA, D.; RUPP, M. Acarbose reduces the risk for myocardial infarction in type 2 diabetic patient: Meta-analysis of seven long-term studies. Eur Heart J. 25 (10): 6, 2004.
- 17. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. The Global Burden. Bruxelas, 2009. Disponível em: http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes-and-impaired-glucose-tolerance. Acessado em: 05 de Dezembro de 2009.
- 18. MARIN, M.J.S.; CECÌLIO, L.C.O.; PEREZ, A.E.W.U.F.; SANTELLA, F.; SILVA, C.B.A.; GONÇALVES FILHO, J.R.; ROCETI, L.C. Caracterização do uso de medicamentos entre idosos de uma unidade do Programa Saúde da Família. Cad. saúde pública, 24 (7): 1545-1555, 2008.
- 19. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estatuto do Idoso. 1. ed., Brasília, 2003.
- 20. MOTTA, V.T. Bioquímica clinica para o laboratório: princípios e interpretações. 5. Ed. Rio de Janeiro, MedBook, 43 –62, 2009.
- 21. NATHAN, D.M.; KUENEM, J.; BORG, B.; Translating the A1C assay into estimated average glucose values. Diabetes Care, 31, 1-16, 2008.
- 22. NETTO A.P.; ANDRIOLO A.; FRAIGE FILHO F.; TAMBASCIA M.; GOMES M.B.; MELO M. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. J. Bras. Patol. Med. Lab., 45(1): 2009.
- 23. PAMPANELLI, S.; TORLENE, E.; LALLI, C. Improved postprandial metabolic control after subcutaneous injection of a short-acting insulin analog in IDDM of short duration with residual pancreatic beta-cell function. Diabetes Care, 18(11): 1452-9, 1995.

- 24. SACKS, D.B.; BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. St. Louis, Elsevier Saunders, 837-901, 2006
- 25. SUMITA, N.M.; ANDRIOLO, A. Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes *mellitus*. J Bras Patol Med Lab, 42: editorial, 2006
- 26. UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. Lancet, 352: 837-53, 1998.
- 27. VIGITEL BRASIL 2008. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- 28. WEYKAMP, C.W.; MIEDEMA, K.; HAAN, T.; DOELMAN, C.J.A. Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. Clin Chem, 45: 438-440, 1999.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Fernanda B. Morrone Faculdade de Farmácia - PUC-RS

Tel.: (51) 3320 3512 Fax: (51) 3320 3612

E-mail: fernanda.morrone@pucrs.br

Diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas

Differential diagnosis of microcytic and hypochromic anemia

Paulo Cesar Naoum¹

RESUMO - As anemias microcíticas e hipocrômicas são resultantes de várias condições patológicas. Por serem as mais prevalentes na população brasileira, muitas vezes o diagnóstico clínico depende dos resultados das análises laboratoriais. Em muitos casos há necessidade da utilização de técnicas específicas para determinar se esta anemia se deve à deficiência de ferro ou aos diferentes tipos de talassemias. O presente trabalho mostra as principais aplicações técnicas no diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas.

Palavras-Chaves: Anemias, deficiência de ferro, talassemias.

SUMMARY - Microcytic and hypochromic anemia are the results of several pathologic conditions. They are the most prevalent forms of anemia in the Brazilian population, and frequently the clinical diagnosis depends on the laboratorial analysis. In many cases it is necessary to use specific techniques to determine if this anemia is due to iron defficiency or different types of thalassemia. This article shows the main technical applications used for differential diagnosis of microcytic and hypochromic anemia.

Keywords: Anemia, iron defficience, thalassemia.

INTRODUÇÃO

Anemia é uma constatação clínica e laboratorial resultante de várias condições patológicas. Define-se clinicamente a anemia quando há diminuição da concentração da hemoglobina circulante². A intensidade do grau de anemia pode ser dimensionada em discreta (Hb: <12g/dL até 10g/dL), moderada (Hb: <10g/dL até 8g/dL) e grave (Hb: <8g/dL)³. Esse dimensionamento evidentemente deve estar relacionado com valores padronizados para pessoas saudáveis do mesmo sexo, da mesma faixa etária e sob as mesmas condições ambientais.

Sob o ponto de vista da análise laboratorial as anemias são classificadas por meio da utilização dos índices hematimétricos de VCM (volume corpuscular médio) e de HCM (hemoglobina corpuscular média), conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização laboratorial das anemias conforme os índices hematimétricos de VCM e HCM.

Tipos de anemia	VCM	нсм
Normocítica Normocrômica	Normal	Normal
Microcítica Hipocrômica	Diminuído	Diminuído
Macrocítica Normocrômica	Aumentado	Normal

Entre os três tipos de anemias apresentados na tabela 1 a anemia microcítica e hipocrômica é a mais prevalente no Brasil e com grande diversidade de causas⁷. Por essa razão, o diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas que se faz utilizando-se de diversas técnicas laboratoriais é muito importante para definir causas e condutas clínicas e terapêuticas.

Principais Causas que Originam as Anemias Microcíticas e Hipocrômicas

A causa mais frequente de anemia microcítica e hipocrômica é a deficiência de ferro para compor a síntese da hemoglobina. Por sua vez, as origens da deficiência de ferro são diversas, conforme mostra a tabela 2. Certamente devido à abrangência desse fato causal, é comum no Brasil a conduta médica em suprir terapeuticamente com ferro medicamentoso os pacientes com o diagnóstico primário de anemia microcítica

Tabela 2 – Principais causas desencadeantes da deficiência de ferro.

Causas	Particularidades
1 – Social	Pobreza, contaminações parasitárias, saneamento básico deficiente.
2 – Hemorragias 2.1 – Gastrointestinal 2.2 – Pulmonar 2.3 – Uterina 2.4 – Renal	Úlcera, diverticulose, nematódeo, etc. Hemossiderose pulmonar. Menorragia, mioma, etc. Hematúria, hemodiálise crônica.
3 – Gestacional	Transferência de ferro para o feto.
4 – Hemossiderinúria	Hemodiálise crônica, HPN*.
5 – Má absorção	Gastrite crônica, redução de estômago.
6 – Dieta deficiente	Lactação, hábitos alimentares restritos.

*HPN = Hemoglobinúria Paroxística Noturna

Recebido em 14/04/2011 Aprovado em 08/06/2011 ¹Biomédico, Professor Titular pela UNESP e hipocrômica sem o conhecimento do seu "status" de ferro⁷. Muitos desses pacientes não apresentam melhora da anemia após longo tempo de tratamento e, por essa razão, o médico inicia a busca de outras causas que poderiam ter induzido a anemia microcítica e hipocrômica. Entre as principais possibilidades destacam as talassemias alfa menor, beta menor e interativas (Tal. Beta/Hb S; Tal. Beta/Hb C), as anemias das doenças crônicas, a anemia sideroblástica e a anemia por intoxicação com chumbo⁸. Desse grupo o tipo mais freguente é o da talassemia alfa menor que apresenta prevalência entre 3 a 5% na nossa população, seguida da talassemia beta menor com 0,5 a 1%^{4,5}. A anemia das doenças crônicas geralmente está relacionada com motivos oncológicos ou endocrinológicos, portanto com direcionamentos clínicos específicos9. A anemia por intoxicação de chumbo está quase sempre relacionada com medicina do trabalho e, por fim, a anemia sideroblástica é a forma menos prevalente de anemia microcítica e hipocrômica⁶.

A tabela 3 apresenta as principais causas desse grupo de anemias microcíticas e hipocrômicas que não respondem ao tratamento com ferro.

Tabela 3 – Principais causas de anemias microcíticas e hipocrômicas que não respondem ao tratamento com ferro

Causas	Particularidades	
1 – Talassemias 1.1 – Alfa menor 1.2 – Beta menor 1.3 – Tal. Beta/ Hb C 1.4 – Tal. Beta/ Hb S	Anemia discreta desde o nascimento Especificidades: Presença de Hb H * Anemia discreta desde o nascimento Especificidade: Hb A ₂ aumentada Anemia discreta desde o nascimento Especificidade: Hb CF ou Hb C > Hb A Anemia discreta a grave Especificidade: Hb SF ou Hb S > Hb A	
2 – Anemia das doenças crônicas	Câncer, leucemias, linfomas, diabetes, etc.	
3 – Intoxicação com Chumbo	Pintores automotivos, trabalhadores que manuseiam baterias, etc.	
4 – Anemia Sideroblástica	Hereditária: deficiência do gene Ala-sintetase (cromossomo X) com expressão recessiva. Forma grave em homens.	
	Adquirida: SMD**, anemia megaloblástica, câncer, medicação crônica com vit. B6, sulfa e anti-tuberculose.	

^{*} Hb H = Intraeritrocitária ou fracionada eletroforeticamente.

Diagnóstico Laboratorial das Anemias Microcíticas e Hipocrômicas

O diagnóstico laboratorial das anemias microcíticas e hipocrômicas inicia-se com a avaliação do eritrograma, conforme mostra a tabela 4. O caso 1 mostra um eritrograma típico da anemia ferropriva, enquanto que o caso 2 exemplifica a anemia microcítica e hipocrômica da talassemia beta menor.

As avaliações específicas com a utilização de técnicas que dimensionam o "status" de ferro, as eletroforeses qualitativa

Tabela 4 – Eritrogramas típicos de anemia ferropriva (caso 1) e talassemia beta menor (caso 2), independente de sexo e idade

Parâmetros	Caso 1	Caso 2	
Eritrócitos (/mm³) Hematócrito (%) Hemoglobina (g/dL) VCM (fL) HCM (pg) CHCM (g/dL) RDW (%)	4.000.000 (↓) 30 (↓) 10 (↓) 75 (↓) 25 (↓) 33 (N) 17 (↑)	5.000.000 (N) 34 (\$\darklet\$) 10 (\$\darklet\$) 68 (\$\darklet\$) 20 (\$\darklet\$) 29 (N) 17 (\$\darklet\$)	
Morfologia Comum	Anisocitose Poiquilocitose Micrócitos Leptócitos Céls. Alvo Hipocromia	Anisocitose Poiquilocitose Micrócitos → Esquisócitos → Dacriócitos Céls. Alvo Hipocromia → Pontilhados basófilos	

Obs.: As setas (\rightarrow) indicam os principais diferenciadores citológicos, comuns em portadores de talassemias.

e quantitativa de hemoglobinas e a contagem de reticulócitos, são capazes de diferenciar a grande maioria dos casos de anemia microcítica e hipocrômica³.

O "status" de ferro no processo da investigação laboratorial é composto por três dosagens bioquímicas (ferro sérico, ferritina e capacidade total de ligação do ferro ou CTLF) e uma avaliação obtida por cálculo matemático que resulta na saturação de transferrina (Ferro sérico x 100/CTFL). Por meio do painel de avaliação de Ferro sérico, ferritina, CTLF e saturação da transferrina é possível supor as principais causas de anemia microcítica e hipocrômica⁸ (tabela 5).

Muitas vezes, entretanto, os resultados da avaliação do "status" de ferro não consegue identificar a causa da anemia microcítica e hipocrômica. Nessas situações as eletroforeses qualitativas e quantitativas de hemoglobinas podem auxiliar a definição do diagnóstico. A consulta à tabela 6 facilita a interpretação dos principais tipos de talassemias relacionadas

Tabela 5 – Painel de avaliação do "status" de ferro das principais anemias microcíticas e hipocrômicas

Causas	Painel do "status de ferro"			
Causas	Ferro Sérico	Ferritina	CTFL	Saturação
Def. Ferro	D	D	N/A	D
Inflamação + Def. Ferro	D	А	N/D	D
Talassemias	N	N/A	N	N/A
Sideroblástica	N/A	N/A	N	N/A

A = aumentado, D = diminuído, N = normal.

^{**} SMD = Síndrome mielo-displásica.

Tabela 6 – Identificação dos principais tipos de talassemias que apresentam anemia microcítica e hipocrômica

Talassemias	Hb (g/dL)	Resultado eletroforético
Alfa menor	10 – 12	b AH – Concentração de Hb H: 3 a 8%
Beta menor	10 – 14	b AA ₂ – Concentração de Hb A ₂ : 4 a 7%
Tal. Beta/Hb S	7 – 11	b SF ou Hb S > Hb A *
Tal. Beta/Hb C	9 – 12	b CF ou Hb C > Hb A **

^{* =} Concentração da Hb S maior que da Hb A

com anemia microcítica hipocrômica6.

A contagem de reticulócitos auxilia o diagnóstico laboratorial da anemia microcítica e hipocrômica. Nas situações decorrentes da deficiência de ferro e na anemia sideroblástica, os valores de reticulócitos se situam abaixo da normalidade (< 0,5%). Nas talassemias alfa e beta menor é comum observar discreta reticulocitose (> 2,5% a 3,5%). Nas talassemias interativas (Tal. Beta/Hb S e Tal. Beta/Hb C) há evidente reticulocitose (> 3,5%). Nos casos por intoxicação de chumbo a contagem de reticulócitos pode estar normal, porém é mais frequente a sua diminuição¹.

Finalmente, o diagnóstico diferencial para anemia microcítica e hipocrômica em pessoas intoxicadas pelo chumbo se faz por meio da dosagem de chumbo sanguíneo. Para a anemia sideroblástica é comum os procedimentos da coloração dos eritrócitos e eritroblastos de esfregaços de sangue medular com o corante azul da Prússia².

REFERÊNCIAS

- 1. Brugnara, C.; Laufer, M.R.; Friedman, A.J.; Bridges, K. & Platt, O. Reticulocyte hemoglobin content: early indicator of iron deficiency and response to therapy. Blood. 83(10): 3100-3101, 1904.
- 2. Hoffbrand, A.V.; Petit, J.E. & Moss, P.A.H. Haematology, 4th edition. Oxford (UK), Blackwell Publish. 2002. 349p.
- 3. Naoum, F.A. Doenças que alteram os exames hematológicos. Editora Atheneu, São Paulo, 2010, 220p.
- 4. Naoum, P.C.; Alvarez, F.; Domingos, C.R.; Ferrari, F. & Castilho, E.M. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. Rev. Bras. Pat. Clin. 23(3): 68-79, 1987.
- 5. Naoum, P.C. & Domingos, C.R. Talassemia Alfa. Laes & Haes. 19(113): 70-98, 1998.
- Saad, S.T.O. Causas genéticas de deficiência de ferro. Rev. Bras. Hematol. Hemot. 32(2): 99-104, 2010.
- 7. Szarc, S.C. Políticas públicas para o controle da anemia ferropriva. Rev. Bras. Hematol. Hemot.. 32(2):2-7, 2010.
- 8. Vicari, P. & Figueiredo, M.S. Diagnóstico diferencial da deficiência de ferro. Rev. Bras. Hematol. Hemot. 32(2): 29-31, 2010.
- 9. Weiss, G. & Goodnough, L. T. Anemia of chronic disease. N. Eng. J. Med. 306(25): 1520-1520, 2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Paulo Cesar Naoum Academia de Ciência e Tecnologia Rua Bonfá Natale, 1860

São José do Rio Preto/SP CEP: 15020-130

E-mail: a.c.t@terra.com.br

^{** =} Concentração da Hb C maior que da Hb A