

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analysis

Volume 44 Número 2 Ano 2012

 SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Prezados Colegas

O exemplar da *Revista Brasileira de Análises Clínicas* – RBAC que agora você está recebendo é a consolidação de uma nova concepção de nossa Revista. Esta evolução só foi obtida a custo de muito planejamento, trabalho e substancialmente pela colaboração indispensável de novos articulistas, revisores e pelo trabalho incansável e competente de seu editor-chefe Prof. Paulo Murillo Neufeld.

A SBAC tem sido obstinada na recuperação de seus acervos e não tem medido esforços e numerários para que todos esses valores estejam prontamente ao alcance dos profissionais de Laboratório Clínico. Esta é a função primordial de nossa Sociedade.

Em muito breve o novo Site da SBAC estará no ar, e com ele uma das maiores e mais proveitosas realizações – trata-se da edição em português do *Trainee Council*, que é a maior e melhor coletânea de artigos, técnicas e *cases* de laboratório publicada originalmente em língua inglesa pela American Association For Clinical Chemistry – AACC.

Esta entidade congênere norte-americana convidou a SBAC para realizar a tradução e adaptação dos termos laboratoriais, disponíveis para todos os países de língua portuguesa. Todo este material estará disponível para consulta no site da SBAC e certamente será um auxílio prestimoso para todas as demandas que envolvam pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e rotinas laboratoriais.

O ensino à distância já está todo reformulado e diversas palestras estão disponíveis com acesso também disponíveis através do site.

Estamos às vésperas do mais inovador Congresso da área laboratorial até hoje planejado. O 40º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2013 iniciará em 16/06/2013 no Costão do Santinho em Florianópolis. Pela primeira vez em nosso país um Congresso da área laboratorial é realizado num resort, e, neste caso, o melhor do país, oferecendo aos nossos colegas a oportunidade de apreciar uma programação científica da mais alta expressão, muito lazer, uma programação social de primeiríssima qualidade e paralelamente à edição do 13º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, 4ª Jornada Latinoamericana de Genética Forense e do Núcleo de Gestão e Qualidade, que será uma separata do 40º CBAC com auditórios a parte, onde serão discutidos e analisados apenas temas voltados à gestão e qualidade laboratorial.

A Diretoria da SBAC está consciente de que ainda há muito por produzir e, por isto, extremamente motivada às ações de melhoria contínua, realizando todos os seus trabalhos voltada sempre ao engrandecimento da qualidade laboratorial.

Dêem-nos sempre a prazer e a alegria de estarem permanentemente conosco.

Irineu Grinberg

Presidente da SBAC

A importância dos revisores científicos

The importance of scientific reviewers

Criado no século XVII, o periódico científico se tornou a forma mais utilizada para a transmissão de conhecimento por ser um meio de fácil produção e distribuição. As publicações científicas são os veículos de comunicação utilizados pela sociedade para validar e disseminar a produção intelectual.⁽¹⁾ De acordo com Pereira,⁽²⁾ para ser aceito em periódico científico, um texto necessita estar em forma apropriada. Uma publicação adequada fará com que o resultado da investigação se torne disponível no sistema de comunicação científica, bem como alcance aqueles que promovem a aplicação prática do conhecimento. No entanto, ainda conforme o mesmo autor, a pesquisa não publicada ou indevidamente publicada significa contribuição nula para o acervo de conhecimentos.

Não há dúvidas quanto à conveniência da publicação do fato científico. Contudo, deve-se zelar para que apenas textos de bom nível científico e alinhados com a política editorial do periódico sejam publicados. O procedimento largamente empregado para o controle da qualidade de artigos científicos registrados nos periódicos é a chamada revisão por pares, revisão por especialistas, arbitragem por pares ou *peer review system*.⁽³⁾ Esse recurso tem sido utilizado desde o início do século XVIII e consiste em se submeter o trabalho científico ao escrutínio de um ou mais revisores de mesmo campo acadêmico que o autor.⁽⁴⁾ A sistemática utilizada fundamenta-se na avaliação de cada artigo enviado, verificando se há relevância científica, se está bem estruturado e se é original. No caso de um parecer favorável, e tendo sido atendidas às sugestões dos revisores, o artigo é aceito e encaminhado para a publicação.⁽²⁾ Esse procedimento dá credibilidade e valoriza o periódico que o utiliza e é delineado para recusar textos inadequados e melhorar a clareza e a precisão dos selecionados à publicação.^(2,3) Contudo, segundo Moraes Jr. et al.,⁽⁴⁾ apesar da revisão por pares ser considerada um dos pilares da ciência moderna, algumas fragilidades nesse processo estão associadas ao tempo de retenção do artigo na editoria da revista e ao viés dos revisores.

O complexo processo de comunicação científica apresenta uma dinâmica particular e é constituído por diferentes fases que englobam o planejamento, a administração e o impacto sobre a sociedade e a comunidade científica.⁽³⁾ Dentre todas as etapas, a revisão de artigos científicos, mencionada anteriormente, nos parece ser, como também corroborada por outros autores, a mais crítica.^(5,6) Segundo Muccioli et al.,⁽⁵⁾ os problemas editoriais têm início com a dificuldade de se atribuir revisores aos trabalhos científicos, pois essa escolha está intrinsecamente relacionada ao espírito crítico, à reputação e à competência científica de quem irá fazer a revisão. De fato, não se pode fugir à análise do desempenho histórico como autor, revisor e pesquisador daquele que será convidado a participar do processo, revisando artigos, sob pena de se produzir revisões deficientes, levando à perda de prestígio acadêmico do periódico.^(6,7)

Dada a importância dos revisores para o processo de publicação de trabalhos científicos, Evans et al.⁽⁸⁾ avaliaram quais características são desejáveis nesses pesquisadores para que revisões [por pares] de qualidade sejam oferecidas à editoria de periódicos. Revisores que produzem boas revisões são, normalmente, aqueles mais jovens, com menos de 40 anos, vinculados a instituições de maior prestígio acadêmico e cujo trabalho na área científica é bem conhecido dos editores. Além disso, produzem

melhores resultados, os revisores que não são informados sobre a autoria dos trabalhos submetidos à sua revisão, bem como sobre a afiliação dos autores.

Uma revisão rápida e de elevada qualidade é a principal meta do processo de publicação de artigos científicos. Para atender a tal objetivo, além da qualificação dos revisores, é importante se ter a perspectiva ética de todo o processo de revisão. O compromisso ético e a responsabilidade do revisor científico foram assim enumerados por Goldenberg⁽⁹⁾:

- Uma revisão crítica e justa é parte essencial do processo de publicação;
- Cada membro da comunidade científica tem a obrigação de assessorar os periódicos no processo de revisão por pares;
- Espera-se do revisor que ele faça uma avaliação científica e literária experiente, crítica e sem preconceitos de relatos científicos na sua área de conhecimento;
- O revisor deve retornar com os pareceres prontamente dentro do prazo concedido pelos editores;
- O revisor não deve avaliar o artigo se ele não se sentir competente para apreciar a pesquisa ou os itens levantados no artigo, se ele achar que pode existir conflito de interesse ou que um relacionamento pessoal com os autores possa prejudicar o julgamento do artigo e, ainda, se já tiver avaliado o artigo [em questão] para outro periódico;
- Nenhuma parte do artigo deve ser revelada a outra pessoa;
- Julgamentos desfavoráveis devem ser detalhados e apoiados em referências de literatura adequadas;
- O revisor deve identificar casos de citação inadequada [ou omitida] de trabalhos importantes de outros autores;
- A decisão de recomendar a publicação deve estar baseada em avaliação objetiva da qualidade científica e literária do artigo.

Muccioli et al.⁽⁶⁾ consideram, e nós reiteramos, que a revisão de artigos científicos é uma atividade acadêmica fundamental para o desenvolvimento e progresso da ciência. Ainda, conforme estes autores, uma revisão diligente e minuciosa é, virtualmente, tão importante quanto a própria autoria.

REFERÊNCIAS

1. Souza JV. Processo para avaliar periódicos científicos: proposta e ilustração para a Revista Contemporânea de Contabilidade; 2010. 331p. Dissertação (Mestrado em Contabilidade) - Programa de Pós-Graduação em Contabilidade, UFSC, Florianópolis, 2010.
2. Pereira MG. Artigos científicos: como redigir, publicar e avaliar. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. 389p.
3. Goldbaum MA. Revisão de artigos científicos. Editorial. Rev Saúde Pública. 1999;33(4):327-8.
4. Moraes HV Jr, Rocha EM, Chamon W. Operation and performance of the peer-review system. (Editorial). Arq Bras Oftamol. 2010;73(6):487-8.
5. Muccioli C, Campos M, Goldchmit M, Dantas PE, Bechara SJ, Costa VP. Review of scientific papers: entitlement for a few; benefit for everybody. (Editorial). Arq Bras Oftamol. 2006;69(1):5. [Article in Portuguese].
6. Muccioli C, Campos M, Goldchmit M, Dantas PE, Bechara SJ, Costa VP. How to reward and stimulate the task of reviewing scientific articles? (Editorial). Arq Bras Oftamol. 2007;70(1):5. [Article in Portuguese].
7. Bloom FE. The importance of reviewers. Editorial. Science. 1999;283(5403):789.
8. Evans AT, McNutt RA, Fletcher SW, Fletcher RH. The characteristics of peer reviewers who produce good-quality review. J Gen Intern Med. 1993;8(8):422-8.
9. Goldenberg S. Publicação do trabalho científico: compromisso ético. 2001;1-8. Disponível em <http://www.metodologia.org>. Acesso em: 09 maio 2013.

Paulo Murillo Neufeld, PhD

Editor-Chefe da RBAC

O diagnóstico sorológico pode detectar a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* mais rápido do que as culturas em crianças com fibrose cística? Um estudo de coorte prospectivo

Can serodiagnosis detect *Pseudomonas aeruginosa* colonisation faster than cultures in children with cystic fibrosis? A prospective follow-up study

Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza¹

Libera Maria Dalla Costa²

Carlos Antonio Riedi³

Adriane Ceschin Maestri⁴

Nelson Augusto do Rosario⁵

Resumo

A principal causa de óbito em pacientes com fibrose cística é a infecção pulmonar crônica causada por *Pseudomonas aeruginosa*, tornando a detecção e o tratamento precoces de crucial importância na prevenção do estabelecimento da infecção crônica. O objetivo do presente estudo foi determinar se anticorpos contra o lipopolissacarídeo de *Pseudomonas aeruginosa* em crianças poderiam ser detectados antes do isolamento da bactéria em culturas de secreções respiratórias. Quarenta e quatro crianças diagnosticadas com fibrose cística foram acompanhadas por três anos. Foram coletados swabs de faringe posterior para cultura e amostras de sangue para detecção de anticorpos IgG específicos contra um preparado padrão de antígeno polissacarídico de *Pseudomonas aeruginosa*. A incidência da colonização detectada pelas culturas aumentou diretamente com a idade. Houve uma relação inversa significativa entre as idades médias e a especificidade do IgG. A detecção da bactéria por cultura propendeu a ocorrer antes do aumento de IgG, e a sorologia somente foi capaz de discriminar pacientes positivos e negativos antes da cultura em crianças entre 2 e 4 anos de idade. Na prática clínica, as culturas de orofaringe continuam sendo a principal ferramenta para detectar a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* em crianças pequenas.

Palavras-chave

Fibrose cística; Anticorpos antibacterianos; *Pseudomonas aeruginosa*; Testes sorológicos; Lipopolissacarídeos

INTRODUÇÃO

De acordo com uma pesquisa completada 30 meses após a implementação de um programa de triagem neonatal para fibrose cística (FC), a doença é um dos distúrbios genéticos mais comuns entre descendentes de europeus no Brasil, com uma incidência de 1:9520 nascidos vivos no estado do Paraná.⁽¹⁾ A principal causa de declínio da função pulmonar e de mortalidade em pacientes com FC é a infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa*,⁽²⁾ o que torna a detecção da colonização e o tratamento precoce de grande importância para prevenir a infecção crônica.⁽³⁾ Uma vez estabelecido nas vias respiratórias, este agente oportunista é capaz de resistir ao ataque do sistema imune do hospedeiro e à exposição prolongada a antibióticos. O pulmão fibrocístico torna-se, então, um ambiente heterogêneo durante a infecção, levando à adaptação genética do

microrganismo, fenômeno evidenciado pela diversidade de morfotipos coloniais observados nas culturas de escarro dos pacientes FC.⁽⁴⁾ Um estudo recente demonstrou que a erradicação da bactéria das vias aéreas é possível com antibioticoterapia, e que os pacientes livres da infecção apresentavam melhora da função pulmonar.⁽⁵⁾

A presença de bactérias no trato respiratório inferior geralmente é detectada por cultura de escarro; no entanto, em crianças, como também em outros indivíduos incapazes de expectorar, a cultura de secreções da orofaringe é o método de escolha. Tal método é o único não invasivo para acessar a microbiota das vias respiratórias inferiores em crianças;⁽⁶⁾ a obtenção de lavado bronco-alveolar não é uma prática comum na avaliação da colonização por *P. aeruginosa* em pacientes com FC no Brasil. A infecção por *P. aeruginosa* também pode ser demonstrada pela detecção da resposta imune do paciente. Anticorpos contra *P. aeruginosa* podem

¹Doutora. Farmacêutica-Bioquímica da Seção de Bacteriologia, Unidade de Apoio Diagnóstico, Hospital de Clínicas – UFPR.

²Doutora. Farmacêutica-Bioquímica, Seção de Biologia Molecular, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, e Faculdades Pequeno Príncipe – Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.

³Professor Adjunto, Departamento de Pediatria, Universidade Federal do Paraná.

⁴Farmacêutica-Bioquímica, Seção de Bacteriologia, Unidade de Apoio Diagnóstico, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná.

⁵Doutor. Professor titular, Departamento de Pediatria, Universidade Federal do Paraná.

ser detectados meses antes da cultura se tornar positiva e, portanto, fornecem uma ferramenta útil para monitorar a infecção em pacientes colonizados, uma vez que os níveis de *P. aeruginosa* podem variar com a antibioticoterapia.⁽⁷⁾ Os antígenos mais utilizados para diagnóstico são fosfolipase C, protease alcalina, exotoxina A, elastase, suspensões de células totais ou lisados celulares preparados a partir de *P. aeruginosa*, ou, ainda, proteínas do sistema secretório tipo III da bactéria.⁽⁸⁻¹⁹⁾

Moléculas de lipopolissacarídes (LPS) da superfície celular são comuns a todas as bactérias gram-negativas. Consistem de uma porção carboidrato-lipídica, o "lipídio A", que prende a molécula do LPS à membrana externa da bactéria, e uma porção carboidrato, composta de um oligossacarídeo curto, o *core*, e uma cadeia lateral polissacarídica de alto peso molecular. Dentro de uma mesma espécie existe pouca variação nas estruturas do *core* e do lipídio A, mas a cadeia lateral polissacarídica é altamente variável. Tais estruturas variáveis são frequentemente denominadas "antígenos O", e sua variabilidade é utilizada em esquemas de tipagem imunológica para distinguir sorotipos dentro de uma espécie em particular.⁽²⁰⁾

Os LPS de cepas de *P. aeruginosa* tipáveis e poliaglutináveis isoladas de pacientes com FC foram comparados por métodos imunoquímicos. As cepas poliaglutináveis continham um LPS polissacarídeo-deficiente e as reações cruzadas poderiam ser mediadas por anticorpos de pacientes contra determinantes antigênicos comuns apresentados pelo *core* e pela porção lipídica do LPS. Foi demonstrado que LPS isolados de várias cepas de *P. aeruginosa* continham duas bandas distintas por filtração em gel e SDS-PAGE.⁽²¹⁾ A banda menor ("banda A") não reagia com anticorpos monoclonais contra o antígeno O, e a cadeia lateral polissacarídica era menor que a do antígeno O. A "banda B" correspondia à descrição clássica do LPS. Posteriormente foi postulado que a banda A estava presente concomitantemente à banda B nos cultivos,⁽²²⁾ mas que a expressão da banda B era cessada sob certas condições, como antibioticoterapia prolongada, deixando o LPS banda A como principal antígeno de superfície. Uma vez estabelecidas no pulmão fibrocístico, as colônias de *P. aeruginosa* tornam-se não tipáveis (não aglutináveis ou poliaglutináveis), implicando que os antígenos O não estariam mais presentes.⁽²³⁾ Entretanto, com o uso de anticorpos monoclonais, foi demonstrado que a expressão do LPS banda A é conservada em uma alta porcentagem de isolados clínicos de pacientes com FC.⁽²⁴⁾

Ensaios de *immunoblotting* revelaram que fluidos orais de pacientes FC adultos com culturas de escarro positivas para *P. aeruginosa* continham anticorpos fortemente reativos contra a banda A do LPS. Em contrapartida, dez amostras de voluntários saudáveis reagiram com bandas fracas. Fluidos orais de pacientes com discinesia ciliar primária também reagiram fracamente com anticorpos antibanda A, e anticorpos contra o *core* do LPS foram detectados em apenas uma amostra.

Por método de ELISA quantitativo, os fluidos orais de pacientes FC mostraram conter anticorpos antibanda A do LPS, contra nenhum dos voluntários saudáveis. Todas as amostras de soro obtidas dos pacientes FC foram positivas por ambos os métodos. Apesar da presença de anticorpos não ser necessariamente indicativa de infecção atual, a detecção de respostas iniciais e subsequentes aumentos nos títulos são de potencial valor clínico.⁽¹⁹⁾

O objetivo do presente estudo foi determinar se anticorpos dirigidos contra o lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa* em crianças podem ser detectados antes do isolamento da bactéria a partir de secreções respiratórias e, assim, prever a infecção das vias respiratórias.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo que incluiu 44 crianças (61,4% do sexo masculino e 38,6% do sexo feminino) diagnosticadas com FC logo após o nascimento e seguidas por três anos. A idade dos pacientes variou de 2 a 90 meses (média de 38,9 meses) durante o estudo (isto é, a menor idade apresentada na tomada da primeira amostra foi de 2 meses, e a maior idade na última amostra foi de 90 meses). O *status* da infecção, determinado pelo número e frequência de culturas positivas para *P. aeruginosa* no final do estudo foi classificado como: crônicos (5 pacientes), intermitentes (28 pacientes) e livres de *P. aeruginosa* (11 pacientes), de acordo com Lee et al.⁽²⁵⁾ Foram obtidas amostras de soro de 40 voluntários saudáveis (idade 2-13 anos) como controles negativos.

Testes microbiológicos

Uma média de cinco culturas de orofaringe foi coletada de cada paciente, por ano, com *swabs* após nebulização com solução de NaCl a 7%. Os *swabs* foram transportados em solução tampão de fosfato (PBS) com 0,1% de gelatina à temperatura ambiente. As suspensões de orofaringe homogeneizadas em Vórtex foram inoculadas com alça calibrada de 10 µl em quatro placas com diferentes meios de cultura: ágar chocolate suplementado com 20.000 unidades/L de bacitracina; ágar MacConkey; ágar manitol salgado e ágar seletivo para *Burkholderia cepacia*, para avaliação semiquantitativa do crescimento bacteriano. As colônias bacterianas oxidase positiva e lactose negativa isoladas em placas de ágar MacConkey foram quantificadas e identificadas por métodos rotineiros.⁽²⁶⁾ Apenas os isolados de *P. aeruginosa* e do complexo *B. cepacia* foram registrados.

Teste de ELISA

Amostras de sangue (seis amostras por paciente, na maioria) foram coletadas para testes sorológicos em intervalos de aproximadamente seis meses e armazenadas a -20°C. Todas as amostras de soro foram testadas em duplicata por ELISA para anticorpos IgG contra uma

preparação de antígeno LPS padrão, de acordo com Weisner et al.⁽¹⁹⁾ Sucintamente, o LPS preparado a partir da cepa de *P. aeruginosa* AK1401 com tampão carbonato de revestimento (*carbonate coating buffer*) foi adicionado aos poços de uma placa de capacidade média de ligação de fundo chato (Maxisorb®) e incubado *overnight* a 4°C. As amostras de soro, o controle positivo (STD) e o controle negativo (N) foram diluídos 1:200 em solução de bloqueio constituída de albumina de soro bovino (BSA) em PBS e adicionados a poços em duplicata. As placas foram incubadas por duas horas e em seguida lavadas três vezes em solução tampão de fosfato com Tween 20 (PBS-T). Anticorpo "secundário" anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina em coelho (Dako Cytomation®), diluído a 1/500 em BSA a 1% (p/v) em PBS, foi adicionado a cada poço. As placas foram então incubadas durante uma hora a 37°C e, após lavar os poços três vezes em PBS-T, fosfato de p-nitrofenol em tampão de substrato foi adicionado aos poços para detectar complexos antígeno-anticorpo, e as placas foram mantidas no escuro à temperatura ambiente. A densidade ótica foi quantificada a 405nm quando o STD atingiu $2,5 A_{405} \pm 10\%$. Se o N foi de $0,5 A_{405} \pm 10\%$ os resultados foram aceitos. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) foram calculados para as amostras duplicadas. O valor de CV máximo obtido foi 11,7%, enquanto que o valor de N foi 0,217.

Análise estatística

A avaliação da associação entre variáveis sorológicas quantitativas foi efetuada considerando-se o coeficiente de correlação de Spearman. Para a comparação dos três grupos definidos de acordo com o *status* de colonização em relação ao resultado da sorologia para *P. aeruginosa* foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para avaliar a associação do aumento dos títulos de IgG com a mudança de negativo para positivo em relação à cultura para *P. aeruginosa*, foi considerado o teste exato de Fisher. Curvas de características de operação do receptor (*Receiver Operating Characteristic* - ROC curves) foram ajustadas para cada idade mediana no momento em que foram obtidas as amostras de sangue para avaliar os valores de corte de IgG ideais como alternativa ao uso de um valor de corte único para todas as idades, como defendido por Hayes et al.⁽¹¹⁾

RESULTADOS

Os resultados das culturas para *P. aeruginosa* no momento em que foram coletadas as amostras de soro são mostrados na Tabela 1. Cinco pacientes foram classificados como cronicamente infectados e os outros como intermitentes. Este achado confirma a hipótese de que uma vez uma cepa de *P. aeruginosa* mucoide é adquirida a sua erradicação é muito difícil, mesmo quando o tratamento antibiótico agressivo é iniciado imediatamente após o isolamento da bactéria. A idade média dos pacientes no momento das seis coletas de amostras para testes sorológicos e microbiológicos foi correlacionada com a porcentagem de culturas positivas para *P. aeruginosa* (Tabela 1). Esta comparação demonstrou que a incidência de colonização por *P. aeruginosa* detectada pela cultura aumentou diretamente com a idade.

Tabela 1 - *P. aeruginosa* isolada nas culturas de amostras de orofaringe (nº de culturas e %)

Microorganismo	Amostra 1 (n=43)	Amostra 2 (n=44)	Amostra 3 (n=44)
PA ^b ou PAm ^c	10 (23,2)	7 (15,9)	11 (25,0)
PA somente	8 (18,6)	3 (6,8)	8 (18,2)
PA somente	8 (18,6)	3 (6,8)	8 (18,2)
PA or PAm associada a outros MO ^d	6 (14,0)	6 (13,6)	6 (13,6)
PA or PAm associada a outros MO ^d	6 (14,0)	6 (13,6)	6 (13,6)
PAm associada a outros MO	1 (2,3)	4 (9,1)	1 (2,3)

a = número de pacientes amostrados; b = *P. aeruginosa*; c = *P. aeruginosa* mucoide; d = microrganismos

A Tabela 2 mostra a mediana e os valores mínimo e máximo de anticorpos IgG contra *P. aeruginosa* correlacionados com a idade dos pacientes em cada visita. De um total de cinco pacientes crônicos, quatro eram anti-LPS de *P. aeruginosa* positivos em cinco das seis amostras de soro colhidas, e as últimas três amostras de um paciente foram todas positivas. No grupo intermitente, todas as seis amostras foram positivas para dois pacientes, e dois pacientes foram positivos a partir da segunda à última

Tabela 2 - Valores de IgG de amostras de soro obtidas em cada ocasião que as amostras de orofaringe e sangue foram coletadas simultaneamente

Visita	Idade em anos (mediana)	N de pacientes amostrados	IgG positivo (N)	IgG negativo (N)	Mediana (UA)	Variação (AU)
1 st	1,8	40	12	28	57,5	32,2 - 195,9
2 nd	2,3	41	8	33	75,9	38,9 - 221,0
3 rd	2,8	39	10	29	81,1	41,2 - 237,4
4 th	3,4	43	8	35	77,4	31,9 - 215,2
5 th	3,9	44	6	38	82,9	49,3 - 234,6
6 th	4,3	42	10	32	92,9	60,4 - 239,4

UA=Unidades arbitrárias; N= número de pacientes

amostra. As amostras dos 11 pacientes "livres de *P. aeruginosa*" foram uniformemente negativas. A correlação entre a idade média dos pacientes em cada visita (quando amostras de sangue e orofaringe foram coletadas simultaneamente) e a capacidade do ELISA para detectar colonização por *P. aeruginosa* antes da cultura foi determinada para o grupo intermitente de pacientes, uma vez que os números de indivíduos dos outros grupos eram insuficientes para uma análise estatística válida.

A sensibilidade e a especificidade dos títulos de anticorpos foram determinadas usando os resultados das culturas como padrão ouro de diagnóstico para cada visita, e correlacionadas com a idade correspondente dos pacientes, como mostrado na Figura 1. A especificidade dos títulos de

IgG diminuíram em função do aumento da idade. Nenhuma associação foi encontrada entre a sensibilidade dos títulos de anticorpos e a idade dos pacientes. A sensibilidade e a especificidade foram calculadas de acordo com os valores de corte indicados pela curva ROC para cada amostra de orofaringe e sangue coletada simultaneamente.

A Figura 2 mostra os resultados de ambos os ensaios em função do tempo. O evento de interesse foi a primeira vez em que foi detectada a presença de *P. aeruginosa*, e o tempo considerado foi a idade do paciente naquele momento. Casos negativos para detecção de *P. aeruginosa* durante todo o período de seguimento foram censurados. A Figura mostra que a positividade da sorologia e da cultura aumentou com a idade.

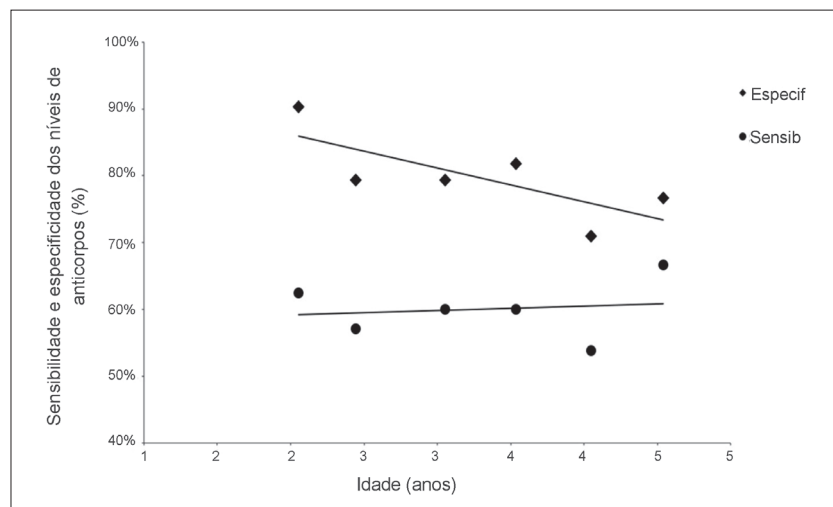


Figura 1. Correlação entre a média das idades dos pacientes e a capacidade do teste sorológico para detectar colonização por *Pseudomonas aeruginosa* antes da cultura em cada visita

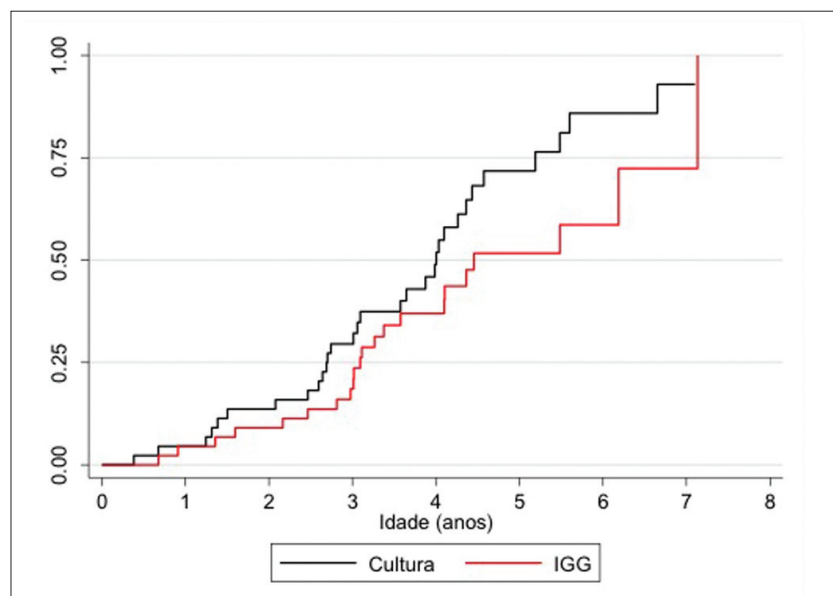


Figura 2. Distribuição temporal da detecção de *Pseudomonas aeruginosa* por cultura ou sorologia relacionada à idade dos pacientes.

Os valores de corte para detecção de anticorpos anti-LPS de *P. aeruginosa* (a melhor combinação entre sensibilidade e especificidade) foram definidos usando-se curvas ROC para as idades de cada paciente quando as amostras foram coletadas (≤ 2 , 2-4 e $>$ de 4 anos), considerando os resultados de cultura (positivos ou negativos) como padrão ouro. Os melhores pontos de cortes para valores de anticorpos foram definidos como o ponto na curva ROC mais próximo ao canto superior esquerdo. A Figura 3

mostra os gráficos correspondentes, bem como os valores de sensibilidade e especificidade para os pontos de corte sugeridos pelas curvas ROC. As áreas sob a curva e os valores de p foram calculados para avaliar a qualidade do ajuste da curva. A discriminação entre positivo e negativo para *P. aeruginosa* por ELISA foi encontrada somente nos pacientes de 2 a 4 anos de idade; ou seja, a detecção de *P. aeruginosa* pela cultura foi precedida por sorologia positiva somente neste grupo de pacientes.

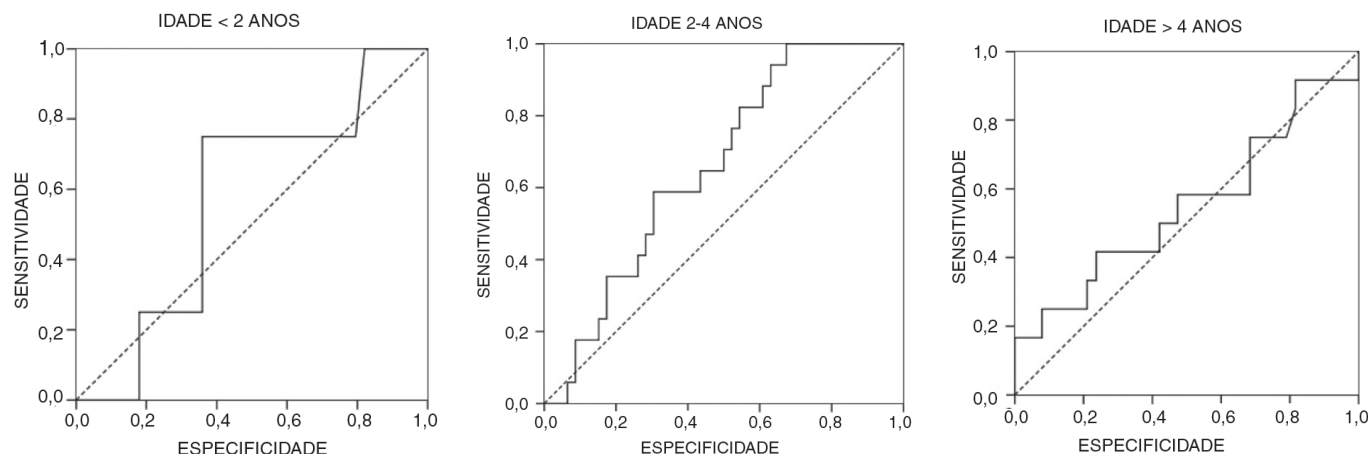


Figura 3. Curvas ROC para definição dos pontos de corte para a sorologia em três grupos etários diferentes, considerando a cultura como padrão-ouro

DISCUSSÃO

A detecção precoce da colonização por *P. aeruginosa* em crianças com FC é de grande importância para prevenir o estabelecimento de infecções potencialmente fatais. O advento de programas de triagem neonatal para FC tornou possível para crianças com esta doença tornarem-se sujeitos de estudos para determinar as estratégias de detecção dos primeiros sinais da presença de *P. aeruginosa*. A disponibilidade de métodos alternativos confiáveis, seguros e viáveis para detecção da infecção por *P. aeruginosa* na população cada vez mais jovem de pacientes com FC é altamente desejável. Alguns centros estão usando a detecção de anticorpos contra *P. aeruginosa* para esta finalidade, embora os resultados tenham gerado controvérsia sobre o valor diagnóstico da metodologia.⁽²⁷⁾

Analisando alguns estudos longitudinais semelhantes que utilizaram testes sorológicos para *P. aeruginosa* constatamos que os resultados são controversos.^(8,9,11-19) Os testes variaram amplamente quanto aos tipos de antígenos de *P. aeruginosa* utilizados, variando de lisados celulares totais até proteínas do sistema de secreção tipo III (PcrV) recombinantes. Farrell e Govan salientaram que, mesmo estudos utilizando os mesmos antígenos (os mais comuns foram protease alcalina, elastase e exotoxina A) chegaram a conclusões diferentes.⁽²⁷⁾ As populações estudadas também variaram muito, desde crianças diagnosticadas pela triagem

neonatal até a população total de pacientes acompanhados em um centro de FC, independentemente da idade, por isto os estudos não podem ser comparados em relação às faixas etárias dos pacientes.^(8,9,11-19) Escolhemos o LPS de *P. aeruginosa* como antígeno-alvo devido à dificuldade de importação de conjuntos comerciais que contêm mais de um tipo de antígeno. Além disso, o LPS foi isolado e purificado com relativa facilidade em nosso laboratório, e os resultados obtidos por Weisner et al. com este antígeno foram muito satisfatórios.⁽¹⁹⁾

Os dois estudos contrastantes discutidos por Farrell e Govan utilizaram o mesmo teste de ELISA comercialmente disponível, contendo três antígenos; no entanto foram usados pontos de corte diferentes para definir um título de anticorpos positivo.⁽²⁷⁾ Kappler et al. usaram o ponto de corte recomendado pelo fabricante e concluíram que um título de anticorpos aumentado indicava provável infecção por *P. aeruginosa*, apoiando a implementação do tratamento de erradicação de *P. aeruginosa* mesmo na ausência de cultura positiva.⁽¹³⁾ Por outro lado, Tramer-Stranders et al., utilizando curvas ROC para criar pontos de corte ajustados de acordo com a faixa etária, concluíram que os testes sorológicos são sensíveis para a identificação da infecção crônica por *P. aeruginosa*, mas não conseguem detectar colonização precoce em pacientes jovens com FC.⁽¹⁸⁾

Uma questão importante em relação a ensaios microbiológicos para estudar crianças com FC é a dificuldade na

obtenção de amostras clínicas ideais. No presente estudo utilizamos os resultados das culturas de orofaringe como o padrão-ouro para avaliar a sensibilidade dos testes sorológicos, comparando uma primeira amostra de cultura *P. aeruginosa*-positiva com o valor concomitante de anticorpos anti-*P. aeruginosa*. A cultura de orofaringe foi considerada o padrão-ouro porque o lavado brônquico não é uma prática comum no Brasil e não está disponível em todos os centros de tratamento de FC, uma vez que requer anestesia geral e perícia de um médico qualificado e pode representar risco para o paciente. A coleta de amostras de orofaringe é relativamente fácil de realizar em ambulatório e foi estabelecida em nosso serviço como um componente do exame de rotina de cada paciente.

A Figura 2 mostra que, à medida que os pacientes cresciam, os primeiros resultados positivos de sorologia e cultura eram obtidos. Estes resultados diferem da maioria dos estudos analisados, uma vez que os resultados positivos obtidos de culturas precediam os resultados positivos de sorologia em pacientes com até 2 anos de idade e em pacientes com mais de 4 anos. O gráfico mostra um ligeiro aumento na sensibilidade da sorologia na detecção da colonização por *P. aeruginosa* somente nos pacientes com idade entre 2 a 4 anos no momento em que a sua amostra de sangue foi coletada. Trumper-Stranders et al. investigaram 57 pacientes com idade entre 4 e 14 anos, e a sorologia realizada anualmente adicionou valor limitado na detecção precoce de colonização por *P. aeruginosa*, em comparação com culturas sucessivas.⁽¹⁸⁾ Os autores afirmaram que, com base em seus dados, o cultivo regular foi mais eficiente do que os testes sorológicos para detectar a colonização precoce em pacientes jovens com FC. Estudos longitudinais são necessários para investigar a hipótese de que os testes sorológicos são úteis para detectar o início da colonização por *P. aeruginosa*, especificamente em pacientes diagnosticados pela triagem neonatal antes do estabelecimento da infecção pulmonar por *P. aeruginosa*. Não fomos capazes de comprovar esta hipótese no presente estudo porque uma soroconversão significativa antes da positividade da cultura ocorreu apenas no grupo de 2 a 4 anos de idade. No entanto, aqui consideramos culturas de orofaringe como o padrão ouro e usamos apenas um tipo de antígeno para detectar anticorpos contra *P. aeruginosa*.

Podemos concluir que o elevado número de culturas realizadas explicou sua maior sensibilidade comparada com a da sorologia, uma vez que uma amostra de orofaringe foi coletada a cada dois meses contra uma amostra de sangue a cada seis meses para os testes sorológicos. Um estudo utilizando a reação em cadeia da polimerase para detectar *P. aeruginosa*, além de métodos sorológicos e cultura, demonstrou que quaisquer combinações que incluíam PCR revelavam diferenças estatísticas significativas em relação a outros métodos, mas não o PCR utilizado isoladamente.⁽²⁸⁾ O fato de que métodos diretos moleculares ou de cultivo têm maior sensibilidade para

detectar a presença de bactérias do que os métodos indiretos corrobora a conclusão deste estudo, indicando que o método utilizado não foi capaz de detectar infecção por *P. aeruginosa* antes da cultura. Em conclusão, o ELISA de LPS não fornece superioridade substancial (ou abreviação no tempo para o diagnóstico) sobre a sensibilidade das técnicas convencionais de cultura. Conseguimos verificar que testes microbiológicos frequentes são muito valiosos para a identificação da infecção por *P. aeruginosa* em pacientes com FC, e que este método é mais sensível do que o teste de ELISA com antígeno de LPS.

Na prática clínica, culturas de orofaringe continuam sendo a principal ferramenta para detectar a colonização por *P. aeruginosa* em crianças pequenas com FC. Devem ser direcionados esforços para coletar e processar amostras representativas, usando técnicas padronizadas adequadas para isolar os patógenos tão cedo quanto possível.

Summary

The main cause of death in cystic fibrosis patients is chronic pulmonary infection caused by Pseudomonas aeruginosa, which makes early detection of colonization and treatment of major importance to prevent the onset of chronic infection. The aim of the present study was to determine whether serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in children could be detected prior to the isolation of the bacteria from respiratory secretions' cultures. Forty-four children diagnosed with cystic fibrosis were followed for three years. Posterior oropharyngeal swabs were collected for culture and blood samples were taken for detection of IgG antibodies specific for a standard Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide antigen preparation. The incidence of colonization detected by culture increased directly with age. There was a significant inverse relationship between mean ages and IgG level's specificity. Detection of Pseudomonas aeruginosa by culture tended to occur before a rise in anti-Pseudomonas aeruginosa IgG, and serology was only able to discriminate between Pseudomonas aeruginosa - positive and negative patients prior to culture in children aged 2-4 years. In a clinical setting, oropharyngeal cultures remain the main tool to detect colonisation by Pseudomonas aeruginosa in young children.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa; Cystic Fibrosis; Antibodies, Bacterial; Serologic Tests; Antigens, Bacterial

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Sra. Abbie Weisner Bown pelo desenvolvimento da técnica para determinação de anticorpos IgG; ao Professor Tyrone Pitt pelo fornecimento do antígeno LPS e valiosa revisão do manuscrito; à Sra. Augusta Stofella pela eficiente coleta das amostras de orofaringe; ao Professor Renato Nishihara pelas valiosas sugestões e pelo fornecimento das amostras de controle negativas; aos funcionários da Seção de Bacteriologia, Hospital de Clínicas, Unidade de Apoio Diagnóstico, Universidade Federal do Paraná, pelo processamento das amostras; ao ambulatório de Fibrose Cística pela permissão para estudar seus pacientes; à United Medical Ltd. e à Associação Brasileira de

Apoio à Mucoviscidose (ABRAM) pelo apoio financeiro e à Newprov Produtos para Laboratórios Ltda., pelo fornecimento de reagentes para o processamento das amostras.

ÉTICA

Este estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e aprovado pelo seu Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (número do protocolo: 1104.143/2005-08, apêndices I e II). Foi obtido o consentimento esclarecido dos responsáveis pelos pacientes, bem como de todos os sujeitos que forneceram os soros-controle negativos. Os procedimentos seguidos estavam em conformidade com os padrões éticos do Comitê responsável pela experimentação humana e com a declaração de Helsinki original e suas revisões.

REFERÊNCIAS

- Santos GP, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosario NA. Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Parana: evaluation 30 months after implementation. *J Pediatr*. 2005 (Rio J);81(3):240-4. [Article in Portuguese]
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):194-222.
- Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* post pones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1997;23(5):330-5.
- Behrends V, Ryall B, Zlosnik JE, Speert DP, Bundy JG, Williams HD. Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environ Microbiol*. 2013; 15(2):398-408.
- Troxler RB, Hoover WC, Britton LJ, Gerwin AM, Rowe SM. Clearance of initial mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2012;47(11):1113-22.
- Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, Castile R, Grimwood K. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1999;28(5):321-8.
- Tramper-Stranders GA, Van Der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005;4 Suppl 2:37-43
- Brett MM, Ghoneim AT, Littlewood JM. Prediction and diagnosis of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a follow-up study. *J Clin Microbiol*. 1988;26(8):1565-70.
- Burns JL, Gibson RL, Mcnamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2001;183(3):444-52.
- Cruz AC, Neves BC, Higa LY, Folescu T, Marques EA, Milagres LG. Type III apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* as a tool to diagnose pulmonary infection in cystic fibrosis patients. *APMIS*. 2012;120(8):622-7.
- Hayes D Jr, Farrell PM, Li Z, West SE. *Pseudomonas aeruginosa* serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45(1):55-61.
- Hollings AE, Granstrom M, Vasil ML, Wretling B, Strandvik B. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1987; 25(10):1868-74.
- Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griesse M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*. 2006; 61(8):684-8.
- Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*. 2005; 293(5):581-8.
- Milagres LG, Castro TL, Garcia D, Cruz AC, Higa L, Folescu T. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(4):392-40.
- Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Hoiby N. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. *J Cyst Fibros*. 2006; 5(1):9-15.
- Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Doring G. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(3):249-55.
- Tramper-Stranders GA, Van Der Ent CK, Sliker MG, Terheggen-Lagro SW, Teding Van Berkhout F, Kimpen JL. Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. *Thorax*. 2006;61(8):689-93.
- Weisner AM, Chart H, Bush A, Davies JC, Pitt TL. Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in serum and oral fluid from patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol*. 2007;56 (Pt5):670-4.
- Arsenault TLH. Structural studies on the polysaccharide portion of "A-band" lipopolysaccharide from a mutant (AK1401) of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Can J Chem*. 1991;69: 1273-80.
- Fomsgaard A, Conrad RS, Galanos C, Shand GH, Hoiby N. Comparative immunochemistry of lipopolysaccharides from typable and polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1988;26(5):821-6.
- Rivera M, McGroarty EJ. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1989;171(4):2244-8.
- Hancock RE, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun*. 1983;42(1):170-7.
- Lam MY, McGroarty EJ, Kropinski AM, Macdonald LA, Pedersen SS, Hoiby N. Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol*. 1989;27(5):962-7.
- Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2003;2(1):29-34.
- Gilligan P. Respiratory Cultures from Cystic Fibrosis Patients. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2a ed. Washington DC, ASM Press; 2010, p. 3.11.3.1-3.11.3.9.
- Farrell PM, Govan JR. *Pseudomonas* serology: confusion, controversy, and challenges. *Thorax*. 2006;61(8):645-7.
- da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Chernishev AC, Garcia DO, Haug M. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(10):938-44.

Correspondência

Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza
Rua Padre Camargo, 280, 1º andar – Alto da Glória
80060-240 – Curitiba, PR, Brasil

Avaliação dos parâmetros hematológicos, oxigenação periférica e capacidade respiratória em fumantes

Assessment of hematological parameters, peripheral oxygenation and respiratory capacity in cigarette smokers

Luciana Rizzieri Figueiró¹

Denise Conceição Mesquita Dantas²

Maristela Ferigolo³

Helena Maria Tannhauser Barros⁴

Resumo

As substâncias encontradas no cigarro agem sobre vários órgãos e sistemas, constituindo um fator de risco para doenças vasculares. Frequentemente, a concentração de cotinina tem sido usada como marcador bioquímico de exposição ao tabaco. O objetivo desse estudo foi verificar a influência do hábito de fumar nos parâmetros hematológicos, oxigenação periférica, capacidade respiratória e concentração de cotinina urinária. Vinte não fumantes e vinte fumantes com dependência de nicotina classificada como acima de moderada foram comparados quanto aos parâmetros estudados. O volume globular, a concentração de hemoglobina corpuscular média e a contagem de monócitos foram maiores em fumantes ($p = 0,007$, $p = 0,04$ e $p = 0,028$, respectivamente) bem como a concentração de cotinina urinária ($p < 0,001$). O aumento no valor do volume globular e na concentração de cotinina urinária ocorreu de maneira dose-dependente. Os outros parâmetros não se mostraram diferentes entre os dois grupos. O hábito de fumar traz diversas consequências aos indivíduos, incluindo alterações nos parâmetros hematológicos que podem estar relacionados a complicações vasculares.

Palavras-chave

Tabagismo; Parâmetros hematológicos; Oxigenação; Capacidade respiratória; Cotinina urinária

INTRODUÇÃO

Historicamente, o uso do tabaco em suas diferentes formas se deu por diversos motivos, desde fins religiosos, culturais e medicinais inclusive para aceitação social.^(1,2,3) Atualmente existe conhecimento suficiente para desencorajar o uso do tabaco. Das mais de 4.700 substâncias tóxicas que os usuários dos produtos do tabaco são expostos continuamente, aproximadamente sessenta estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças graves.⁽⁴⁾ A mortalidade geral é duas vezes maior nos fumantes quando comparado aos não fumantes sendo o tabaco uma das principais causas evitáveis de mortes prematuras.⁽⁵⁾

As substâncias encontradas no cigarro agem sobre vários órgãos e sistemas, sendo a relação com doenças cardiovasculares objeto de estudo de pesquisas. Dentre os prejuízos produzidos pelo cigarro pode-se incluir disfunção endotelial, dano hematológico, inflamação e distúrbios metabólicos e bioquímicos.^(6,7,8) Alterações sanguíneas, particularmente nas propriedades do seu fluxo, têm um importante papel patológico,⁽⁹⁾ pois representam

determinantes de alto risco para doenças cardiovasculares em fumantes.⁽¹⁰⁾

Estudos relatam que fumantes apresentam alteração dos índices hematimétricos, tais como número de eritrócitos, volume globular, concentração de hemoglobina e contagem de leucócitos, quando comparados a não fumantes, no entanto, dependendo da população e de como o estudo foi conduzido, os resultados diferem entre si. Comumente reportado em estudos prévios é o aumento na concentração de carboxihemoglobina (COHb) em fumantes,^(9,11) que pode ser refletido em uma diminuição proporcional na quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo celular.^(6,12) Fumantes podem apresentar ainda um prejuízo da capacidade respiratória resultante tanto dos efeitos provocados pela nicotina quanto pelas substâncias irritativas da fumaça.⁽¹³⁾

Tanto a variabilidade de resultados encontrados quanto a presença de poucos estudos que comparem os parâmetros hematológicos em fumantes e não fumantes em nossa população torna essa proposta pertinente, uma vez que tais parâmetros constituem fatores de risco para doenças cardiovasculares. Além disso, a diferença na oxigenação

Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Farmacologia, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹Biomédica. Mestranda em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, RS, Brasil.

²Farmacêutica. Doutora em Fisiologia. Professora adjunta da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, RS, Brasil.

³Farmacêutica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, RS, Brasil. Doutora em Ciências Médicas

⁴Médica. Doutora em Psicofarmacologia. Professora titular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, RS, Brasil.

periférica e na capacidade respiratória merece ser melhor compreendida, uma vez que pode influenciar na qualidade de vida e representar importante disfunção em fumantes.

O objetivo desse estudo foi verificar as alterações nos parâmetros hematológicos, na saturação parcial periférica de oxigênio (psO_2) e na capacidade respiratória em fumantes residentes na cidade de Porto Alegre, RS no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O grupo de fumantes foi representado por indivíduos que fumavam regularmente e cuja dependência de nicotina foi classificada como média, elevada ou muito elevada pelo Teste de Fagerström para Dependência de Nicotina (TFDN),⁽¹⁴⁾ e o grupo de não fumantes por sujeitos que nunca fizeram uso do tabaco ou não o faziam há pelo menos dois anos, ambos residentes em Porto Alegre, RS e região metropolitana. Todos os participantes foram recrutados por meio de divulgação em jornal local e na comunidade acadêmica da universidade em que ocorreu o estudo e foram emparelhados por sexo, idade e profissões afins, tendo como número amostral vinte indivíduos para cada grupo. O tamanho da amostra foi baseado em estudo prévio.⁽⁹⁾ Os participantes do estudo deveriam ter idade superior a 25 anos, apresentar capacidade cognitiva para responder os questionários aplicados e não relatar patologia pulmonar grave, insuficiência hepática ou renal ou outra doença crônica.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, sob processo n° 219/07, e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os participantes.

Inicialmente, os participantes preencheram um questionário incluindo dados sociodemográficos. Para os fumantes, o questionário incluiu o TFDN para avaliação do grau de dependência.⁽¹⁴⁾ Este questionário é composto por seis questões referentes ao hábito de fumar, possibilitando a classificação da dependência de nicotina. O escore total é calculado pela soma obtida em cada item, oscilando entre 0 e 10 pontos. Foram incluídos no estudo fumantes cujo TFDN resultou em pontuação maior que 5 pontos. O teste tem uma aplicação simples e rápida, sendo um instrumento de baixo custo. Outra vantagem é possuir uma boa correlação com marcadores bioquímicos sensíveis e específicos de exposição ao tabaco.⁽¹⁵⁾

Posteriormente foi verificada a oxigenação periférica do indivíduo por meio do oxímetro de pulso Oxypleth (Dixtal, DX 2405), que permite monitorização não invasiva da psO_2 .⁽¹⁶⁾ Após, a capacidade respiratória foi avaliada por intermédio de um espirômetro de inox de Barness, sendo o indivíduo instruído a realizar inspiração máxima seguida de expiração máxima com oclusão das narinas (Volume Expiratório Forçado – VEF). O volume total expirado foi registrado em mililitros, e

o resultado expresso como porcentagem do valor normal previsto (%VEF), que varia conforme sexo e altura do indivíduo.

Sangue venoso e urina foram coletados após a realização desses testes. A amostra aleatória de urina foi utilizada para mensurar a concentração de cotinina, o principal metabólito da nicotina, por meio de ensaio colorimétrico, conforme técnica de Peach et al.,⁽¹⁷⁾ sendo corrigido pela concentração de creatinina. Após a coleta, a urina foi separada em dois frascos de polipropileno e armazenada a -20°C até o momento da análise. O sangue coletado, após a realização de extensão sanguínea, foi encaminhado ao Laboratório Central de Saúde Pública de Porto Alegre para realização de hemograma. O exame foi feito por meio do analisador hematológico automatizado Sysmex XT 1800i (Roche) e os parâmetros fornecidos e levados em consideração no estudo foram: número total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, valor do volume globular, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de anisocitose (RDW), número de plaquetas e número total de leucócitos. Por meio da extensão sanguínea foi realizada a leucometria específica relativa e cada subpopulação de leucócitos foi calculada a partir da contagem de 100 células.

As comparações entre os fumantes e não fumantes foram analisadas pelo teste t de Student ou pelo teste de Mann-Whitney quando apropriado. Na ocorrência de diferenças entre os dois grupos, foi feita regressão linear para verificar se a alteração apresentava variação dose-resposta com a intensidade da dependência de nicotina. As análises estatísticas foram executadas usando-se o *software* SigmaStat para Windows versão 3.5. A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Cada grupo foi constituído por 16 mulheres e 4 homens. Os participantes do estudo, em sua maioria, eram casados (40%), possuíam ensino superior (50%) e atividade remunerada (87,5%). A idade dos fumantes correspondeu a $45,2 \pm 6,8$ anos e dos não fumantes a $40,4 \pm 8,7$ anos ($p = 0,06$). Os fumantes tinham o hábito de fumar há aproximadamente 30 anos ($27,2 \pm 7,2$ anos).

Os resultados das comparações dos parâmetros hematológicos são apresentados na Tabela 1. As diferenças foram estatisticamente significativas apenas nos valores de volume globular, CHCM e contagem de monócitos.

Quanto à avaliação da oxigenação periférica, a psO_2 dos fumantes foi igual a 97,5% (97% a 98%) e a dos não fumantes igual a 98% (97,5% a 98%) não ocorrendo diferença significativa entre eles ($p = 0,069$). Também não houve diferença significativa na avaliação da capacidade respiratória entre fumantes e não fumantes (%VEF = $78,2 \pm 19,61$ (%) e $92,6 \pm 29,64$ (%), respectivamente; $p = 0,084$).

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros hematológicos entre fumantes e não fumantes

	Não fumantes (n=20)	Fumantes (n=20)	Valor p
Eritrócitos (milhões/ μ L)	4,7 (4,5 a 5,0)	4,8 (4,5 a 5,21)	0,49
Hemoglobina (g/dL)	13,9 + 0,85	14,4 + 0,84	0,069
Volume globular (%)*	42,8 + 2,49	45,1 + 2,53	0,007 $t_{38}=2,872$
VCM (fL)	90,7 + 3,81	93,5 + 5,48	0,068
HCM (pg)	29,5 + 1,42	30,0 + 1,66	0,304
CHCM (g/dL)*	32,6 (32,3 a 33,0)	31,9 (31,5 a 32,8)	0,04 $T=333,5$
Plaquetas (n° / μ L)	320300,0 + 67042,88	302916,3 + 103707,35	0,533
RDW (%)	12,8 + 0,66	13,1 + 0,60	0,149
Leucócitos (n° / μ L)	8302,0 + 1906,36	9336,2 + 2380,59	0,138
Neutrófilos (n° / μ L)	4923,9 + 1451,36	5319,0 + 1832,51	0,454
% Neutrófilos	59,0 + 7,50	56,6 + 9,18	0,368
Linfócitos (n° / μ L)	2823,5 (2355,5 a 3177,5)	3278,5 (2563,5 a 3794,5)	0,208
% Linfócitos	34,9 + 7,37	35,4 + 8,34	0,864
Monócitos (n° / μ L)*	287,5 + 44,62	442,4 + 51,29	0,028 $t_{38}=2,279$
% Monócitos	3,0 (2,0 a 4,5)	4,0 (3,0 a 7,5)	0,062
Eosinófilos (n° / μ L)	121,0 (94,5 a 204,5)	160,5 (84,5 a 335,0)	0,508
% Eosinófilos	1,4 (1,1 a 2,5)	2,0 (0,9 a 3,5)	0,903
Basófilos (n° / μ L)	29,0 (19,5 a 37,0)	31,5 (20,5 a 46,5)	0,588
% Basófilos	0,3 (0,3 a 0,4)	0,3 (0,2 a 0,5)	0,766

Os dados são apresentados como média $\pm$ dp (com exceção do número de monócitos em que é apresentado o erro padrão) ou mediana (percentil 25% a percentil 75). *indica diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$)

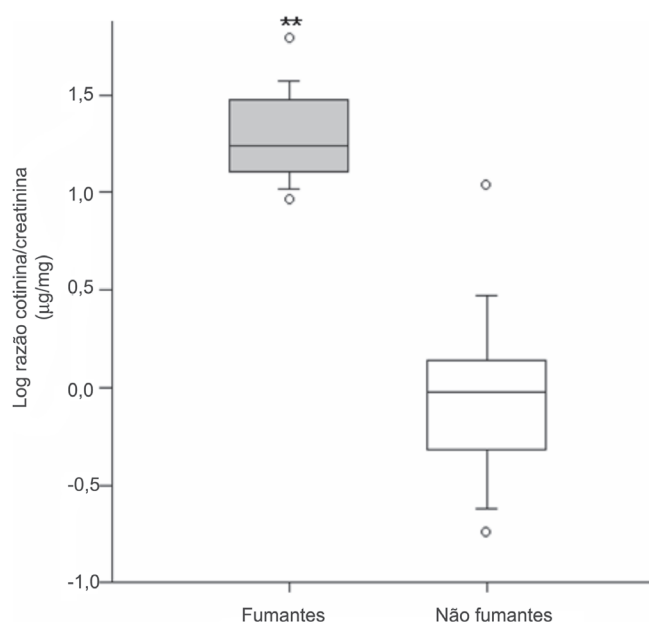


Figura 1. Comparação da concentração da cotinina urinária entre fumantes e não fumantes. $n = 40$. Os valores estão expressos como log da mediana e dos percentis 25% e 75%.

** $p < 0,001$.

A concentração de cotinina urinária em fumantes foi igual a 17,6 μ g/mg creatinina (12,7 a 29,7 μ g/mg creatinina) enquanto nos não fumantes correspondeu a 0,8 μ g/mL (0,3 a 1,2 μ g/mg creatinina) ocorrendo uma diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,001$) (Figura 1).

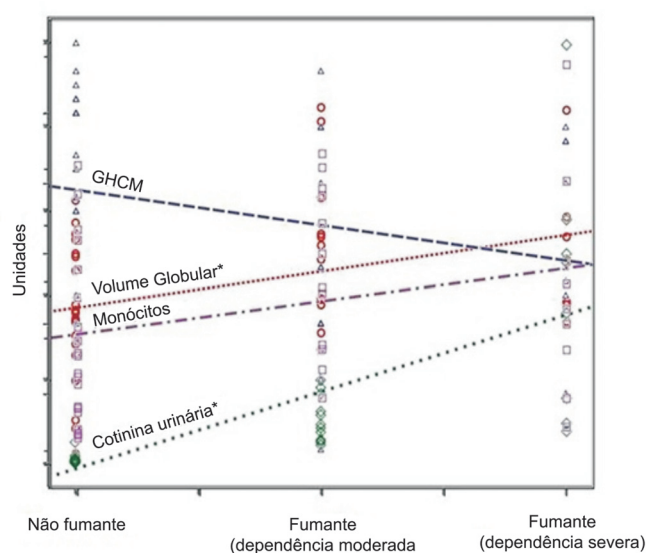


Figura 2. Regressão linear da CHCM, volume globular, número de monócitos e concentração de cotinina urinária. [Não fumante ($n = 20$), Fumante com grau moderado de dependência de nicotina ($n = 12$), Fumante com grau elevado ou muito elevado de dependência de nicotina ($n = 8$)].

* $p < 0,05$

Analisando os dados que resultaram em diferença significativa, verifica-se que o valor aumentado do volume globular e da concentração de cotinina urinária ocorreu de maneira dose-dependente com a intensidade de dependência de nicotina ($p = 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 2).

Essa relação não ocorreu com os outros parâmetros que apresentaram diferença significativa entre os dois grupos.

DISCUSSÃO

Comparando-se fumantes com não fumantes, pode-se perceber que os primeiros apresentaram valor diminuído da CHCM e valores aumentados do volume globular e do número total de monócitos. O valor aumentado do volume globular encontrado em nosso estudo corrobora outros estudos que fazem tal comparação.^(9,18-21) Sua determinação é importante, pois indica possíveis alterações nas hemácias e no plasma. Essas alterações são provocadas pelo monóxido de carbono (CO), que, ligado à hemoglobina, diminui proporcionalmente a quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo celular, podendo ocorrer hipóxia tecidual. Para compensar esse quadro, o fumante crônico pode apresentar um número maior de células sanguíneas vermelhas (não verificado em nosso estudo).⁽⁶⁾ O CO, juntamente com mudanças na circulação de catecolaminas induzidas pelo cigarro, também é responsável pela diminuição do volume plasmático.

O aumento do número de hemácias associado à diminuição do volume plasmático é o responsável pelo aumento do volume globular, o que tem sido reportado como policitemia do fumante.^(9,11,22) Esse aumento do volume globular nos indivíduos do estudo ocorreu de maneira dose-dependente em relação à intensidade da dependência de nicotina, demonstrando que fatores relacionados à saúde do indivíduo podem ser afetados negativamente pelo grau de dependência do fumante.

O valor diminuído do CHCM em fumantes se deve ao valor aumentado do volume globular, uma vez que representa o valor de hemoglobina contida em determinado volume de sangue. Outra maneira de explicar essa diminuição da CHCM dos fumantes em relação aos não fumantes é a influência que o VCM tem na determinação desse valor, já que a CHCM pode ser representada pela razão entre a HCM (concentração de hemoglobina em cada hemácia) e o VCM (volume corpuscular médio, ou seja, o volume médio de cada hemácia).⁽²³⁾ Quanto maior o valor do volume globular, maior será o VCM e menor será a CHCM. O VCM aumentado em fumantes é reportado em algumas pesquisas,^(19,24) mas, no nosso estudo, apenas mostrou-se como uma tendência, não havendo diferença significativa entre os dois grupos, mas pôde-se verificar sua influência ao se perceber o valor diminuído da CHCM nos fumantes.

Mesmo em boas condições de saúde, algumas situações podem ocasionar redistribuição dos leucócitos, como presença de substâncias irritativas ou até mesmo estresse físico ou emocional. O número maior de monócitos em fumantes é explicado por representarem células de defesas ainda não ativadas, que, ao se fixarem aos tecidos, diferen-

ciam-se em macrófagos, capazes de fagocitar partículas prejudiciais às células.⁽²⁵⁾

Outra alteração hematológica comumente reportada é a contagem total de leucócitos aumentada em fumantes.^(18,19,21,24,26-28) No entanto, apesar de a contagem total de leucócitos ser reconhecida como um marcador de dano tecidual provocado pelo tabaco,⁽²⁹⁾ não foi encontrada diferença entre os dois grupos analisados em nosso trabalho.

O fumante, ao inalar a fumaça, entrega a seu organismo CO que aumenta a quantidade de COHb no sangue. Um aumento na concentração de COHb diminui a oxigenação periférica, que no nosso estudo foi verificada por meio da psO_2 mensurada pelo oxímetro de pulso. Todavia, o teste utilizado em nosso estudo demonstrou somente uma tendência de diferença entre fumantes e não fumantes, apesar de estudos anteriores relatarem diferença na concentração de COHb entre os dois grupos.^(9,11) Uma explicação pode ser o fato de que o grupo de fumantes fosse constituído por indivíduos que não possuíam um grave acometimento da oxigenação periférica, apesar de já fumarem há longo tempo.

Apesar da conhecida relação entre o hábito de fumar e as doenças respiratórias e pulmonares,^(30,31) nossos resultados demonstraram apenas uma tendência de diferença entre fumantes e não fumantes na porcentagem do volume expiratório forçado esperado. Isso pode ser devido ao limite do teste utilizado.

A mensuração da concentração de cotinina tem sido usada para avaliar a exposição ao tabaco, podendo relacioná-la à dependência de nicotina.^(32,19) Outra aplicação dessa medida é verificar a eficácia dos métodos de intervenção para a cessação do hábito de fumar,⁽³³⁾ sendo mais fidedigno que o autorrelato do indivíduo. Em nosso estudo, a concentração de cotinina urinária apresentou-se mais de vinte vezes maior em fumantes em relação a não fumantes. Quanto maior a dependência nicotínica, verificada pela pontuação do teste de Fagerström para dependência de nicotina, maior a concentração de cotinina urinária, confirmando que essa dosagem é um importante indicador de exposição ao tabaco.

O estudo apresenta limitações que podem interferir na análise dos resultados. A coleta de urina não supervisionada e em horários distintos entre os participantes pode influenciar o resultado pela possibilidade de diluição da urina e pela diferença na concentração da substância analisada, respectivamente. O número amostral utilizado foi considerado para encontrar diferença entre os parâmetros hematológicos e o valor p próximo ao nível de significância na comparação da oxigenação periférica e no volume expiratório forçado entre fumantes e não fumantes, e sugere um aumento no número de indivíduos para verificar se existe diferença nessas variáveis.

O tabagismo é uma doença crônica que provoca diversas consequências aos seus usuários. Nesse sentido,

nosso estudo com fumantes de uma população específica concorda com o conhecimento científico atual ao indicar diferenças em alguns parâmetros hematológicos entre fumantes e não fumantes. Apesar da avaliação da oxigenação periférica e da capacidade respiratória não se apresentarem diferentes entre fumantes e não fumantes, poderia ser interessante avaliar se a cessação do hábito de fumar resulta em alterações nesses testes, sugerindo-se a realização de estudos complementares.

Abstract

The substances present in the cigarette act on several organs and systems, constituting a risk factor for vascular diseases. Frequently the cotinine concentration has been used as a biochemical marker of exposition to the tobacco. The aim of this study was to verify the smoking habit influence in the hematological parameters, peripheral oxygenation, respiratory capacity and urinary cotinine concentration. Twenty nonsmokers and twenty cigarette smokers with moderate or severe nicotine dependence were compared according to the studied parameters. The hematocrit, mean corpuscular hemoglobin concentration and monocytes were increased in cigarette smokers ($p = 0.007$, $p = 0.04$ and $p = 0.028$, respectively) such as the urinary cotinine concentration ($p < 0.001$). The increase in the hematocrit and in the urinary cotinine concentration occurred on a manner dose-dependent. The other parameters didn't show differences between two groups. The smoking has several consequences for individuals including hematological parameters that may be related to vascular complications.

Keywords

Smoking; Hematological parameters; Peripheral oxygenation; Respiratory capacity; Urinary cotinine

AGRADECIMENTOS

Profª Liane Nanci Rotta, Profª Ana Beatriz Gorini da Veiga, equipe do Laboratório Central de Saúde Pública de Porto Alegre, Serviço Nacional de Orientações e Informações sobre a Prevenção do Uso de Drogas (VIVAVOZ), Associação Mário Tannhauser de Ensino, Pesquisa e Assistência (AMTEPA) e Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD).

REFERÊNCIAS

- Guerra MP. A abstenção tabágica: reflexões sobre a recaída. *Análise Psicológica*. 2004;22(3):507-18.
- Musk AW, De Klerk NH. History of tobacco and health. *Respirology*. 2003;8(3):286-90.
- Routh HB, Bhowmik KR, Parish JL, Parish LC. Historical aspects of tobacco use and smoking - two surgeons general. *Clin Dermatol*. 1998;16(5):539-44.
- Cavalcante TM. O Programa de Controle do Tabagismo no Brasil: avanços e desafios. *Rev Psiquiatr Clín*. 2005;32(5):283-300.
- Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ, Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. 2002;360(9343):1347-60.
- Benowitz N. Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003;46(1):91-111.
- Furtado RD. Implicações Anestésicas do Tabagismo. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52(3):354-67.
- Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007;131(5):1557-66.
- Galea G, Davidson RJ. Haematological and haemorheological changes associated with cigarette smoking. *J Clin Pathol*. 1985;38(9):978-84.
- Bain BJ, Rothwell M, Feher MD, Robinson R, Brown J, Sever PS. Acute changes in haematological parameters on cessation of smoking. *J R Soc Med*. 1992;85(2):80-2.
- Silva VBM, Pereira ME. Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de sangue de doadores fumantes. *RBAC*. 2005;37(2):95-9.
- Malcon MC, Menezes AM, Chatkin M. Prevalence and risk factors for smoking among adolescents. *Rev Saude Publica*. 2003;37(1):1-7. [Article in Portuguese].
- Rodrigo C. The effects of cigarette smoking on anesthesia. *Anesth Prog*. 2000 Winter;47(4):143-50.
- Fagerström KO. Measuring degree of physical dependence to tobacco smoking with reference to individualization of treatment. *Addict Behav*. 1978;3(3-4):235-41.
- Halty LS, Hüttner MD, Netto ICO, Santos VA, Martins G. Analysis of the use of the Fagerström Tolerance Questionnaire as an instrument to measure nicotine dependence. *J Pneumol*. 2002;28(4):180-6.
- Nunes WA, Terzi RGG. Oximetria de pulso na avaliação do transporte de oxigênio em pacientes críticos. *Rev Lat Am Enfermagem*. 1999;2:79-85.
- Peach H, Ellard GA, Jenner PJ, Morris RW. A simple, inexpensive urine test of smoking. *Thorax*. 1985;40(5):351-7.
- Kurata C. Medical check-up findings characteristics of smokers: aimed at improving smoking cessation interventions by physicians. *Intern Med*. 2006;45(18):1027-32.
- Pérez-Stable EJ, Benowitz NL, Marin G. Is serum cotinine a better measure of cigarette smoking than self-report? *Prev Med*. 1995;24(2):171-9.
- Spada C, Treitinger A, Souza MA. Prevalência tabagismo em doadores de sangue da região serrana de Santa Catarina - Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(1):19-23.
- Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. Associations between cigarette smoking, pipe / cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2005;26(17):1765-73.
- Smith JR, Landaw SA. Smoker's polycythemia. *N Engl J Med*. 1978;298(1):6-10.
- Lorenzi TF. Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 710p.
- Van Tiel E, Peeters PH, Smit HA, Nagelkerke NJ, Van Loon AJ, Grobbee DE, et al. Quitting smoking may restore hematological characteristics within five years. *Ann Epidemiol*. 2002;12(6):378-88.
- Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(5 Pt 2):S29-32.
- Al-Awadhi AM, AlFadhli SM, Mustafa NY, Sharma PN. Effects of cigarette smoking on hematological parameters and von Willebrand factor functional activity levels in asymptomatic male and female Arab smokers. *Med Princ Pract*. 2008;17(2):149-53.
- Suriyaprom K, Harnroongroj T, Namjuntra P, Chantaranipapong Y, Tungtrongchitr R. Effects of tobacco smoking on alpha-2-macroglobulin and some biochemical parameters in Thai males. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007;38(5):918-26.
- Tungtrongchitr R, Pongpaew P, Soonthornruengyot M, Viroonudomphol D, Vudhivai N, Tungtrongchitr A, et al. Relationship of tobacco smoking with serum vitamin B12, folic

- acid and haematological indices in healthy adults. *Public Health Nutr.* 2003;6(7):675-81.
29. Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW. Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(10):1945-56.
30. Torres BS, Godoy I. Doenças tabaco-relacionadas. In Viegas, CAA. Diretrizes para a Cessação do Tabagismo. *J Bras Pneumol.* 2004;30(Supl. 2):S19-S29.
31. Van Schayck CP, Loozen JM, Wagena E, Akkermans RP, Wesseling GJ. Detecting patients at a high risk of developing chronic obstructive pulmonary disease in general practice: cross sectional case finding study. *BMJ.* 2002;324(7350):1370.
32. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35(1):155-68.
33. Behera D, Uppal R, Majumdar S. Urinary levels of nicotine & cotinine in tobacco users. *Indian J Med Res.* 2003;118:129-3.

Correspondência

Luciana Rizzieri Figueiró
Rua Sarmiento Leite n° 245 sala 316
90050-170 – Porto Alegre, RS
Email: rizzieri@ufcspa.edu.br

Identificação molecular de *Leishmania* pela PCR em amostras do município de Ilhéus, Zona da Mata da Bahia, Brasil

Molecular identification of *Leishmania* by the PCR on samples from the municipality of Ilheus, Zona da Mata of Bahia, Brazil

Sílvia Maria Santos Carvalho¹

Maria Edileuza Felinto Brito²

Eduardo Henrique Gomes Rodrigues²

Maria Sandra Andrade²

Sinval Pinto Brandão-Filho²

Resumo

A leishmaniose tegumentar é uma doença endêmica que apresenta distribuição em todo o Brasil. Na Bahia, verifica-se a ocorrência em todas as mesorregiões, com maior incidência dos casos nos municípios localizados na região correspondente à área de Mata Atlântica, entre os quais o município de Ilhéus. Esse estudo teve como objetivo identificar *Leishmania* spp circulante na região. Foram coletadas 84 amostras de aspirado de borda de lesão de pacientes suspeitos de leishmaniose tegumentar, e inoculados em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Os animais foram observados durante três meses e, após este período, foram eutanasiados e fragmentos de baço foram coletados para a visualização de amastigotas, para o isolamento em cultura, extração de DNA e caracterização por reação em cadeia da polimerase (PCR). Duas amostras foram positivas para o alvo de 750 pb, que corresponde ao minicírculo do kDNA, específico para o subgênero *Viannia*. Esses resultados e o fato de a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* ser a espécie mais prevalente em área de Mata Atlântica indicam que a doença está associada a essa espécie do parasito no município de Ilhéus.

Palavras-chave

Leishmaniose tegumentar; *Leishmania* (*Viannia*) spp; *Leishmania braziliensis*; PCR

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) compreende um espectro de doenças distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, apresentando-se por diversas manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas e difusas até lesões mucocutâneas que acometem a mucosa do sistema orofaríngeo. A doença é considerada um problema de saúde pública importante, uma vez que está distribuída em todos os estados do País.⁽¹⁾

Nas Américas, a transmissão ocorre através da picada de fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*), que inoculam a forma infectante no hospedeiro no ato da hematofagia. No Brasil são seis as espécies de *Leishmania* que causam a doença no homem, entre estas a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, que tem ampla distribuição em todas as regiões do País. A doença acomete todas as faixas etárias, independente de gênero ou idade.⁽²⁾

No Brasil, a trajetória epidemiológica da LTA evidencia que os surtos epidêmicos da doença estão relacionados principalmente à ocupação de áreas para atividades

agrícolas. As estatísticas oficiais têm registrado, anualmente, cerca de 35 mil casos novos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 18,5 casos/100 mil habitantes.⁽¹⁾ Segundo informações do portal eletrônico do Ministério da Saúde, a região Norte concentra o maior número de casos, seguida pela região Nordeste, que, no ano de 2008, notificou 29,65% dos casos do País, com elevada distribuição nos estados do Maranhão, Bahia e Ceará. Na Bahia, em particular, foram registrados 49,35% do total notificado no mesmo período, mostrando a sua importância como região endêmica. Nesse estado, a doença é conhecida desde o início do século XIX, período correspondente à expansão da cultura de cacau na região sul do estado.⁽³⁾ De acordo com os registros da Secretaria Municipal de Saúde de Ilhéus, o município é endêmico para a doença, registrando casos humanos em áreas urbana e rural. O coeficiente de detecção para cada 100 mil habitantes, entre os anos 2000 e 2006, oscilou consideravelmente, registrando uma média de 31,67 casos/100 mil habitantes.

Devido ao fato de a LTA representar um complexo de formas da doença, o seu diagnóstico se torna também mais complexo. Rotineiramente, o diagnóstico é realizado basicamente a partir de exame clínico e exame microscópico

¹Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC – Ilhéus, BA, Brasil.

²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Unidade Fiocruz – Recife, PE, Brasil.

para pesquisa do parasito em lesões típicas da doença. No entanto, estes exames apresentam limitações devido à semelhança das lesões com outras doenças de pele e pelos métodos de diagnóstico convencionais apresentarem baixa sensibilidade.

O objetivo desse estudo foi utilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmar os casos clínicos notificados, através da detecção do DNA de *Leishmania* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Cento e trinta e um pacientes que procuraram o Centro de Atendimento Especializado III (CAE III) em Ilhéus, BA, com lesões sugestivas de LTA, concordaram em participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os menores de idade tiveram a permissão do responsável. Esse estudo foi desenvolvido seguindo as normas que regulamentam pesquisas com seres humanos, aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães, Unidade Fiocruz-PE, conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde/MS. Por fazer parte do programa nº P.0174-03 e estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), teve a permissão da Comissão de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA - Fiocruz).

Do total de indivíduos dispostos a participar desse estudo, foi possível realizar a punção aspirativa em 84 deles. Estas amostras foram inoculadas em hamsters, que foram observados durante três meses. Após este período, foram eutanasiados e coletados fragmentos de baços. Parte deste material foi adicionado ao meio de cultura NNN modificado e as culturas foram examinadas em intervalos de cinco dias durante um mês, para o possível isolamento. A outra parte foi acondicionada a -70°C até a utilização em PCR.

As extrações e purificações do DNA genômico foram realizadas através do kit *GenomicPrep Cells and Tissue DNA isolation Kit* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante, estocados em 100 µL do *Elution buffer* a -20°C para utilização no teste de PCR. Dois microlitros da solução desse DNA foram utilizados na reação de PCR.

Para o alvo de detecção molecular foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia* (5'-GGGGTTGGTGTAAATAGTGG-3') e (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'), correspondentes à região do minicírculo do kDNA.⁽⁴⁾ A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, gelatina 0,1mg/ml, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 0,2 mM, 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 2,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf, modelo Mastercycler gradient e consistiu de 35 ciclos: 94°C (um min), 65°C (um min) e 72°C (um min), precedidos de uma desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos. Foram utilizados controles negativos (amostras sem DNA) e controles positivos (10 e 1 ng de DNA

genômico de *L. braziliensis*) para análise de resultados falso-positivos relacionados à contaminação e variações na sensibilidade, respectivamente.

Os produtos de PCR (10 µL) foram separados por eletroforese a 1% e corados com brometo de etídio; e as bandas correspondentes, visualizadas em luz ultravioleta,⁽⁵⁾ e reveladas em sistema digital. A reação de PCR, utilizando como alvo o subgênero *Viannia*, amplifica um fragmento de 750 pb, que corresponde a todo o minicírculo.

Para utilização do controle positivo em gel de agarose foi realizado teste de diluição. Foi considerado o limite mínimo de detecção a maior diluição que ainda resultava em uma banda de DNA visível no gel de agarose. O limiar de detecção de DNA determinado por PCR específica para *L. (Viannia) braziliensis* foi de 1 pg.

RESULTADOS

A extração de DNA genômico a partir de 84 amostras de baço de hamsters revelou uma média de 5,74 µg desse ácido nucleico, numa escala que variou de 0,1 a 22 µg, e nível de pureza médio de 2,2.

Duas amostras colhidas das vísceras dos hamsters, provenientes de punção aspirativa de borda da lesão de pacientes oriundos da área rural, apresentaram positividade através da técnica do PCR para o subgênero *Viannia* (Figura 1).

Foi possível observar formas amastigotas presentes em três das 84 amostras de animais inoculados com material humano, através de esfregaço: dois residentes da

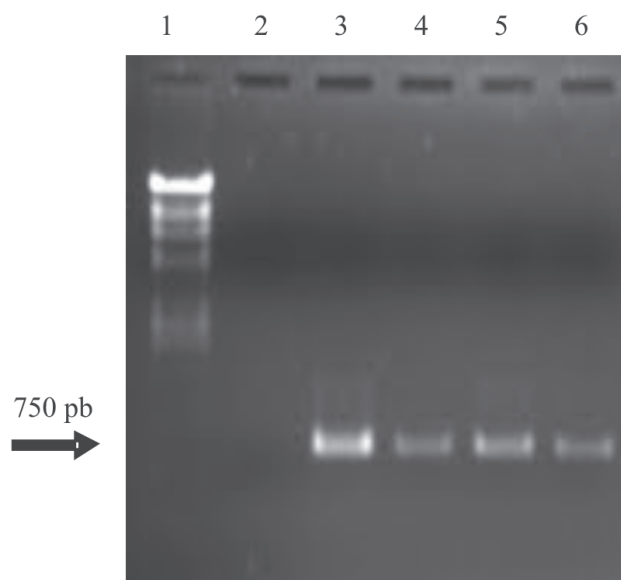


Figura 1. Eletroforese em gel de Agarose a 1% corada com brometo de etídio, revelando os produtos de amplificação via PCR, na pesquisa de parasitas pertencentes ao subgênero *Viannia*: 1. Marcador de peso molecular λ + Hind III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0; 0,56 kb); 2. Controle negativo; 3. Controle positivo forte; 4. Controle positivo fraco; 5 e 6. Amostras positivas para parasitos do subgênero *Viannia*.

área rural e um da área urbana, mas com passagem pela área rural do município. No entanto, todas as amostras inoculadas em meio de cultura foram negativas para a tentativa de isolamento do parasito.

DISCUSSÃO

As dificuldades para o diagnóstico parasitológico da leishmaniose tegumentar são notórias, particularmente para a forma da doença associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Este grau de dificuldade demanda a necessidade da utilização de métodos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico preciso e acurado da LTA.

O diagnóstico parasitológico direto por microscopia apresenta uma sensibilidade de 50%-70% e depende do número de amastigotas na lâmina. A limitação dessa técnica está na incapacidade de determinar a espécie do parasito.⁽⁶⁾ Já o isolamento de promastigotas em cultura é altamente específico, mas apresenta baixa sensibilidade pela constante contaminação e a variação dos meios de culturas. A grande vantagem deste é que o isolamento do parasito permite a confirmação e posterior identificação da espécie através da caracterização de *Leishmania* isolada através dos métodos clássicos com anticorpos monoclonais e isoenzimas.

Outro teste sensível e específico no diagnóstico imunológico é realizado através da Intradermoreação de Montenegro (IDRM), também conhecido como teste de hipersensibilidade tardia, que apresenta alta sensibilidade e especificidade (>90%), bastante utilizado em inquéritos epidemiológicos. Os métodos sorológicos de detecção de anticorpos circulantes como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o teste Imunoenzimático (ELISA) e Western blot são sensíveis, mas reagem cruzadamente com os tripanosomatídeos e não permitem distinguir a fase evolutiva da enfermidade.⁽⁷⁾

As metodologias diagnósticas utilizadas na confirmação da infecção por parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* são bastante variáveis. Contudo, diante das limitações apresentadas pelos métodos diagnósticos convencionais, foi necessário utilizar ferramentas capazes de promover um diagnóstico acurado. Nos últimos anos os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em diversas amostras clínicas, isolados de cultura, bem como *pools* de flebotomíneos, havendo destaque para a tecnologia da PCR.⁽⁸⁾ A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, podendo detectar um número baixo de parasitas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens da PCR em relação aos métodos diagnósticos tradicionais. Entretanto, sua limitação na utilização da rotina de laboratórios clínicos está basicamente baseada no alto custo que ainda representa.⁽⁹⁾

No presente estudo, duas amostras de baço de hamsters foram positivas através da técnica de PCR específico para o subgênero *Viannia*, dentre as 84 de material colhido de punções aspirativas de lesões de pacientes – ambas da área rural. Andrade et al.⁽¹⁰⁾ desenvolveram estudos através da utilização de amostras de fragmentos de biópsias de lesões de pacientes com LTA na Bahia e obtiveram 100% de positividade quando aplicaram a metodologia de PCR dirigida à *Leishmania (V.) braziliensis*; no entanto, o material biológico utilizado para a pesquisa foi biópsia de pele do paciente. A eficiência da PCR também pôde ser constatada através da análise de amostras de cicatrizes de pacientes curados clinicamente após tratamento da doença, onde ficou verificada a persistência dos parasitos através da utilização desta técnica.⁽¹¹⁾

Estudos de caracterização de *Leishmania* spp realizados na Zona da Mata de Pernambuco, através de diferentes amostras isoladas de material de biópsia e de punção aspirativa, demonstraram, por meio dos métodos de anticorpos monoclonais e perfil eletroforético de isoenzimas, que a espécie predominante é a *L. (V.) braziliensis*.⁽¹²⁾ Também em Pernambuco, Araújo et al. detectaram a infecção natural por *Leishmania* spp em 30% dos roedores silvestres (amostras de fragmentos de fígado, baço e/ou pele) capturados na localidade de Imbu, Vicência, Pernambuco, através de PCR específico para o subgênero *Viannia* (dados não publicados).

A baixa positividade através da PCR em nosso estudo foi limitada pela dificuldade de se manterem parasitos em hamsters no laboratório. Mas há de se considerar que foi possível identificá-los em nível de subgênero, objetivo desse trabalho, provando a participação do parasita no ciclo de transmissão e confirmando a importância do município de Ilhéus como importante área endêmica no cenário da LTA no País.

Por fim, a grande importância da utilização desta técnica, entre outras discutidas acima, é a possibilidade de fornecer dados indicativos sobre aspectos epidemiológicos da doença e contribuir, desta forma, para o conhecimento de novas áreas endêmicas da LTA, além de auxiliar na adoção de medidas de controle e vigilância desta importante zoonose no Brasil.

Summary

Cutaneous leishmaniasis is an endemic disease that currently presents distribution throughout the Brazil. In Bahia, it occurs in all mesoregions, with the highest incidence of cases in municipalities located in the region corresponding to the Atlantic forest area, including the city of Ilheus. This study aimed to identify Leishmania spp circulating in the region. We collected 84 samples aspirated from the border of the lesion of patients suspected with cutaneous leishmaniasis and inoculated in hamsters (Mesocricetus auratus). The animals were observed during three months and after this period they were euthanized, and fragments were collected from spleen to visualize amastigotes; for the isolation in culture; for DNA extraction; and characterization by polymerase chain reaction (PCR). Two samples were positive for the 750 bp target, which corresponds to

the kDNA minicircle specific for the subgenus *Viannia*. These results, coupled with the fact that *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is the most prevalent species in the Atlantic Forest, indicate that the disease is associated with this parasite in the city of Ilheus.

Keywords

Tegumentary Leishmaniasis; *Leishmania* (*Viannia*) spp; *Leishmania braziliensis*; PCR

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que participaram desta pesquisa, ao corpo médico, biomédico e de enfermeiros.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana: Normas e manuais técnicos. Brasília, 2007. 181p.
2. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97(3):291-6.
3. Follador I, Araújo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral A, Miranda JC, Bittencourt A, Carvalho EM. Surto de Leishmaniose Tegumentar Americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(5):497-503.
4. De Bruijn M, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*. 1992; 52(1):45-58.
5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Spring Harbor Laboratory, 1989. 545p.
6. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1435-9.
7. Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FG. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(2):318-21.
8. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PF, Secundino NF, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002; 44(5):255-9.
9. Ikononopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol*. 2003; 113(2):99-113.
10. Andrade BB, Boaventura V, Barral-Netto M, Barral A. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, falácias e perspectivas. *Gaz Med Bahia*. 2005;75(1):75-82.
11. Ridley DS. Histopathogenic Mechanisms in Leishmaniasis. *Pathologica*. 1983;75(1038):471-9.
12. Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, Félix SM, Abath FGC, Graça GC, Porrozzi R, Ishikawa E, Shaw JJ, Cupolillo E, Brandão-Filho SP. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health*. 2009;14(10): 1278-86.

Correspondência

Sílvia Carvalho

Rodovia Ilhéus/Itabuna, Km 16.
Campus Soane Nazaré de Andrade
Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas
45662-000 – Ilhéus, BA

Prevalência de marcadores sorológicos de hepatite B em pacientes internados para tratamento de alcoolismo em uma unidade de saúde mental do oeste catarinense

Hepatitis B serological markers prevalence in patients hospitalized for alcoholism treatment in a mental health unit of western Santa Catarina

Detilde Linck Pazeto¹

Kátia Arenhart Hoss¹

Cristiano Linck Pazeto²

Dennis Armando Bertolini³

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a prevalência de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em alcoolistas internados na Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional (USMHR) de Palmitos, região oeste do estado de Santa Catarina. Foram coletadas 68 amostras de material biológico para realização dos marcadores sorológicos HBsAg, anti-HBc total e anti-HBs da hepatite B no período de novembro de 2009 a março de 2010. Destes, 63 (92,6%) eram do gênero masculino, com idade de 21 a 71 anos (média de 47 anos) e 5 (7,4%) do gênero feminino, com idade de 22 a 53 anos (média de 42 anos). Verificou-se uma positividade de 2,9% para os marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc total, 47,1% do marcador anti-HBs e anti-HBc, 14,7% para o anti-HBc isolado. 19 (27,9%) alcoolistas apresentaram resultado não reagente para nenhum marcador (suscetíveis). Estes resultados sugerem um aumento significativo dos marcadores sorológicos no grupo dos alcoolistas, demonstrando uma maior suscetibilidade dos mesmos para adquirirem a infecção pelo HBV, ressaltando assim a importância de se vacinar o grupo suscetível, como medida preventiva, principalmente por se tratar de uma doença em que as chances de infecção aumentam com a idade.

Palavras-chave

Hepatite B; Alcoolistas; Marcadores sorológicos

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (HBV) pertence à família *hepadnaviridae*, que compreende um pequeno número de vírus que compartilham uma série de características, como o tropismo pelas células hepáticas. O genoma do HBV é um dos menores entre os genomas dos vírus que infectam o homem e possui aproximadamente 3.200 pares de bases (pb). É composto de uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla.⁽¹⁾

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de dois bilhões de pessoas já tiveram contato com o vírus da hepatite B; destas, aproximadamente 325 milhões se tornaram portadores crônicos.⁽²⁾

A infecção pelo HBV é um sério problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de cirrose e de carcinoma hepatocelular (CHC) no mundo. A prevalência do HBV é reconhecida quanto aos aspectos epidemiológicos e geográficos de transmissão como baixa (menor que 2%), intermediária (2%-8%) e alta (maior que 8%), com base no marcador sorológico HBsAg.⁽³⁾

Estudo realizado antes da política de vacinação contra a hepatite B apontava três padrões de distribuição desta doença no Brasil: alta endemicidade, presente na região Amazônica, parte do Espírito Santo e oeste de Santa Catarina; endemicidade intermediária, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, e baixa endemicidade na região Sul do País. No entanto, esse padrão vem se modificando após a introdução da vacina contra hepatite B. Na região Sul, categorizada como de baixa endemicidade, permanecem com prevalência moderada a região oeste de Santa Catarina e alta endemicidade o oeste do Paraná.⁽²⁾

A transmissão do vírus da hepatite B se faz por via parenteral e pela via sexual, sendo considerada uma doença sexualmente transmissível. A transmissão vertical (materno-infantil) também é causa frequente de disseminação do HBV; geralmente a transmissão ocorre no momento do parto, por meio do contato com sangue, líquido amniótico ou secreções maternas, sendo rara a transmissão via transplacentária, leite materno ou após o nascimento.⁽⁴⁾

As infecções causadas pelo HBV são habitualmente anictéricas. Apenas 30% dos indivíduos apresentam a forma

¹Curso de Especialização em Microbiologia – Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR.

²Estudante do curso de Medicina – Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR.

³Professor e pesquisador da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR.

ictérica da doença, reconhecida clinicamente. Aproximadamente 5% a 10% dos indivíduos adultos infectados cronicam. Porém, a chance de cronificação é cerca de 70% a 90% na transmissão vertical em gestantes que possuem evidências de replicação viral e 10% a 40% naquelas sem replicação do vírus. Cerca de 20% a 25% dos casos crônicos e com evidência de replicação viral evoluem para doença hepática avançada (cirrose hepática ou hepatocarcinoma).⁽⁵⁾

Os fatores que influenciam a evolução da hepatite B crônica dependem da idade do paciente na aquisição da infecção e de fatores relacionados ao hospedeiro (gênero, idade e estado imune); ao vírus (carga viral, genótipo e mutação) e a fatores externos (coinfecção com vírus hepatotrópicos, terapia imunossupressoras e consumo abusivo de álcool).⁽⁶⁾

O vírus da hepatite B e o vírus da hepatite C podem ser considerados os fatores mais importantes para o desenvolvimento do hepatocarcinoma, presentes em 70%-80% dos casos.⁽⁷⁾

Técnicas de biologia molecular têm demonstrado que mesmo em casos de hepatocarcinoma celular HBsAg negativo em alcoólatras crônicos pode haver integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, indicando que, mesmo em casos HBsAg negativo, o vírus B pode ser o principal fator etiológico do tumor.⁽⁸⁾

A infecção crônica pelo HBV é diagnosticada através da presença do antígeno de superfície (HBsAg) durante mais de seis meses. Os portadores crônicos do HBsAg podem ser divididos em dois grupos sorológicos facilmente identificados, aqueles que são HBeAg positivo e aqueles que são anti-HBe positivo.⁽⁷⁾

A hepatite alcoólica comumente só se desenvolve em pacientes que consomem pelo menos 80 g de álcool etílico ao dia, durante pelo menos cinco anos (geralmente dez anos ou mais). Os fatores de risco para doença hepática alcoólica são: quantidade de álcool ingerida, tempo de ingestão, continuidade, gênero feminino, desnutrição, substâncias hepatotóxicas em bebidas alcoólicas, outras condições patológicas (obesidade, deposição de ferro), infecção pelos vírus da hepatite B e C, fator genético (pré-disponente).⁽⁹⁾

Segundo Oliveira et al.,⁽¹⁰⁾ em vários estudos foram relatados maiores prevalências de marcadores sorológicos de infecção pelo HBV em alcoólistas, quando comparados a controles ou à população em geral, indicando que alcoólistas apresentam maiores riscos de adquirir esta infecção.⁽¹¹⁻¹⁷⁾

Estudos anteriores sobre hepatite B destacam o oeste de Santa Catarina e oeste do Paraná como áreas de alta ou média endemicidade,⁽¹⁸⁻²¹⁾ ressaltando assim a importância de se avaliar a prevalência de hepatite B em alcoólistas pertencentes a essa região.

Este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em indivíduos alcoólistas atendidos na Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos, oeste de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

A Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional (USMHR) de Palmitos está localizada na região oeste do estado de Santa Catarina e presta atendimento a 41 municípios da região. A maior demanda atendida na Unidade, segundo dados obtidos da instituição, refere-se ao tratamento de recuperação de indivíduos alcoólistas.⁽²²⁾

Foi coletada uma amostra de 10 mL de sangue de todos os pacientes classificados como alcoólistas com idade igual ou superior a 18 anos, de acordo com o seu prontuário de internação na Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos, no período de novembro de 2009 a março de 2010. Os pacientes que faziam uso de drogas injetáveis concomitantemente com o álcool e que apresentaram algum tipo de distúrbio mental relatadas no seu prontuário de internação foram excluídos.

A coleta da amostra foi realizada pelo laboratório Laborvida, do município de Palmitos, em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde, e seguiu os procedimentos e técnicas recomendadas, tais como identificação, preparo, armazenamento e transporte para os testes sorológicos, de acordo com os critérios de biossegurança, sendo que, após a separação do soro, o mesmo foi armazenado a -20°C até a realização dos marcadores sorológicos pelo Laboratório de Álvaro do município de Cascavel.

Um questionário para obtenção de informações do paciente quanto à hepatite B foi aplicado. Antes da coleta do material biológico, os pacientes foram informados sobre os temas: infecção, meios de transmissão, riscos, sintomas e prevenção da hepatite B por intermédio de uma palestra ministrada pelas pesquisadoras.

Foram pesquisados os marcadores sorológicos antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpo contra o antígeno de superfície (anti-HBs) e anticorpo contra o antígeno do core (anti-HBc total), pela metodologia de enzima imunoensaio utilizando os kits Elecsys® HBsAg II, Imunoensaio Elecsys® anti-HBs e anti-HBc EIA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

O resultado positivo para o marcador sorológico HBsAg foi confirmado pelo teste Elecsys HBsAg Teste Confirmatório (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante.

Os custos para a realização dos marcadores sorológicos para a hepatite B foram assumidos pela Secretaria de Saúde do Município, uma vez que a Clínica de Saúde Mental é mantida pelo SUS.

Os pacientes que apresentaram o marcador sorológico HBsAg positivo foram considerados como tendo infecção aguda ou crônica, enquanto que os que apresentaram os marcadores sorológicos anti-HBs e anti-HBc como infecção passada.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná conforme determina a

Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e foi obtido um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

RESULTADOS

Setenta e dois pacientes foram internados na Clínica de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos, no período de novembro de 2009 a março de 2010. Dois pacientes não foram entrevistados porque apresentavam evidência de deficiência intelectual e outros dois porque faziam uso de drogas concomitantemente com o álcool.

Foram coletadas 68 amostras de material biológico de alcoolistas, sendo 63 (92,6%) do gênero masculino, com idade de 21 a 71 anos (média de 47 anos) e 5 (7,4%) do gênero feminino, com idade de 22 a 53 anos (média de 42 anos). Com a realização dos marcadores sorológicos,

obtiveram-se os seguintes resultados: 2 (2,9%) alcoolistas apresentaram HBsAg reagente, 37 (54,5%) foram anti-HBs reagente, dos quais 5 (7,4%) pacientes apresentaram resultados compatíveis com imunização pela vacina, 10 (14,7%) apresentaram anti-HBc total isolado e 19 (27,9%) alcoolistas apresentaram resultado não reagente para o HBsAg, anti-HBs e anti-HBc total (Tabela 1).

Os casos de alcoolistas que apresentaram o HBsAg reagente pertenciam à faixa etária de 40 a 59 anos de idade. A maior frequência de infecção passada foi observada na faixa etária de 31 a 39 anos. Dentre os 32 alcoolistas com infecção passada, 22 pertenciam à faixa etária de 40 a 59 anos. (Tabela 2). Quanto ao tempo em que os alcoolistas faziam uso do álcool, a frequência de infecção aguda ou crônica e de infecção passada foi maior no período de uso de cinco a dez anos (Tabela 3).

Tabela 1 - Distribuição dos marcadores sorológicos dentre os 68 alcoolistas da Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos, estado de Santa Catarina, no período de novembro de 2009 a março de 2010

	Anti-HBc+				HBsAg (-) anti-HBc (-) anti-HBs (-)	Total
	HBsAg (+)	anti-HBs (+)	anti-HBs (-) HBsAg (-)	anti-HBs Isolado		
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
USMHR	2 (2,9)	32 (47,1)	10 (14,7)	5 (7,4)	19 (27,9)	68 (100,0)

USMHR - Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional

Tabela 2 - Distribuição dos 68 pacientes alcoolistas pertencentes a Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos, Estado de Santa Catarina, conforme a faixa etária, de novembro de 2009 a março de 2010

Faixa etária (anos)	Infecção aguda ou crônica		Infecção passada		Anti-HBc isolado		Vacinação		Suscetíveis		Total de pacientes
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
18-30	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	4	(80,0)	1	(20,0)	5
31-39	0	(0,0)	6	(60,0)	2	(20,0)	0	(0,0)	2	(20,0)	10
40-49	1	(4,2)	11	(45,8)	2	(8,3)	0	(0,0)	10	(42,0)	24
50-59	1	(4,8)	11	(52,4)	4	(19,1)	1	(4,8)	4	(19,0)	21
Acima de 60	0	(0,0)	4	(50,0)	2	(25,0)	0	(0,0)	2	(25,0)	8
Total	2	(2,9)	32	(47,1)	10	(14,7)	5	(7,3)	19	(28,0)	68

Tabela 3 - Distribuição dos 68 pacientes alcoolistas pertencentes a Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos, Estado de Santa Catarina, conforme o tempo de ingestão de álcool, de novembro de 2009 a março de 2010

Tempo de ingestão de álcool (anos)	Infecção aguda ou crônica		Infecção passada		Anti-HBc isolado		Vacinação		Suscetíveis		Total de pacientes
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
5 -10	2	5,0	20	50,0	4	10,0	4	10,0	10	25	40
11-15	2	5,0	20	50,0	4	10,0	4	10,0	10	25	40
16-20	0	0	5	50,0	3	30,0	0	0	2	20,0	10
21-25	0	0	2	33,3	0	0	0	0	4	66,7	6
+ 25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1
Total	2	2,9	12	47,1	10	14,7	5	7,3	19	28,0	68

DISCUSSÃO

Desde que Pettigrew et al., em 1972, sugeriram que o vírus da hepatite B poderia ter papel significativo no desenvolvimento de cirrose em alcoolistas crônicos, vários trabalhos têm mostrado prevalência maior dos seus marcadores sorológicos em alcoolistas do que na população em geral.^(11,23-25)

A desnutrição, a promiscuidade a que frequentemente estão sujeitos os alcoolistas e as alterações imunitárias que o etanol é capaz de produzir constituem fatores capazes de propiciar maior suscetibilidade à infecção viral e prolongada persistência do HBsAg após exposição inicial ao vírus.⁽¹¹⁾

Orholm et al.⁽¹²⁾ pesquisaram marcadores de HBV em 253 pacientes com doença alcoólica hepática, numa proporção de gênero masculino e feminino de 2:1, onde a idade média foi de 51 anos, sendo que o consumo médio de álcool era de 50 g diárias num período de cinco anos. Obtiveram como resultado 4% de positividade para o marcador sorológico HBsAg e de 28% para o anti-HBs, indicando um aumento de vinte vezes a mais do HBsAg em relação à população dinamarquesa. Nesse estudo, observou-se um aumento na frequência dos marcadores do HBV com o aumento da idade.

Conforme resultados obtidos, no presente estudo, da distribuição dos marcadores de HBV por faixa etária, ilustrado na Tabela 2, verificou-se uma concordância em comparação ao estudo de Orholm et al.,⁽¹²⁾ uma vez que a frequência dos marcadores sorológicos obtida manteve-se na faixa dos 40 a 59 anos.

Hislop et al.⁽¹⁷⁾ estudaram na Escócia um grupo de 195 pacientes, dos quais 151 eram homens com idade de 26 a 76 anos (média de 51 anos) e 44 eram mulheres (média de 49 anos), e encontraram 36 pacientes com marcadores de HBV, sendo que 24 (66,7%) apresentaram positividade para anti-HBs e anti-HBc, dois (5,6%) para HBsAg e anti-HBc, cinco (13,9%) anti-HBs e cinco (13,9%) anti-HBc.

Entre 51 pacientes com vários tipos de doença hepática alcoólica, mas sem câncer hepatocelular, Brechot et al.⁽¹⁶⁾ verificaram que 19 (37,3%) tinham marcadores sorológicos do HBV, mas apenas três (5,9%) tiveram antígeno de superfície (HBsAg) em seu soro.

Saunders et al.,⁽¹⁵⁾ num período de três anos, estudaram 189 homens com idade de 23 a 74 anos e 96 mulheres com idade de 22 a 71 anos que consumiam 40 g de álcool por dia por quatro anos ou mais, sendo que, em 263 (92,0%) pacientes, o consumo excedeu 80 g. Amostras sorológicas de 5 (1,8%) pacientes foram positivas para HBsAg, 41 (14,4%) para o anti-HBs e um paciente tinha anti-HBc. O anti-HBc foi encontrado em 16 (62%) de 26 soros positivos para o anti-HBs.

Mincis et al.⁽¹¹⁾ estudaram um grupo de 200 alcoolistas internados no Ambulatório de recuperação de alcoólatras da prefeitura de São Paulo, todos do gênero masculino, com idade de 18 a 77 anos (média de 38 anos) que consumiam

mais de 100 g de etanol ao dia durante pelo menos oito anos, encontrando o marcador HBsAg positivo em 13%, anti-HBs em 33,5% e anti-HBc em 43,0%.

Na população em estudo, em relação ao tempo de ingestão de álcool, conforme Tabela 3, obtivemos uma frequência maior dos marcadores sorológicos no período de cinco a dez anos, observando-se uma semelhança em relação aos estudos de Saunders et al.⁽¹⁵⁾ e Mincis et al.⁽¹¹⁾ demonstrando que, provavelmente, é no início do vício que ocorre o maior número de infecções pelo vírus da hepatite B. Na população em estudo, esses resultados demonstraram que o risco de adquirir a infecção não é proporcional ao tempo de ingestão de álcool, sugerindo-se que o risco maior é nos primeiros anos de consumo, devido a um conjunto de fatores, como mudanças repentinas de hábitos, baixa imunidade e internações sucessivas no decorrer desse período, ficando mais expostos e suscetíveis ao vírus.

Oliveira et al.⁽¹⁴⁾ avaliaram a frequência de marcadores sorológicos da hepatite B e C em 315 pacientes alcoolistas sem evidência clínica laboratorial de cirrose hepática (287 masculinos e 28 femininos), com idade média de 41 ± 10 anos, que ingeriam, em média, 220 ± 80 g de etanol por dia, por um período médio de 20 ± 10 anos. Também foram avaliados 50 pacientes alcoolistas com cirrose hepática (38 homens e 12 mulheres), com idade média de 48 ± 10 anos que ingeriam em média 210 ± 70 g de etanol diário, durante 22 ± 10 anos. No grupo dos alcoolistas sem cirrose, o marcador HBsAg foi determinado nos 315 pacientes, sendo que o resultado obtido foi de 0,95%. Os marcadores sorológicos anti-HBc e anti-HBs foram determinados em 130 pacientes, sendo que os resultados foram, respectivamente, 28,5% e 20,8%. No grupo com cirrose, foram encontrados para os marcadores HBsAg 8%, anti-HBc 28% e anti-HBs 10%. O grupo controle foi de 0,4% para o HBsAg, de 4,0% para o anti-HBc e de 0,4% para o anti-HCV.

No presente estudo, verificou-se uma positividade de 2,9% para os marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc, que indica uma infecção aguda ou crônica, ficando abaixo da frequência encontrada na maioria dos trabalhos analisados. No entanto, ficou acima do verificado por Saunders (1983) e do grupo sem cirrose analisado por Oliveira et al. (1999), indicando que a população analisada nesse estudo pertencia a uma região considerada de prevalência intermediária.

Conforme a classificação de endemicidade da Organização Mundial da Saúde (Margolis et al., 1991),⁽²⁶⁾ onde a prevalência do HBsAg inferior a 2% é considerada baixa, de 2% a 7% como intermediária e superior a 8% como alta, pode-se classificar a prevalência de hepatite B nos pacientes alcoolistas desse estudo como sendo intermediária.

A ocorrência do HBsAg e anti-HBc no banco de sangue de Chapecó, região oeste de Santa Catarina, foi de 3,20% e

29,04%, respectivamente, no ano de 1999. Em 2000, a ocorrência foi de 1,63% para o HBsAg e de 18,09% para o anti-HBc. Já em 2001, 1,54% para o HBsAg e 12,72% para o anti-HBc.⁽²¹⁾

Confrontando os resultados para os marcadores sorológicos obtidos no presente estudo, com os dados fornecidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina, percebe-se um aumento significativo dos marcadores HBsAg e anti-HBc no grupo de alcoolistas, sugerindo uma maior suscetibilidade dos mesmos para adquirir a infecção pelo HBV.

A ocorrência nesse estudo do marcador anti-HBs e anti-HBc em 47,1% dos pacientes, indicando recuperação da infecção com eliminação do vírus e o desenvolvimento de um estado imune, foi superior ao verificado por Oholm et al. (1981), Mincis (1984) e Oliveira (1999).

O padrão sorológico caracterizado pela presença de anticorpos contra o capsídeo do vírus da hepatite B (anti-HBc) de forma isolada não é incomum em uma definição de diagnóstico. Dependendo da prevalência da infecção pelo HBV e dos grupos de pacientes investigados, o anti-HBc isolado pode variar a sua positividade de 1% a 31%.⁽²²⁾

A frequência do marcador anti-HBc isolado de 14,7%, obtida no grupo de alcoolistas neste estudo, foi superior ao encontrado por Hislop (1981), Saunders (1983) e Oliveira (1999) em seu grupo de alcoolistas com cirrose, sugerindo as seguintes possibilidades: infecção recente, com HBsAg já negativo e anti-HBs ainda não positivo (Janela Imunológica); infecção crônica, com HBsAg em níveis baixos, indetectáveis por métodos convencionais; infecção prévia pelo HBV com anti-HBs indetectável; ou falso positivo.

Oliveira e col.⁽²³⁾ avaliaram a possibilidade de infecção oculta pelo vírus da hepatite B em alcoolistas. Em 18 pacientes que mantiveram o padrão sorológico de anticorpos anti-HBc isolado foram negativos para o HBV-DNA. Na discussão do seu trabalho, esses resultados estão de acordo com os dados encontrados por Zignego e col.,⁽³⁰⁾ que mostraram que a infecção oculta do HBV é rara em pacientes alcoólicos HBsAg negativos. Esses mesmos resultados, contudo, são diferentes daqueles encontrados por Nalpas e col.,⁽³¹⁾ que registraram uma alta positividade para o HBV-DNA em alcoólicos.

CONCLUSÕES

Os resultados relatados nesse estudo sugerem uma suscetibilidade maior para o HBV em alcoolistas no oeste de Santa Catarina, uma vez que foi encontrada uma frequência de 2,9% para alcoolistas com infecção aguda ou crônica e de 47,1% para aqueles que já se recuperaram da infecção, ressaltando assim a importância de se vacinar o grupo suscetível, como medida preventiva, principalmente por se tratar de uma doença em que as chances de infecção aumentam com a idade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes internados na Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos (USMHRP). À USMHRP, em especial ao médico Dr. Valcir Bondan e à enfermeira Adeliza Fogassi Balheiros pela colaboração na realização deste estudo. À Secretaria de Saúde de Palmitos pela autorização na realização do mesmo. Ao Laboratório Laborvida pela realização dos exames.

Summary

The objective of this study was to evaluate the Hepatitis B prevalence in alcoholics internee in the Mental Health Unit of the Regional Hospital (MHURH) in Palmitos, western state of Santa Catarina. 68 biological material samples were collected to the achievement of AgHBs, anti-HBc and hepatitis B anti-HBs serological markers from November 2009 to march 2010. From these samples, 63 (92,6%) were masculine, aged from 21 to 71 years old (47 years average) and 5 (7,4%) female, aged from 22 to 53 years old (42 years average). It has been verified a 2,9% positivity to AgHBs and anti-HBc total serological markers, 47,1% of anti-HBs and anti-HBc, 14,7% to the isolated anti-HBc. These results suggest a significant serological markers increase in the alcoholics group, proving a greater susceptibility for them to acquire the HBV infection, noting, therefore, the importance of vaccinating the susceptible group, as a preventive act, mainly because this is a disease in which the infection chances increase with age.

Keywords

Hepatitis B; Alcoholics; Serological markers

REFERÊNCIAS

1. Gomes SA. Genoma viral. In: Focaccia R. Tratado de Hepatites Virais. São Paulo: Atheneu; 2007, pág. 107-108.
2. Ministério da Saúde. Material Institucional para capacitação em vigilância epidemiológica das Hepatites Virais. 1a. ed. Brasília: Brasil Ltda, 2008.
3. Fonseca JC. Hepatite B: Aspectos epidemiológicos. In: Araújo ES. ABC das Hepatites: manual clínico para o manuseio, terapia e prevenção da hepatite B. São Paulo: Brystol Myers Squibb. Divisão virologia, 2008.
4. Carvalho AM, Araújo TM. Análise da produção científica sobre Hepatite B na pós-graduação de enfermagem. Rev Brás Enferm (Brasília). 2008;61(4) .
5. Ministério da Saúde. Caderno de atenção básica nº 18. Brasília-DF, 2006.
6. Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection. Am J Gastroenterol. 2006;101(Suppl 1):S1-6.
7. Carretero C, Herráiz M. Chronic Hepatitis B Virus infection. An Sist Sanit Navar. 2004;27(Suppl 2):27-32. [Article in Spanish].
8. Gonçalves CS, Pereira FE. Vírus B, vírus C, álcool e carcinoma hepatocelular. HFA - Publ. Téc. Cient. 1990;5(3,4):102-5.
9. Mincis M, Mincis R. Doença hepática alcoólica: Diagnóstico e tratamento. Prática Hospitalar. 2006. Ano VIII. Nº48.
10. Oliveira LC, Silva TE, Alves HM. Resposta a vacinação contra a hepatite B em alcoolistas sem cirrose hepática clinicamente evidente. Arq Gastroenterol (São Paulo). 2007;44(3).
11. Mincis M; Guimarães RX, Farrinazo Neto J, Novo NF, Chechter L. Marcadores imunológicos do vírus B da hepatite em alcoólatras e em indivíduos normais. Rev Paul Med. 1984;102:205-13.

12. Orholm M, Aldershvile J, Tage-Jensen U, Schlichting P, Nielsen JO, Hardt F, Christoffersen P. Prevalence of hepatitis B virus infection among alcoholic patients with liver disease. *J Clin Pathol.* 1981; 34(12):1378-80
13. Nalpas B, Pol S, Thépot V, Zylberberg H, Berthelot P, Bréchet C. ESBRA 1997 Award lecture: Relationship between excessive alcohol drinking and viral infections. *Alcohol Alcohol.* 1998;33(3):202-6.
14. de Oliveira LC, Buso AG, de Oliveira AT, Arantes CA, Borges LV, Valente SR. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C markers in alcoholics with and without clinically evident hepatic cirrhosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999;41(2):69-73.
15. Saunders JB, Wodak AD, Morgan-Capner P, White YS, Portmann B, Davis M, et al. Importance of markers of hepatitis B virus in alcoholic liver disease. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983;286(6381):1851-4
16. Bréchet C, Nalpas B, Couroucé AM, Duhamel G, Callard P, Carnot F, et al. Evidence that hepatitis B virus has a role in liver-cell carcinoma in alcoholic liver disease. *N Engl J Med.* 1982;306(23):1384-7.
17. Hislop WS, Folett EA, Bouchier IAD, Macsween RN. Serological markers of hepatitis B in patients with alcoholic liver disease: a multi-centre survey. *J Clin Pathol.* 1981;34(9):1017-9.
18. Bertolini DA, Pinho JR, Saraceni CP, Moreira RC, Granato CF, Carrilho FJ. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Paraná State, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(8):1083-90.
19. Chávez JH, Campana SG, Haas P. An overview of hepatitis B in Brazil and in the state of Santa Catarina. *Rev Panam Salud Publica.* 2003;14(2):91-6. [Article in Portuguese].
20. Petry A, Kupek EJ. Efetividade das vacinas anti-VHB (DNA-recombinante) em doadores de sangue de uma região endêmica para hepatite B no sul do Brasil. *Rev Soc Brás Méd Trop(Uberaba).* 2006;39(5).
21. Moraes JC, Luna EJ, Grimaldi RA. Imunogenicidade da vacina brasileira contra hepatite B em adultos. *Rev Saúde Pública (São Paulo).* 2010;44(2).
22. Perin D. Perfil dos alcoolistas internados na Unidade de Saúde Mental do Hospital Regional de Palmitos. Monografia. Especialização em Saúde Mental. Faculdade de Ingá - UNINGA. 2009.
23. Gonçalves CS, Pereira FE, Zago MP. Doença hepática, álcool e vírus da hepatite B e C. *GED.* 1994;13(4).
24. Mendenhall CL, Seeff L, Diehl AM, Ghosn SJ, French SW, Gartside PS. Antibodies to hepatitis B virus and hepatitis C virus in alcoholic hepatitis and cirrhosis: their prevalence and clinical relevance. The VA Cooperative Study Group (No. 119). *Hepatology.* 1991;14(4 Pt 1):581-9. Comment in: *Hepatology.* 1991;14(4 Pt 1):730-3.
25. Lacet CMC & Strauss E. O vírus da hepatite B na doença hepática alcoólica: avaliação clínica e bioquímica. *Rev Soc Brás Méd Trop.* 1993;26:201-9.
26. Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. Hepatitis B: involving epidemiology and implications for control. *Semin Liver Dis.* 1991; 11(2):84-92.
27. Souza DE. Avaliação da efetividade da vacina anti-Hepatite B (DNA-recombinante) em doadores de sangue do hemocentro regional de Joaçaba, Santa Catarina, Brasil. Dissertação de Mestrado. Mestre em Saúde Pública. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. 2006.
28. Pondé RA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the "anti-HBc alone" serological profile. *Arch Virol.* 2010; 155(2):149-58.
29. Oliveira LM, Abrahão PD, Amorim SB. Detecção de vírus da hepatite B (VHB-DNA) no soro de 18 alcoolistas. *Arq Gastroenterol.* 2008;45(3).
30. Zignego AL, Foschi M, Laffi G, Monti M, Careccia G, Romanelli RG, et al. Inapparent hepatitis B virus infection and hepatitis C virus replication in alcoholic subjects with and without liver disease. *Hepatology.* 1994;19(3):577-82.
31. Nalpas B, Berthelot P, Thiers V, Duhamel G, Couroucé AM, Tiollais P, et al. Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *J Hepatol.* 1985;1(2):89-97.

Correspondência

Laboratório Laborvida

Rua 7 de Setembro, 200 - Centro

89887 000 - Palmitos, SC

laboratoriolaborvida@hotmail.com

Perfil de suscetibilidade ao fluconazol de leveduras isoladas de urina de pacientes internados em um hospital universitário do sul de Minas Gerais, Brasil

Fluconazole susceptibility profile of yeasts isolated of urine of interned patients in a university hospital of the south of Minas Gerais, Brazil

Raquel Maria Lima Lemes¹

Aline Reis Bertoldi^{1,2}

Resumo

Fungúria é definida como crescimento de fungos em culturas de urina sem necessariamente haver infecção. Essa condição é, em geral, encontrada em pacientes hospitalizados que fazem uso de cateter urinário. A identificação fúngica é fundamental para a definição da etiologia e para o estudo do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos. Uma vez que a resistência ao fluconazol tem se tornado comum, a avaliação desse fármaco é particularmente importante. Dessa forma, objetivou-se determinar o padrão de suscetibilidade ao fluconazol de leveduras isoladas de urina de pacientes internados no Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Itajubá – FMIT. As leveduras (63) foram testadas frente ao fluconazol pelo método de difusão em ágar, empregando E-Test e tendo *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), como controle. O resultado do E-test revelou que 79,36% das leveduras apresentaram sensibilidade ao fluconazol, 4,77% mostraram suscetibilidade dependente da dose (S-DD) e que 15,87% foram resistentes. As espécies que apresentaram maiores percentuais de sensibilidade para o fluconazol foram *Candida tropicalis* (92,3%) e *Candida albicans* (83,33%). Os resultados aqui apresentados mostram uma elevada taxa de suscetibilidade para isolados de urina. No entanto, os percentuais de resistência encontrados foram maiores do que aqueles normalmente reportados para leveduras de urina.

Palavras-chave

Leveduras; Fluconazol; Perfil de suscetibilidade

INTRODUÇÃO

Normalmente, a urina não apresenta nenhum microrganismo, já que o trato urinário é estéril. A exceção fica por conta do primeiro centímetro distal da uretra, que pode conter microrganismos encontrados na pele.⁽¹⁾ A presença de microrganismos pode levar ao desenvolvimento de infecção urinária, principalmente, em pacientes em uso de cateter urinário.⁽²⁾

A capacidade das leveduras em aderir e formar biofilmes em cateter urinário tem sido considerada um dos principais fatores relacionados à virulência de *Candida* spp., pois faz com que esse material se torne um reservatório microbiano, aumentando o risco de infecção hospitalar, entre elas, a candidúria.^(3,4) O termo candidúria não envolve necessariamente a presença de sinais e/ou sintomas de infecção urinária e pode ser definido, simplesmente, como o crescimento de *Candida* sp. em culturas de urina. Trata-se de evento muito frequente entre pacientes expostos a fatores

de risco, sendo que até 20% de indivíduos hospitalizados podem apresentar essa condição, ao longo de sua internação, principalmente quando internados em unidade de terapia intensiva.⁽⁵⁻⁹⁾

Em casuísticas de infecções urinárias por leveduras, *Candida albicans* tem sido considerada a espécie mais comumente isolada de trato urinário (50% a 70%), seguida por *Candida glabrata* (5% a 33%) e por outras espécies de leveduras do grupo não *albicans* (8% a 28%).^(6,7,10) Claramente, no mundo, a frequência de espécies não *albicans* vem aumentando de forma consistente.⁽¹¹⁾ No Brasil, além de *C. albicans* (35,5%-70%), as duas espécies mais isoladas de urina de pacientes hospitalizados são *Candida tropicalis* (4,6% a 52,5%) e *Candida glabrata* (7% a 8,8%).^(2,12-15)

Estudos padronizados de testes de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos têm fornecido também dados acerca da epidemiologia dos isolados de *Candida* spp.^(16,17) recuperados de urina de pacientes hospitalizados frente às drogas antifúngicas. De fato, baixas taxas de sensibilidade a anti-

Faculdade de Medicina de Itajubá, MG, Brasil.

¹ Laboratório de Microbiologia.

² Bolsista FAPEMIG – Iniciação Científica (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica)

fúngicos têm sido verificadas em muitos isolados e em diferentes regiões geográficas, inclusive no Brasil, o que parece ser decorrente de terapêutica prolongada^(18,19) e/ou de resistência cruzada.^(20,21)

Tendo em vista o aumento na incidência de infecções fúngicas invasivas e a utilização maça de agentes anti-fúngicos na quimioterapia desses processos, bem como a ocorrência do fenômeno de resistência, é fundamental a realização de estudos que abordem a identificação e a distribuição dos perfis de suscetibilidade de leveduras de origem clínica para um manejo de pacientes e um controle dos processos fúngicos mais eficientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Foram analisadas 63 amostras de leveduras isoladas de urina de pacientes internados no Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Itajubá (HE - FMI), previamente identificadas pelo método bioquímico clássico. Duas amostras eram de *Trichosporon asahii* e as demais de *C. albicans* (18), *C. parapsilosis* (20), *C. tropicalis* (13), *Candida guilliermondii* (03), *C. glabrata* (03), *Candida krusei* (01), *Candida dubliniensis* (01) e *Candida* spp. (02).

E-test. O teste de suscetibilidade ao fluconazol foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (AB Biodisk®), empregando ágar de Sabouraud dextrosado, vertido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. O inóculo foi ajustado à escala 0,5 de McFarland e distribuído uniformemente sobre a superfície do meio com auxílio de *swab* esterilizado. Após a deposição da tira de fluconazol sobre a placa, esta foi incubada a 35° C durante 48 horas. As leituras dos halos foram realizadas com 24 e 48 horas, e a determinação do ponto final da concentração do fluconazol foi aquela em que a elipse de inibição foi detectada.⁽²²⁾ A leitura da concentração determinou a sensibilidade (halo ≤ 8 µg/mL), a resistência (halo ≤ 64 µg/mL) e a suscetibilidade dose-dependente [S-DD] (16 e 32 µg/mL).⁽²³⁾ *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) foi utilizada como cepa controle.

RESULTADOS

A concentração inibitória mínima das 63 amostras analisadas para fluconazol variou de 0,25 a >256 µg/mL e a CIM₅₀ foi 1,5 µg/mL e CIM₉₀ 128 µg/mL. A espécie que apresentou maior variação da CIM foi *C. parapsilosis* com valores entre 0,25 a >256 µg/mL. As amostras de *C. parapsilosis* e *C. krusei* evidenciaram o mesmo valor para CIM₉₀ (64 µg/mL) e, entre as amostras de *C. glabrata*, *C. albicans* e *Candida* spp., a CIM₉₀ foi >256 µg/mL (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra a distribuição da suscetibilidade de acordo com as diferentes espécies. Cinquenta (79,36%) amostras foram sensíveis ao fluconazol, três (4,77%) foram S-DD e dez (15,87%) resistentes. A espécie que apresentou maior suscetibilidade foi *C. tropicalis* (92,3%), seguida de *C.*

albicans (83,33%) e *C. parapsilosis* (80%). Todas as amostras de *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *T. asahii* foram sensíveis ao fluconazol. Suscetibilidade dose dependente (S-DD) foi encontrada em *C. parapsilosis* (5%), *C. tropicalis* (7,7%) e *C. glabrata* (33,34%). As cepas que apresentaram resistência foram *C. krusei* (100%), *C. glabrata* (66,66%), *C. albicans* (16,67%), *C. parapsilosis* (15%) e *Candida* spp. (50%).

Tabela 1 - Parâmetros de suscetibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina, frente ao fluconazol

Espécies (n)	Variação da CIM (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
<i>C. albicans</i> (18)	1 - >256	1.5	> 256
<i>C. parapsilosis</i> (20)	0.25 - >256	1	64
<i>C. tropicalis</i> (13)	0.75 - 24	0.75	2
<i>C. guilliermondii</i> (3)	0.75 - 8	1	3
<i>C. glabrata</i> (3)	32 - >256	32	> 256
<i>C. krusei</i> (1)	64	64	64
<i>C. dubliniensis</i> (1)	0.38	0.38	0.38
<i>Candida</i> spp. (2)	1 - >256	1	> 256
<i>T. asahii</i> (2)	2 - 6	2	6
Total (63)	0.25 - > 256	1.5	128

CIM = Concentração Inibitória Mínima

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade ao fluconazol de espécies de *Candida* e *Trichosporon* determinado pelo E-test

Espécies (n)	Sensível ≤ 8 n (%)	SDD 16-32 n (%)	Resistente ≥ 64 n (%)
<i>C. albicans</i> (28,60)	15 (83,33)	-	03 (16,67)
<i>C. parapsilosis</i> (31,75)	16 (80)	01 (5%)	03 (15)
<i>C. tropicalis</i> (20,63)	12 (92,3)	01 (7,7%)	-
<i>C. guilliermondii</i> (4,76)	03 (100)	-	-
<i>C. glabrata</i> (4,76)	-	01 (33,34%)	02 (66,66)
<i>C. krusei</i> (1,58)	-	-	01 (100)
<i>C. dubliniensis</i> (1,58)	01 (100)	-	-
<i>Candida</i> spp. (3,17)	01 (50)	-	01 (50)
<i>T. asahii</i> (3,17)	02 (100)	-	-
Total (100)	50 (79,36)	3 (4,77)	10 (15,87)

SDD = Suscetibilidade Dependente da Dose

DISCUSSÃO

Apesar da ocorrência de candidúria em pacientes hospitalizados ser um fenômeno conhecido, o significado clínico da presença de leveduras na urina desses pacientes é de difícil interpretação,⁽⁹⁾ pois a distinção entre contaminação e infecção não é clara, mesmo com critérios diagnósticos confiáveis.⁽²⁴⁾ Candidúrias são muito frequentes em pacientes

expostos a fatores de risco, sendo que até 20% dos pacientes hospitalizados podem apresentar infecção urinária ao longo de sua internação, particularmente, aqueles de unidades de terapia intensiva.⁽⁸⁾ Estima-se que pacientes de risco para candidemia em UTI estejam sendo tratados empiricamente com fluconazol, o que ocasiona a seleção de espécie não albicans com suscetibilidade reduzida a azólicos⁽²⁵⁻²⁷⁾ acarretando o isolamento de cepas resistentes.⁽²⁷⁾

De acordo com diferentes trabalhos, a incidência de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol no Brasil é inferior a 10%.⁽²⁸⁻³⁰⁾ Segundo Colombo,⁽²⁹⁾ esse baixo índice é decorrente do uso reduzido de fluconazol como profilático nos hospitais brasileiros. No presente estudo, no entanto, foi obtida uma taxa de resistência (15,87%) maior do que a informada por Colombo.⁽²⁹⁾ Da mesma maneira, a taxa de sensibilidade ao fluconazol obtida nesta avaliação (79,36%) foi menor do que aquela (92,4%) relatada por Aquino et al.⁽³¹⁾ Com reportada comumente na literatura,⁽³²⁾ a resistência intrínseca de *C. krusei* ao fluconazol (100%) também foi observada.

Neste estudo, apesar dos valores de CIM para fluconazol de isolados de *C. glabrata* serem variáveis e frequentemente maiores do que aqueles para *C. albicans*,⁽³²⁾ *C. glabrata*, *C. albicans* e *Candida* spp evidenciaram o mesmo valor de CIM₉₀ (>256 µg/mL). Todavia, para *C. glabrata*, os valores CIM aqui observados foram maiores do que os descritos em outras publicações.^(18,33)

Nas cepas aqui estudadas, 7,7% de *C. tropicalis* e 33,34% de *C. glabrata* foram S-DD, enquanto que em um estudo com diversos hospitais brasileiros, Colombo et al.⁽³⁴⁾ encontraram taxas menores, com percentuais de SDD/resistência ao fluconazol de 2,1% para *C. tropicalis* e de 16% para *C. glabrata*. Os resultados apresentados aqui estão de acordo com a literatura nacional quanto à taxa de sensibilidade de *C. tropicalis* (92,3%), um pouco inferior à taxa obtida por Colombo et al.⁽³⁴⁾ (97,8%) e Aquino et al.⁽³¹⁾ (100%).

Colombo et al.⁽³⁴⁾ relataram ainda taxas de SDD/resistência ao fluconazol de 4% para *C. albicans* e de 4,4% para *C. guilliermondii*. No entanto, no presente trabalho, *C. albicans* exibiu taxas de resistência de 16,67%, e *C. guilliermondii* taxa de sensibilidade de 100%. A sensibilidade de *C. guilliermondii* aqui obtida foi superior, inclusive, ao informado para a América Latina (77%).⁽³⁵⁾

Oitenta por cento das amostras de *C. parapsilosis* analisadas apresentaram-se sensíveis ao fluconazol, 5% foram S-DD e 15% foram resistentes. Os dados aqui reportados, quando comparados com os de Colombo et al.⁽³⁴⁾ e Silva et al.,⁽²⁷⁾ evidenciam taxas de dose-dependência e resistência cerca de 15 a 25 vezes maiores do que as taxas encontradas por aqueles autores.

Embora haja divergência entre os dados obtidos neste estudo e a literatura, deve-se levar em consideração a diferença entre os sítios de obtenção das amostras, pois variações da suscetibilidade ao fluconazol podem ser observadas entre diferentes sítios de isolamento de

leveduras,⁽³⁵⁾ bem como em decorrência do método empregado para a avaliação da suscetibilidade às drogas antifúngicas. Outro fator significativo é a procedência das amostras analisadas, já que, neste estudo, estas foram oriundas apenas do Hospital Escola da FMI, enquanto que os estudos brasileiros, cujos dados foram usados para comparação, apresentavam um caráter multicêntrico.^(29,34,35)

CONCLUSÕES

A partir da presente avaliação, foi possível concluir que os valores de CIM obtidos dos espécimens de urina aqui estudados são maiores do que aqueles obtidos a partir de outros sítios anatômicos. Os dados de resistência e SDD estão acima dos obtidos nos demais hospitais brasileiros e, por isso, presumimos haver uso profilático ou empírico de fluconazol no Hospital Escola da FMI. Estes dados nos levam a sugerir como protocolo a realização de testes de suscetibilidade ao fluconazol para amostras de leveduras provenientes de pacientes hospitalizados com infecção fúngica documentada, após o uso empírico ou profilático de azólicos.

Summary

Funguria is defined as fungi growth in urine cultures without infection and it is frequent among hospitalized patients in use of urinary catheter. The identification of these fungi is essential for the etiology definition and the study of susceptibility profile to antifungal agents, since the resistance to fluconazole has become frequent and important. The aim of this study was determine the susceptibility profile of yeasts isolated from urine of patients at the Hospital of Medical School [FMI]. The yeasts (63) were tested by the E-test method using Candida parapsilosis [ATCC 22019] as control. The E-test result showed that 79,36% of yeasts were fluconazole susceptible, 4,77% were dose-dependent susceptible (DD-S) and 15,87% were resistant. The species with highest sensitivity were Candida tropicalis (92,3%) and Candida albicans (83,33%). The results presented here show a high rate of susceptibility to urine isolates. However, the resistance percentages found were larger than those reported usually for yeast from urine.

Keywords

Yeasts; Fluconazole; Susceptibility profile

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração da técnica do laboratório de Microbiologia, Maria Aparecida de Oliveira, e ao apoio do Núcleo de Desenvolvimento de Pesquisa e Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Itajubá (NDPPG-FMI). Este trabalho foi realizado com os recursos provenientes da Bolsa de Iniciação Científica da FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

1. Thompson Jr RB, Miller M. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 8ª ed. Washington, DC, 2003; 320-321.
2. Oliveira RD, Maffei CM, Martinez R. Nosocomial urinary tract infections by Candida species. Rev Assoc Med Brasil. 2001; 47(3):231-5. [Article in Portuguese]

3. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(6):1697-703.
4. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de Gaetano Donati K, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1843-50.
5. Febré N, Silva N, Medeiros EAS, Wey SB, Colombo AL, Fischmann O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1584-6.
6. Gubbins PO, Piscitelli SC, Danziger LH. Candidal urinary tract infections: a comprehensive review of their diagnosis and management. *Pharmacotherapy*. 1993;13(2):110-27.
7. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis*. 1995; 20(6):156-60.
8. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000;30(1):14-8.
9. Nucci M. Candiduria in hospitalized patients: a review. *Braz J Infect Dis*. 2000;4(4):168-72.
10. Kauffman CA. Candiduria. *Clin Infect Dis*. 2005;41 Suppl 6: S371-6.
11. Stamm WE. Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis and prevention. *Am J Med*. 1991; 91(Suppl 3B):65S-71S.
12. Binelli CA, Moretti ML, Assis RS, Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, Geiger DCP, Mikami Y, Miyaji M, Oliveira MS, Barone AA, Levin AS. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(6):538-43.
13. Fisher JF, Newmam CL, Sobel JD. Yeasts in the urine: solutions for a budding problem. *Clin Infect Dis*. 1995;20(1):183-9.
14. Kobayashi CC, de Fernandes OF, Miranda KC, de Souza ED, Silva Mdo R. Candiduria in hospital patients: a study prospective. *Mycopathologia*. 2004;158(1):49-52.
15. Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, Lemos Jde A, Batista Mde A, Silva Mdo R. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(8):925-8.
16. Schawab U, Chernomas F, Larcom L, Weens J. Molecular typing and fluconazole susceptibility of urinary *Candida glabrata* isolates from hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997;29(1):11-7.
17. Silva VV, Díaz MC, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect*. 2002;19:56-65.
18. Pfaller MA, Rhine JC, Barry AL, Rex JH. Strain variation and antifungal susceptibility among bloodstream isolates of *Candida* species from 21 different medical institutions. *Clin Infect Dis*. 1995; 21(6):1507-9.
19. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Minireview - Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39 (1):1-8.
20. Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. *In vitro* activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(7):1530-3.
21. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole resistance in *Candida* species from HIV- infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother*. 1995;35(1):103-14.
22. Torres-Rodríguez JM, Madrenys N, Jiménez T, Saballs P. Minimal inhibitory concentrations of *Candida* species to five antifungals by using the reference dilution micromethod and the E-test. *Rev Iberoam Micol*. 1997;14(3):115-8. [Article in Spanish].
23. Clinical And Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard M27-A3. CLSI. Wayne, PA, 2008.
24. Sobel JD. Controversies in the diagnosis of candiduria: What is the critical colony count? *Infect Dis*. 2002;4:81-3.
25. Evans TG, Mayer J, Cohen S, Classen D, Carroll K. Fluconazole failure in treatment of systemic mycoses. *J Infect Dis*. 1991;164(6): 1232-5.
26. McLroy MA. Failure of fluconazole to suppress fungemia in a patient with fever, neutropenia and typhilitis. *J Infect Dis*. 1991;163(2):420-1.
27. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2392-7.
28. Baddley JW, Smith AM, Moser SA, Pappas PG. Trends in frequency and susceptibilities of *Candida glabrata* bloodstream isolates at a university hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 39(3):199-201.
29. Colombo AL. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Braz J Infect Dis*. 2000;4(3): 113-8.
30. Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini ML, Kussano EJ, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol*. 2003;41(3):235-9.
31. Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005;9(5):411-8.
32. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients eighth bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med*. 1991;325(18):1274-77. Comment in: *N Engl J Med*. 1992;326(13):892; author reply 892-3; *N Engl J Med*. 1992;327(9):644; author reply 645. *N Engl J Med*. 1991; 325(18):1315.
33. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(3): 401-5.
34. Colombo AL, Da Matta D, De Almeida LP, Rosas R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *Braz J Infect Dis*. 2002;6(3):118-23.
35. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibbs DL, Newell VA. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2006;44(10):3551-6.

Correspondência

Raquel Maria Lima Lemes

Av. Rennó Jr. 368 – Bairro São Vicente

37502-138 – Itajubá, MG, Brasil

Tel.: (35) 3629-8700/715 Fax: (35) 3621-4545

microbiologia@aisi.edu.br

Pesquisa de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em enterobacteriaceae uropatogênicas isoladas em laboratório de Caxias do Sul

Research of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) in uropathogenic enterobacteriaceae isolated in Caxias do Sul (RS) laboratory

Débora Menegol¹

Simone Ulrich Picoli²

Maribel Calza Ferreira³

Resumo

A infecção do trato urinário é uma patologia extremamente frequente em todo mundo, sendo uma das mais importantes causas de infecções na comunidade. Os organismos envolvidos nesses processos são normalmente bactérias Gram-negativas, destacando-se, entre elas, a *Escherichia coli*. Em alguns isolados de enterobactérias, tem sido encontrado mecanismos de resistência denominado de ESBL, que afeta grande parte dos antimicrobianos beta-lactâmicos de uso clínico. Devido a esse fato, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar a frequência das bactérias causadoras de infecção urinária oriundas da comunidade e, adicionalmente, averiguar a presença de ESBL através da implementação de um método de detecção em um laboratório privado de Caxias do Sul (RS). Foi analisado um total de 277 amostras de urina, das quais 123 foram uroculturas positivas. *Escherichia coli* foi a bactéria mais isolada (70%), seguida por *Staphylococcus saprophyticus* (13%), *Proteus mirabilis* (8.3%), *Klebsiella* sp. (6.7%), *Pseudomonas aeruginosa* (1.8%) e *Enterococcus* sp. (0.8%). A possível produção de beta-lactamases foi observada em apenas dois isolados de enterobactérias que apresentaram triagem positiva para ESBL, mas nenhuma foi positiva na confirmação. Ainda assim, é de grande importância o conhecimento epidemiológico dos isolamentos bacterianos, seu padrão de sensibilidade aos antimicrobianos e mecanismos de resistência existentes, a fim de proporcionar ao paciente as condições para um tratamento adequado e eficaz.

Palavras-chave

ESBL; Infecção urinária; *Escherichia coli*; Resistência bacteriana

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma patologia extremamente frequente em todo mundo, sendo a principal causa de infecções na comunidade, atingindo todas as idades e gêneros na população. Apesar das infecções urinárias normalmente serem de caráter agudo e de fácil tratamento, podem se agravar, resultando em perda da função renal, contribuindo para uma pequena taxa de mortalidade na população.⁽¹⁻³⁾

As principais bactérias causadoras das ITUs são, na sua maioria, Gram-negativas. Dentre elas, *Escherichia coli* é, seguramente, a mais isolada, sendo seguida por *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.⁽⁴⁻⁶⁾

Um importante mecanismo de resistência enzimático encontrado em isolados de enterobactérias é a produção de

beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL). As ESBLs são um grupo de enzimas de codificação plasmidial, derivadas das beta-lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2, SHV-1), que sofreram mutações, alterando sua configuração de amino-ácidos. Além de proporcionarem resistência às amino-ureidopenicilinas, têm seu espectro ampliado às cefalosporinas de terceira e quarta geração e aos monobactams, não hidrolisando as cefamicinas e os carbapenems.⁽⁷⁾

Sabe-se que muitos estudos são realizados na pesquisa de isolados bacterianos produtores de ESBL em hospitais, mostrando uma alta prevalência desses patógenos. No entanto, poucos estudos são desenvolvidos no âmbito da comunidade.^(8,9) Devido a esse fato, o presente trabalho buscou avaliar a frequência de cepas de uroculturas oriundas de ambiente comunitário, mediante implementação de um método de detecção laboratorial para ESBL em instituição privada.

¹Acadêmica de Biomedicina da Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

²Professora Me. do Curso de Biomedicina da Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

³Bacharel em Ciências Biológicas.

Laboratório de Análises Clínicas Microlab, Caxias do Sul (RS).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras do presente estudo foram constituídas de cepas bacterianas isoladas de espécimens de urina de indivíduos egressos da comunidade, atendidos em um Laboratório privado de Caxias do Sul (RS), no período de dezembro de 2009 a abril de 2010. As bactérias presentes na urina, cujo crescimento foi igual ou superior a 100.000 UFC/mL, foram identificadas através de provas bioquímicas em equipamento automatizado.

E. coli, *Klebsiella* sp. e *P. mirabilis* foram avaliadas quanto ao seu potencial de produzir ESBL por teste de triagem de disco difusão com beta-lactâmicos de amplo espectro, conforme Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).⁽¹⁰⁾ Nessa triagem, cada cepa foi suspensa em solução fisiológica até o equivalente à escala 0.5 McFarland, semeada em ágar Müller-Hinton e testadas frente a discos de cefazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg) e aztreonam (30 µg) (DME) contra *E. coli* e *Klebsiella* sp. e discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg) e cefpodoxima (10 µg) (DME) contra *P. mirabilis*. Após incubação a 35°C/18 horas, foram procedidas leituras dos halos de inibição. Os valores desses halos foram confrontados com aqueles estabelecidos pelo CLSI.⁽¹⁰⁾ (Tabelas 1 e 2) e a produção enzimática foi confirmada por disco aproximação com disco de amoxicilina/ ácido clavulânico 20 µg/10 µg - DME.

Tabela 1 - Medidas de halos sugestivos para produção de ESBL em *E. coli* e *Klebsiella* sp.

Antimicrobiano	Halo (mm)
Aztreonam	≤ 27
Cefotaxima	≤ 27
Ceftazidima	≤ 22
Ceftriaxona	≤ 25

Fonte: CLSI, 2010 (M100-S20)

Tabela 2 - Medidas de halos sugestivos para produção de ESBL em *P. mirabilis*.

Antimicrobiano	Halo (mm)
Cefotaxima	≤ 27
Ceftazidima	≤ 22
Cefpodoxima	≤ 22

Fonte: CLSI 2010 (M100-S20)

Para técnica de disco aproximação, realizou-se a difusão com amoxicilina/ácido clavulânico (20 µg/10 µg) na região central da placa e, a 20 mm desse, foram colocados os discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg) e ceftriaxona (30 µg) e, ainda, aztreonam (30 µg) (DME). Após a incubação (35°C/18 a 20 horas), foi avaliada a presença/ausência de zona deformada característica, chamada de zona fantasma, entre o disco combinado e os discos com os demais antibióticos dispostos na periferia.

Para fins de controle de qualidade do teste de detecção de ESBL, utilizou-se cepa de *Klebsiella pneumoniae* [ATCC 700603] e, como controle negativo, empregou-se *Escherichia coli* [ATCC 25922].

RESULTADOS

Foi analisado um total de 277 amostras de urina, das quais 123 (44.4%) foram urinoculturas positivas. A bactéria mais frequentemente isolada foi *E. coli*, representando praticamente 70% das amostras, seguida por *S. saprophyticus* (13%), *P. mirabilis* (8,3%), *Klebsiella* sp. (6,7%), *P. aeruginosa* (1,8%) e *Enterococcus* sp. (0,8%) (Tabela 3).

Dentre as enterobactérias classicamente produtoras de ESBL, *E. coli*, *P. mirabilis* e *Klebsiella* sp., apenas duas cepas apresentaram teste de triagem positivo, tendo halos sugestivos para produção de ESBL, sendo elas, uma *E. coli* e outra de *P. mirabilis*. Porém, no teste confirmatório por disco aproximação, nenhuma delas apresentou positividade para ESBL (Tabela 3).

Tabela 3 - Isolados bacterianos em urina comunitária e resultados de triagem/confirmação para ESBL

Microrganismo	Nº de amostras (%)	Teste de triagem positivo	Teste confirmatório ESBL
<i>Escherichia coli</i>	85 (69,4)	1	Negativo
<i>S. saprophyticus</i>	16 (13)	N.A.	N.A.
<i>Proteus mirabilis</i>	10 (8,3)	1	Negativo
<i>Klebsiella</i> sp.	8 (6,7)	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	2 (1,8)	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	1 (0,8)	N.A.	N.A.
Total	123 (100)	2	Negativo

N.A.: Não se aplica

DISCUSSÃO

As infecções do trato urinário são extremamente frequentes em todas as idades, desde o neonato até a idade senil. Nos Estados Unidos, quase 10 milhões de pessoas se submetem anualmente a consultas médicas, devido a complicações urinárias. No Brasil, cerca de 80% das consultas médicas são atribuídas a esse mesmo problema e 45% das amostras de urina são positivas, demonstrando uma alta taxa de infecção urinária na população do País.⁽¹¹⁾

Os dados encontrados no presente estudo referentes à etiologia bacteriana são similares aos descritos por outros autores, uma vez que *E. coli* é o patógeno mais frequentemente isolado. Essa bactéria está envolvida em 70% a 95% das ITUs adquiridas na comunidade, sendo suas taxas influenciadas pela translocação de cepas de *E. coli* da microbiota intestinal para o trato urinário.^(12,13)

O *S. saprophyticus* foi o segundo organismo mais isolado (13%) em ITUs, o que é compatível com os dados

da literatura americana. Porém, na maioria dos artigos brasileiros tem sido descrita baixa prevalência, variando de 3,5% a 5,7%. Tal fato pode ser explicado por seu crescimento mais lento ou pela confusão com outros *Staphylococcus* comensais do trato urinário.^(3,4,14) Em contrapartida, em estudos nacionais, a *Klebsiella* sp. surge como o segundo patógeno mais isolado em infecções urinárias, o que contraria os achados da presente investigação, onde ela ocupa o quarto lugar (6,7%).^(4,15)

Em relação às outras enterobactérias isoladas, encontrou-se concordância com a frequência descrita em outras análises, verificando-se baixa prevalência de *P. aeruginosa*. Contudo, essa bactéria tem sido considerada um patógeno emergente em ITUs na comunidade.⁽⁴⁾

Em geral, tem sido observado, em bactérias, um grande número de formas de resistência aos antimicrobianos. Dentre esses mecanismos, a produção de beta-lactamases é um dos mais importantes.^(16,17) Nesse grupo de enzimas hidrolíticas, destacam-se as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que são produzidas por bacilos Gram-negativos, frequentemente isoladas em cepas de *Klebsiella* sp. e *E. coli*, sendo menos incidentes em outras enterobactérias como em *P. mirabilis*.⁽¹⁸⁾

As cepas produtoras de ESBL vêm sendo descritas com frequência crescente em todas as partes do mundo, incluindo a América do Sul, onde a taxa em *Klebsiella* sp. oscila de 3,1% a 95%; em *E. coli* de 3,3% a 47,3% e em *P. mirabilis* de 9,5% a 35,5%. Cepas ESBL-positivas são sabidamente mais isoladas em amostras de pacientes hospitalizados, podendo causar surtos nosocomiais. No entanto, também podem ser encontradas em amostras de origem comunitária, onde a maioria das infecções são urinárias e causadas por *E. coli*.^(8,19)

Dados nacionais de pesquisa desenvolvida no Paraná revelaram que 31% de isolados de *E. coli* uropatogênicas comunitárias foram consideradas suspeitas de serem produtoras de ESBL, durante triagem preliminar dessas amostras, revelando um prevalência de 3,5%. No Canadá, estudos realizados no período de 2000 a 2002 em 157 pacientes hospitalizados e não hospitalizados com infecções por *E. coli* demonstraram uma incidência de 5,5% de cepas de *E. coli* ESBL-positiva.^(1,20) Na Espanha, uma pesquisa também revelou taxas mais elevadas de ESBL tanto em pacientes hospitalizados quanto ambulatoriais. Segundo os autores espanhóis, entre 1991 e 2003, houve um aumento dos percentuais de isolamento de bactérias ESBL-positivas, em ambos os grupos de pacientes avaliados, da ordem de 4,8% e 5,2%, respectivamente.^(21,22)

Apesar de estudos realizados por americanos e europeus reportarem um aumento de casos de bactérias produtoras de ESBL em locais não hospitalares, no presente trabalho, não foram encontradas, nesses ambientes, cepas produtoras de ESBL.^(20,23) Contudo, a implementação de um método de detecção *in vitro* para ESBL em laboratórios comerciais, sistematiza seu estudo, permitido futuras

detecções na comunidade, contribuindo, dessa forma, também com a vigilância em saúde.

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do trabalho em tela, verificou-se que *E. coli* foi a principal bactéria responsável pelas infecções urinárias, seguida pelo *S. saprophyticus*.

O diagnóstico laboratorial das infecções urinárias, sua epidemiologia e padrão de sensibilidade aos antimicrobianos são informações importantes, pois sabe-se que, na maioria dos casos, o tratamento clínico é realizado de maneira empírica, o que pode levar a uma propedêutica inadequada e até mesmo ineficaz.

Na presente avaliação, apesar de não terem sido isoladas cepas produtoras de ESBL cabe também aos laboratórios de análises clínicas tal investigação, pois estes têm, igualmente, papel importante na vigilância dos índices de resistência microbiana seja no ambiente hospitalar seja no ambiente comunitário.

Summary

The urinary tract infection is an extremely frequent worldwide disease, being the leading cause of infections in the community. The main causative bacteria are Gram-negative and, among these, *Escherichia coli* is the most isolated. In some enterobacteria's isolated a important mechanism of resistance denominated ESBL has been found, which affects most of beta-lactamic antibiotics of clinical use. Because of this, this study sought to search the frequency of urinary infection's causative bacteria arising from community and, additionally, to verify the presence of ESBL in these through implementation of a method for its detection at a private laboratory in Caxias do Sul (RS). A total of 277 urine samples was analyzed, of which 123 were positive uroculture. *Escherichia coli* was the most isolated bacterium (70%), followed by *Staphylococcus saprophyticus* (13%), *Proteus mirabilis* (8.3%), *Klebsiella* sp. (6.7%), *Pseudomonas aeruginosa* (1.8%) and *Enterococcus* sp. (0.8%). The possible production of beta-lactamase was observed in only two enterobacteria's isolates which presented positive screening for ESBL, but none of them was positive in the confirmation. Even so, it is of great importance the epidemiologic knowledge of bacterial isolates, their sensibility standard to antimicrobials and mechanisms of resistance existent, in order to offer to the patient the conditions for an adequate and effective treatment.

Keywords

ESBL; Urinary infection; *Escherichia coli*; Bacterial resistance

REFERÊNCIAS

1. Esmerino LA, Gonçalves LG, Schelesky ME. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli*. Universidade Estadual de Ponta Grossa Ciências Biológicas da Saúde, Ponta Grossa, MG. 2003;9(1):31-9.
2. Guidoni EBM, Toporovski J. Infecção urária na adolescência. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro. 2001;77(2):165-9.
3. Heilberg IT, Schor N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário - ITU. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, SP. 2003;49(1):109-16.
4. Correia C, et al. Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. *Acta Médica Portuguesa*, Bragança, SP. 2007;20(1):543-9.

5. Coutinho HDM. Infecções urinárias por Enterobactérias. Revista Médica Ana Costa, Paraíba, PB. 2005;10(1):12-8.
6. Oliveira M. Infecção do trato urinário em crianças. Bio Análise, São Paulo, SP. 2004;1(6):23-9.
7. Silva CHP. Bacteriologia: Um texto ilustrado. Rio de Janeiro: Eventos, 1999.
8. Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, Biedenbach DJ; SENTRY Participants Group (Latin America). Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002;44(3):273-80.
9. Poletto KQ, Reis C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, GO. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, MG. 2005; 38(5):11-9.
10. CLSI (CLINICAL AND Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M 100-S20, v. 29, n. 3. Wayne, PA, USA, 2010.
11. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. PLoS Med. 2007;4(12):e329.
12. Mins M, et al. Microbiologia Médica. 2ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1999.
13. Murray PR, et al. Microbiologia Médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
14. Bail L, Ito CAS, Esmerino LA. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia em prática com antimicrobianos. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2006; 38(1):51-6.
15. Pires MC, et al. Prevalência e susceptibilidades 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, Brasília, DF. 2007;40(6): 20-9.
16. Baño JR, et al. Community infections caused by Extended-Spectrum Beta -Lactamase-Producing Escherichia coli. Archives of Internal Medicine, Barcelona. 2008;168(17):1897-902.
17. Sousa M J, Ferreira E S, Conceição GC. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório clínico. Newslab, Salvador, BA. 2004;5(63):152-74.
18. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. J Clin Microbiol. 1999;37(12):4065-70.
19. Mathai D, Jones RN, Pfaller MA; SENTRY Participant Group North America. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 40(3):129-36.
20. Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum beta-lactamases: frequency, risk, factors, and outcomes. Pharmacotherapy. 2002;22(1):14-20.
21. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 2005;56(1):52-9.
22. Rodríguez López FC, Franco-Alvarez de Luna F, Gordillo Urbano RM, Ibarra González A, Casal Román M. Microorganisms isolated from outpatient urine samples and antimicrobial susceptibility over a 12-year period. Rev Esp Quimioter. 2005; 18(2):159-67. [Article in Spanish]
23. Dalmarco EM, Blat SL, Córdova CM. Identificação Laboratorial de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs). Revista Brasileira de Análises Clínicas, [S.l.]. 2006;38(3):171-7.

Correspondência

Débora Menegol

R. Bento Gonçalves, 2125 – Centro
95700-000 – Caxias do Sul, RS

Perfil epidemiológico dos portadores de HIV/AIDS do SAE de Cruz Alta, RS

Epidemiological profile of persons with HIV/AIDS in the SAE of Cruz Alta, RS

Carina Sperotto Librelotto¹

Paulo Ricardo Moreira²

Roger Ceccon³

Tiago Santos Carvalho⁴

Resumo

Este estudo caracteriza o perfil epidemiológico e clínico dos portadores de HIV/AIDS que frequentaram o Serviço de Assistência Especializada (SAE) de Cruz Alta, RS, no período março de 1993 a setembro de 2008, segundo aspectos demográficos, socioeconômicos e comportamental. Um estudo epidemiológico e analítico do tipo longitudinal retrospectivo em 227 pessoas com sorologia positiva anti-HIV foi procedido. Foi avaliado um número significativo de casos do sexo feminino (51,5%), de etnia branca (70%), com faixa etária de 30 aos 39 anos (33%) e residentes em Cruz Alta (88,1%). Este estudo observou, quanto às características sociais, que se tratavam de indivíduos com escolaridade entre cinco e oito anos (41,3%), casados (46,7%) e em situação regular de emprego (41%). Verificou-se ainda que a categoria de exposição com maior número de casos foi a de indivíduos heterossexuais (85%), tendo a toxoplasmose cerebral (16,7%) como a principal doença oportunista. Em 6,1% dos casos, contudo, houve coinfeção com o vírus da hepatite C. Relativamente à terapia antirretroviral, 67,4% dos pacientes estavam sob regime com antirretroviral, no momento da coleta dos dados. Os autores consideram fundamentais para o controle da doença, as intervenções sobre a transmissão do HIV em populações de maior risco como mulheres e indivíduos de baixa escolaridade.

Palavras-chave

Perfil epidemiológico; HIV; AIDS, Cruz Alta

INTRODUÇÃO

No Brasil, na década de 80, foram registrados oficialmente, no estado de São Paulo, os primeiros casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).⁽¹⁾ Em 1983, foram notificados os primeiros casos no Rio Grande do Sul (RS), em indivíduos do sexo masculino tanto homossexuais quanto bissexuais.⁽²⁾ Segundo o Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and World Health Organization (UNAIDS/WHO),⁽³⁾ cerca de 33,2 milhões de pessoas no mundo estão contaminadas pelo vírus da Síndrome da Imunodeficiência Humana (HIV). No Brasil, são aproximadamente 730.000 pessoas infectadas⁽⁴⁾ e, no Rio Grande do Sul, são 37.207 casos.⁽⁵⁾

Vista a princípio como uma epidemia específica de jovens pertencentes a “grupos de risco”, passou a acometer indistintamente os indivíduos, não estando vinculada a sexo e idade. Os fatores que mais contribuíram para a mudança do perfil da epidemia foram o comportamento heterossexual individual e/ou coletivo, a maior inserção da mulher na sociedade, o aumento dos casos nas áreas de interior e o empobrecimento da população.^(6,7)

Como forma de conter a disseminação da doença, o Ministério da Saúde (MS) tem investido em programas de prevenção. Em 1994, foram criados os Serviços de Assistência Especializada (SAE) que prestam assistência ambulatorial aos pacientes portadores de DST/HIV/AIDS em diversas regiões do País. Por meio de uma equipe multidisciplinar, esses serviços têm como objetivo principal prestar atendimento integral e de qualidade à população e contribuir para o estabelecimento de uma rede de referência e contra-referência de serviços no Sistema Único de Saúde. No Rio Grande do Sul, há cerca de 50 SAE's, distribuídos em diversas regiões do estado.⁽⁵⁾ Esses serviços se caracterizam pela presença de equipes multidisciplinares que fornecem assistência clínica e psicossocial aos pacientes, fazem controle e dispensação de antirretrovirais e de preservativos, promovem atividades educativas para adesão à terapia antirretroviral e atividades educativas para prevenção e controle das DST/AIDS, bem como a operacionalização na realização de exames laboratoriais necessários ao monitoramento do tratamento antirretroviral.⁽⁸⁾

Neste contexto, sendo o SAE de Cruz Alta, RS o centro de referência para assistência e tratamento de pacientes

Centro Universitário Feevale – FEEVALE e Serviço Municipal de Assistência Especializada em DST/HIV/AIDS (SAE) de Cruz Alta, RS, Brasil.

¹Biomédica, Pós-Graduada em Análises Clínicas – FEEVALE – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

²Médico, Adjunto ao SAE – Cruz Alta, RS, Brasil.

³Enfermeiro, Docente da Universidade de Cruz Alta – UNICRZ – Cruz Alta, RS, Brasil.

⁴Farmacêutico Bioquímico, Docente da FEEVALE – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

HIV positivos dos municípios da 9ª Coordenadoria Regional de Saúde do RS (9ª CRS-RS), este trabalho teve como objetivo descrever o perfil epidemiológico e clínico das pessoas com sorologia positiva anti-HIV que frequentaram os serviços do SAE de 1993 a 2008, segundo aspectos demográficos, socioeconômicos e de comportamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo epidemiológico e analítico, do tipo longitudinal retrospectivo, desenvolvido no SAE de Cruz Alta (RS) durante o segundo semestre de 2008. O número de indivíduos cadastrados no SAE foi de 454, no período de março de 1993 a setembro de 2008. Porém, a amostra utilizada para este estudo contou com 227 indivíduos, em decorrência de exclusões por óbito, falta e transferência.

Para caracterizar os pacientes faltosos, os seguintes critérios foram definidos: a) pacientes que realizam terapia antirretroviral e que não buscaram medicação durante dois meses consecutivos, no período de um ano; b) pacientes que realizam e não realizaram a terapia antirretroviral e ficaram sem ser avaliados em exames periódicos, durante dois trimestres, no período de um ano; c) pacientes que realizam terapia antirretroviral e não buscaram medicação durante um mês, bem como não realizaram os exames periódicos em um trimestre, no período de um ano.

Os dados foram coletados diretamente do banco de dados do programa Epi Info 3.2.1, sendo a última atualização procedida em outubro de 2008, a partir dos prontuários clínicos.

As variáveis selecionadas para o estudo foram perfil sociodemográfico (sexo, faixa etária, município de residência, cor, escolaridade, estado civil e situação profissional) e perfil clínico (tipo de exposição, doença oportunista, coinfeção e terapia antirretroviral).

A análise estatística dos dados foi realizada pelos programas Epi Info 3.2.1 e SPSS for Windows, versão 12.0 através de análises de frequência.

RESULTADOS

Um total de 227 pessoas com sorologia positiva anti-HIV frequentaram o SAE de Cruz Alta-RS, no período de março de 1993 a setembro de 2008. A Tabela I apresenta as características demográficas dos indivíduos estudados. Mais da metade das pessoas avaliadas era do sexo feminino (n=117; 51,5%), de cor branca (n=159; 70%) e com faixa etária entre 20 e 60 anos. No entanto, havia predomínio de indivíduos jovens com idade oscilando entre 30 a 39 anos (n=75; 33%). Observou-se que 11,5% (n=26) dos indivíduos estudados residiam em outros municípios próximos à cidade de Cruz Alta.

Quanto às características sociais (Tabela II), verificou-se que 41,3% (n=105) dos indivíduos avaliados possuíam tempo de escolaridade entre cinco a oito anos. O estado civil

Tabela I - Características demográficas dos pacientes com HIV/AIDS SAE (Cruz Alta - RS), 1993-2008

Variáveis	Frequência	
	n (227)	%
Sexo		
Feminino	117	51,5
Masculino	110	48,5
Idade (anos)		
< 20	17	7,5
20 - 29	48	21,1
30 - 39	75	33,0
40 - 49	57	25,1
50 - 59	23	10,1
> 60	7	3,1
Residência		
Município de Cruz Alta	200	88,1
Outros municípios	26	11,5
Ignorado	1	0,4
Cor		
Branca	159	70,0
Parda	52	23,0
Negra	16	7,0

Tabela II - Características sociais dos pacientes com HIV/AIDS - SAE (Cruz Alta - RS), 1993-2008

Variáveis	Frequência	
	n (227)	%
Escolaridade (anos)		
Nenhuma	11	4,8
1 - 4	42	18,5
5 - 8	105	41,3
9 - 11	35	15,4
> 12	9	4,0
Ignorado	25	11,0
Estado civil		
Casado/Companheiro	106	46,7
Separado/Divorciado	8	3,5
Solteiro	80	35,2
Viúvo	15	6,6
Ignorado	18	8,0
Situação profissional		
Estudante	17	7,5
Do lar	51	22,5
Desempregado	34	15,0
Empregado	93	41,0
Autônomo	5	2,2
Aposentado	6	2,6
Ignorado	21	9,3

mais frequente foi casado [ou com relação marital estável] em 46,7% (n=106) dos casos. Relativamente à situação profissional, 41% (n=93) dos indivíduos que frequentaram o SAE estavam empregados.

As características associadas aos pacientes com HIV/AIDS estão descritas na Tabela III. No entanto, com relação à opção sexual, 85% (n=193) desses pacientes mantinham relação heterossexual. A taxa de transmissão da doença entre usuários de drogas injetáveis (UDI) foi de 13,2% (n=30) e a taxa de transmissão vertical foi de 6,1% (n=14). A toxoplasmose cerebral foi a doença oportunista com o maior número de casos (n=38; 16,4%). A sífilis foi encontrada em seis indivíduos (2,6%) analisados. Observou-se ainda que, além da sorologia positiva para o HIV, alguns pacientes também apresentavam sorologia positiva para hepatite B (n=6; 2,6%) e hepatite C (n=14; 6,1%). No momento da coleta de dados, 67,4% (n=153) das pessoas estudadas encontravam-se sob terapia antirretroviral.

Tabela III - Características relativas ao HIV/AIDS - SAE (Cruz Alta - RS), 1993-2008

Variáveis	Frequência	
	n (227)	%
Tipo de exposição		
Homossexual	22	9,7
Heterossexual	193	85,0
Bissexual	5	2,2
Ignorado	7	3,1
Usuário de droga injetável	30	13,2
Transmissão vertical	14	6,1
Doenças oportunistas		
Toxoplasmose cerebral	38	16,7
Candidíase de esôfago	23	10,1
Pneumonia	23	10,1
Herpes zoster	16	7,0
Citomegalovirose	12	5,2
Tuberculose	11	4,8
Herpes labial	5	2,2
Coinfecção		
Hepatite C	14	6,1
Hepatite B	6	2,6
Sífilis	6	2,6
Terapia antirretroviral		
Sim	153	67,4
Não	74	32,6

DISCUSSÃO

O presente trabalho permitiu o conhecimento das características dos indivíduos com HIV que frequentaram o SAE de Cruz Alta no período de 1993 a 2008. O estudo foi

realizado com base em dados secundários, estando sujeito a limitações, que podem, em maior ou menor grau, interferir nos resultados apresentados. Como exemplo, pode-se citar a falta de padronização no preenchimento dos questionários e, principalmente, a ausência de funcionários treinados destinados especificamente para a coleta de dados.

Em decorrência da feminização da epidemia, um número significativo de casos em mulheres foi observado. Segundo Brito et al.,⁽⁷⁾ a via de transmissão heterossexual tem contribuído de modo decisivo para o aumento de casos em mulheres, no Brasil. Entre outros fatores, esse aumento tem ocorrido devido a menor capacidade feminina para negociar a prática de sexo seguro com seus parceiros, se tornando, por isso, mais vulnerável à doença.⁽⁹⁾ Além disso, o menor acesso a serviços de saúde reprodutiva, bem como as desigualdades no âmbito político, cultural e socioeconômico são fatores que condicionam fortemente taxas mais elevadas em mulheres.⁽¹⁰⁾

Neste estudo, a faixa etária de indivíduos acometidos variou entre 20 e 60 anos. Alguns estudos revelam que indivíduos mais velhos podem apresentar maiores chances de infecção por HIV por terem sido expostos, por mais tempo, a situações de risco e apresentarem um maior desconhecimento acerca da doença, por pertencerem a uma época onde havia, claramente, menor quantidade de informações preventivas disponíveis.^(11,12)

Vários estudos têm confirmado que indivíduos de baixa renda, nível educacional inferior e menor acesso a informações sobre saúde e assistência médica tornam-se alvos fáceis de doenças potencialmente evitáveis.^(12,13) De acordo com o grau de escolaridade, foi observado que a maioria dos indivíduos que frequentaram o SAE possuía apenas de cinco a oito anos de estudo formal. Estes dados são corroborados por aqueles da pesquisa do CTA de Porto Alegre,⁽¹²⁾ onde o maior percentual de infecção/doença foi encontrado em pacientes com baixo nível de instrução. O aumento no número de casos em indivíduos com menor escolaridade está associado ao fenômeno de pauperização.⁽¹⁴⁾ O grau de escolaridade tem sido uma variável próxima do nível socioeconômico dos indivíduos acometidos.^(15,16) Com relação à situação profissional, encontrou-se maior número de casos em indivíduos empregados, assemelhando-se aos resultados obtidos no estudo de Pechansky et al.,⁽¹²⁾ que também demonstraram uma maior prevalência de soropositividade em indivíduos com situação regular de emprego.

Outro dado avaliado foi o local de residência dos pacientes. Um percentual de 11,5% dos indivíduos residia em municípios próximos à cidade de Cruz Alta. Este dado parece ter apoio em outros estudos que relatam a interiorização da doença que vem se dirigindo para municípios com reduzido tamanho populacional e menor renda *per capita*.⁽¹⁷⁾

Segundo o estado civil, a população que frequentou o SAE de Cruz Alta era composta, em sua maioria, por indivíduos casados. No entanto, em outros estudos, a preponderância foi de indivíduos solteiros.^(18,12) O fato de ter

sido encontrado um maior número de pacientes casados, pode indicar uma mudança de comportamento sexual. É possível que o relacionamento monogâmico esteja sendo substituído por um relacionamento mais flexível com busca por outros parceiros e novas práticas sexuais, tornando mais vulneráveis esses indivíduos casados, à semelhança do que acontece com indivíduos solteiros.⁽¹⁹⁾

Em perspectiva com os dados sobre o estado civil do grupo estudado, observou-se também que a categoria de exposição com maior número de casos foi a heterossexual. A hipótese de heterossexualização da epidemia é corroborada pelo crescimento do número de casos entre homens heterossexuais. Uma justificativa para o aumento no número de casos para esta categoria de exposição em mulheres é a negligência de proteção dos maridos e companheiros.⁽¹⁹⁾ Essa forma de contaminação remete, indubitavelmente, à condição feminina, que, por submissão e/ou dependência em relação a seus parceiros, não tomam a iniciativa para o estabelecimento de medidas preventivas.⁽¹⁴⁾

A categoria dos UDI foi outra que teve taxas mais elevadas. O maior número de casos para a categoria de UDI é normalmente encontrado nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do País, onde a oferta e o acesso às drogas ilícitas apresentam menores dificuldades. A rota de escoamento de drogas por portos e aeroportos e sua facilidade de distribuição, a densidade populacional e os grandes bolsões de pobreza dessas regiões são os principais fatores condicionantes.^(20,13)

Em relação à transmissão vertical, observou-se um número significativo de casos. Estudos têm mostrado um aumento progressivo desta categoria no decorrer do tempo, como consequência direta da maior participação feminina entre os casos de AIDS no Brasil.^(7,15) É possível que este achado reflita a dificuldade de cobertura da demanda do pré-natal pela atenção básica dos municípios.⁽²¹⁾

Entre as doenças oportunistas, a toxoplasmose cerebral teve um maior número de casos, seguida da candidíase esofagiana e pneumonia. Frequentemente, as manifestações avançadas do HIV são observadas em indivíduos com linfócitos CD4 inferior a 200 células/mm³, elevados níveis de carga viral e condições clínicas indicativas de grave imunocomprometimento.⁽²²⁾ Este cenário pode ser definido como AIDS (CDC, 1992)⁽²³⁾ e o aparecimento das doenças oportunistas são intercorrências comuns.

A toxoplasmose cerebral pode ser considerada como uma das principais causas da encefalite focal em pacientes com AIDS.⁽²⁴⁾ Na década de 90, alguns estudos mostraram que, com o aumento no número de casos de HIV, houve um aumento na prevalência de toxoplasmose.⁽²³⁾ Já com o advento da terapia antirretroviral de alta eficiência, observou-se uma mudança no curso da infecção pelo HIV, verificando-se um declínio na prevalência e incidência da toxoplasmose. Vale ressaltar que esta é uma doença com elevada morbimortalidade, se não reconhecida e tratada precocemente.⁽²⁵⁾

Na maioria dos casos, contudo, a doença resulta de reativação de infecção latente, com prevalência variável (3% a 50%), de acordo com a área geográfica, nível cultural, hábitos alimentares, idade e estabelecimento rural ou urbano.^(26,27) Neste estudo, fatores como a área geográfica e o baixo nível socioeconômico contribuíram de forma significativa para o grande número de casos de toxoplasmose cerebral.

Com relação à presença de comorbidades, a coinfeção por hepatite C (HCV) teve maior prevalência. Estudos revelam que, devido à similaridade das rotas de transmissão, a coinfeção HIV/HCV é relativamente frequente, afetando 30% a 50% dos portadores de HIV.⁽²⁸⁾ Entre os principais fatores de risco para a coinfeção HIV/HCV, estão o estado civil (indivíduo separado/ viúvo), uso de drogas ilícitas e hábito de compartilhar seringas.^(29,30)

No presente trabalho, foi possível ainda observar que mais da metade dos indivíduos que frequentaram o SAE de Cruz Alta encontravam-se em tratamento. Segundo o Ministério da Saúde,⁽³¹⁾ o início da terapia antirretroviral é recomendado para pacientes com manifestações clínicas associadas ao HIV, independentemente da contagem de linfócitos CD4 e da carga viral plasmática, e para aqueles com contagem de linfócitos CD4 abaixo de 200 células/mm³, independentemente da presença de sintomas ou da magnitude da carga viral. Entretanto, com a introdução de terapias novas e cada vez mais eficientes, houve uma redução na morbi-mortalidade da epidemia da AIDS no Brasil, como resultado do amplo acesso à terapia antirretroviral, estratégias de prevenção e controle da doença no País.^(32,33,34)

CONCLUSÕES

A presente avaliação permitiu concluir que se trata de uma epidemia com características semelhantes àquelas que ocorre em outras regiões do País, onde há disseminação crescente da doença em municípios de menor tamanho populacional, o que é o caso de Cruz Alta e os demais municípios da 9ª CRS - RS, que contabilizam uma população inferior a 70.000 habitantes.^(35,17,16)

Para controle da doença, são necessárias intervenções voltadas à prevenção da transmissão do HIV, em populações de maior risco, como mulheres e indivíduos de baixa escolaridade. Constatou-se que há necessidade de melhorar o acesso das pessoas com HIV/AIDS aos serviços de saúde de referência, bem como reforçar o acompanhamento e tratamento de pacientes em situação desfavorável, minimizando o impacto negativo da desigualdade social na sobrevida dos doentes. Ademais, este trabalho marca o início da utilização dos dados do SAE de Cruz Alta como forma de enriquecer o sistema de vigilância epidemiológica e possibilitar a realização de novas investigações científicas, bem como permitir ações de assistência, prevenção e promoção de saúde aos portadores de HIV desta região.

Summary

This study describes the epidemiological profile and clinical management of HIV/AIDS who attended the SAE Cruz Alta, in the period March 1993 to September 2008, according to demographic, socioeconomic, and behavior. This is an epidemiological study and analytical type of longitudinal study in 227 subjects with positive serology for HIV. It was found that most subjects were female (51.5%), white (70%), aged between 30 and 39 years (33%) and lived in Cruz Alta (88.1%). Regarding the social characteristics showed that these are individuals with schooling from 5 to 8 years (41.3%), married (46.7%) and in good standing of employment (41%). There was also that the exposure category with the highest number of cases was heterosexual (85%) and cerebral toxoplasmosis (16.7%) was the most frequent opportunistic disease. In 6.1% of the cases were co-infection with hepatitis C. Regarding the use of antiretroviral therapy, 67.4% performed at the time of data collection. The authors concluded that interventions are needed towards the prevention of HIV transmission in high-risk populations such as women and individuals with low education.

Keywords

Epidemiological profile; HIV; AIDS, Cruz Alta

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Serviço Municipal de Assistência Especializada em DST/HIV/AIDS de Cruz Alta, à enfermeira Ângela, à psicóloga Lorilei e às técnicas Dúlcia e Márcia pela cooperação e incentivo que nos proporcionaram as condições para a realização deste trabalho.

APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro Universitário Feevale (FEEVALE), da cidade de Novo Hamburgo, RS, conforme o protocolo número 4.06.03.09.1334.

REFERÊNCIAS

- Marques MCC. Health and power: the political emergence of AIDS/HIV in Brazil. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2002;9 Suppl:41-65. [Article in Portuguese]
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN): <http://www.saude.gov.br/sinanweb>. Capturado em setembro de 2009.
- UNAIDS, WHO. AIDS epidemic update. 2007.
- UNAIDS, WHO. Epidemiological Fact Sheet on HIV and AIDS - Core data on epidemiology and response - Brazil. 2008.
- Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (SES-RS) - <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=organograma&cod=1186>. Capturado em outubro de 2009.
- Santos NJS, Tayra A, Silva SR, Buchalla CM, & Laurenti R. Aids no Estado de São Paulo. As mudanças no perfil da epidemia e perspectivas da vigilância epidemiológica. *Rev Bras Epidemiol* 2002; 5(3):286-310.
- Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(2):207-17. [Article in Portuguese]
- Serviço de Assistência Especializada (SAE): <http://www.aids.gov.br/assistencia/link20.htm>. Capturado em setembro de 2009.
- Parker R, Camargo Jr KR. Poverty and HIV/AIDS: anthropological and sociological aspects. *Cad Saúde Pública* 2000;16 Suppl 1:89-102. [Article in Portuguese]
- Bastos FI, Szwarcwald CL. Aids e pauperização: principais conceitos e evidências empíricas. *Cad Saúde Pública* 2000; 16 Suppl 1:65-76. 7
- Araújo VLB, Brito DMS, Gimeniz MT, Queiroz TA, Tavares CM. Características da Aids na terceira idade em um hospital de referência do Estado do Ceará, Brasil. *Rev Bras Epidemiol*. 2007;10(4):544-5.
- Pechansky F, von Diemen L, Kessler F, De Boni R, Surrat H, Inciardi J. Predictors of HIV seropositive status in non-IV drug users at testing and counseling centers in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(1):266-74. [Article in Portuguese]
- Rodrigues-Júnior AL, de Castilho EA. The AIDS epidemic in Brazil, 1991-2000: space-time description. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(4):312-7. [Article in Portuguese]
- Gabriel R, Barbosa DA, Vianna LA. Epidemiological profile of outpatients with HIV/AIDS at a school hospital - São Paulo city. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2005;13(4):509-13. [Article in Portuguese]
- Fonseca MG, Szwarcwald CL, Bastos FI. A sociodemographic analysis of the AIDS epidemic in Brazil, 1989-1997. *Rev Saude Publica*. 2002;36(6):678-85. [Article in Portuguese]
- Fonseca MGP, Travassos C, Bastos FI, Silva NV & Szwarcwald CL. Distribuição social da aids no Brasil, segundo participação no mercado de trabalho, ocupação e status sócio-econômico dos casos de 1987 a 1998. *Cad. Saúde Pública*.2003; 19(5): 1351-63.
- Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. *Cad Saude Publica*. 2000;16(Suppl 1):7-19. [Article in Portuguese]
- Bassichetto KC, Mesquita F, Zacaro C, Santos EA, Oliveira SM, Veras MASM. & Bergamaschi DP. Perfil epidemiológico dos usuários de um Centro de Testagem e Aconselhamento para DST/HIV da Rede Municipal de São Paulo, com sorologia positiva para o HIV. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(3):302-10.
- Schneider IJ, Ribeiro C, Breda D, Skalski LM, d'Orsi E. Epidemiological profile of the clientele in HIV Testing and Counseling Centers in Santa Catarina State, Brazil, 2005. *Cad Saude Publica*. 2008;24(7):1675-88.
- Barbosa Júnior A, Szwarcwald CL, Pascom AR, Souza Júnior PB. Trends in the AIDS epidemic in groups at highest risk in Brazil, 1980-2004. *Cad Saude Publica*. 2009;25(4):727-3
- Araújo LC, Fernandes RCSC, Coelho MCP & Acosta EM. Prevalência da infecção pelo HIV na demanda atendida no Centro de Testagem e Aconselhamento da Cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, 2001-2002. *Epidemiol. Serv. Saude*. 2005; 14(2): 85-90.
- Nobre V, Braga E, Rayes A, Serufo JC, Godoy P, Nunes N, Antunes CM, Lambertucci JR. Opportunistic infections in patients with aids admitted to an university hospital of the Southeast of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(2):69-74.
- Passos LN, Araújo Filho OF, Andrade Junior HF. Toxoplasma encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42(3):141-5.
- Centers for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *M.M.W.R*.1992;41(RR-17): 1-19.
- Ramírez MLG, Alvarado VV, Gutierrez GV, González OJ, Cosio CG, Sandoval MV. Prevalence of IgG and IgM anti-Toxoplasma antibodies in patients with HIV and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(6):465-7.
- Contini C. Clinical and diagnostic management of toxoplasmosis in the immunocompromised patient. *Parassitologia*. 2008;50(1-2):45-50.

26. Borges AS, Figueiredo JF. Detection of anti-Toxoplasma gondii IgG, IgM and IgA immunoglobulins in the serum, cerebrospinal fluid and saliva of patients with acquired immunodeficiency syndrome and neurotoxoplasmosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004; 62(4):1033-7.
27. Spalding SM, Amendoeira MR, Klein CH, Ribeiro C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(2): 173-7.
28. Corvino SM, Henriques RMS, Grotto RMT & Pardini MIMC. Coinfecção HIV/HCV em pacientes de Botucatu e região. *Rev Bras Epidemiol*. 2007;10(4):537-43.
29. Silva ACM, Barone AA. Risk factors for HIV infection among patients infected with hepatitis C virus. *Rev Saude Publica*. 2006; 40(3):482-8. [Article in Portuguese]
30. Marchesini AM, Prá-Baldi ZP, Mesquita F, Bueno R, Buchalla CM. Hepatitis B and C among injecting drug users living with HIV in São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2007;41 Suppl 2:57-63. [Article in Portuguese]
31. Brasil; Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV: 2005/2006. Brasília, Ministério da Saúde, 2007.
32. Dourado I, Veras MA, Barreira D, de Brito AM. AIDS epidemic trends after the introduction of antiretroviral therapy in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2006;40 Suppl:9-17. [Article in Portuguese]
33. Farias N & Cesar CLG. Tendências da morbi-mortalidade por aids e condições socioeconômicas no Município de São Paulo, 1994 a 2001. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(4):489-502.
34. Helena ETS, Mafra ML & Simes M. Fatores associados à sobrevida de pessoas vivendo com aids no Município de Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brasil, 1997-2004. *Epidemiol. Serv. Saude*, 18(1):45-53,2009.
35. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2009/POP2009_DOU.pdf. Capturado em outubro de 2009.

Correspondência

Prof. M.Sc. Tiago Santos Carvalho
FEEVALE – Instituto de Ciências da Saúde
Laboratório de Biomedicina
Campus II – RS 239, 2755
Novo Hamburgo, RS
Tel.: (51) 3586 8800 ramal 8983
tiagocarvalho@feevale.br

Ocorrência de parasitoses intestinais em alunos de 6 a 12 anos em escolas de ensino fundamental na cidade de Alfenas, MG

Occurrence of intestinal parasites in students 6 to 12 years in elementary schools in the city of Alfenas, MG

Alexandre Ponciano¹

Alissa Paula Ruela Borges²

Heverson Augusto Muniz²

Josiane de Souza Garcia²

Julio Cesar Sanches Peret²

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de parasitoses em escolares de 6 a 12 anos do sistema público de ensino de Alfenas, MG. Para isso foram escolhidas duas escolas de ensino fundamental, uma localizada no centro da cidade e outra no bairro de Gaspar Lopes. Foi passado um questionário para os alunos, e logo após foram realizadas palestras educativas sobre o tema "parasitoses". Foram recolhidas amostras fecais das crianças com o uso do PARATEST® e estas amostras foram analisadas pelo método de Ritchie modificado. De 171 amostras analisadas, 31 foram positivas para pelo menos um tipo de parasita, o que representa 18,12% de grau de positividade, porcentagem baixa em se comparando trabalhos de outros autores, realizados em outras cidades. A *Entamoeba coli* e a *Giardia lamblia* foram os parasitos mais encontrados (14,03 e 5,85%, respectivamente), fato este que pode ter relações com o hábito de tomar água da torneira, relatado por 25% das crianças. Percebeu-se, pela aplicação do questionário, que as crianças são cientes de bons hábitos de higiene. A abordagem do tema "parasitoses" pelas professoras existe nas escolas avaliadas, porém, precisa ser mais incentivado.

Palavras-chave

PARATEST®; Parasitas; Crianças

INTRODUÇÃO

As parasitoses, apesar de todo o avanço científico e tecnológico atual, ainda implicam em importante objeto de estudo, principalmente nos países em vias de desenvolvimento, nos quais até hoje são observadas precárias condições higiênico-sanitárias e de baixa qualidade de vida da população. No Brasil, as enteroparasitoses estão entre os principais problemas de saúde pública, principalmente em crianças.⁽¹⁾

São doenças que acometem homens e animais com maior frequência em países tropicais, favorecidas pelas condições climáticas. No Brasil, à semelhança de outros países em desenvolvimento, sua disseminação é ainda aumentada por condições socioeconômicas, principalmente pelo baixo nível de educação e falta de educação sanitária. Em numerosas localidades, as parasitoses têm caráter endêmico. Os parasitas, por mecanismos diversos, prejudicam a saúde do hospedeiro, reduzindo a resistência do organismo, predispõem a outras infecções e, na população infantil, particularmente, o parasitismo pode constituir-se num fator agravante da subnutrição. O baixo rendimento de aprendizagem, entre os escolares, assim

como de trabalho, entre os operários, pode ser consequência da indisposição natural advinda de moléstias parasitárias.⁽²⁾

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou, em 1997, que existiam, em todo o mundo, cerca de um bilhão de indivíduos infectados por *Ascaris lumbricoides*, entre 800 e 900 milhões albergando *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos, 400 milhões infectados por *Entamoeba histolytica* e 200 milhões por *Giardia lamblia*.⁽³⁾

Os parasitos intestinais mais frequentemente encontrados em seres humanos são: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e os ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*); e, dentre os protozoários, destacam-se a *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Os danos que os parasitos intestinais podem causar a seus portadores, principalmente em crianças, são: a obstrução intestinal (*Ascaris lumbricoides*), a desnutrição (*Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*), a anemia por deficiência de ferro (ancilostomídeos) e quadros de diarreia e má absorção de nutrientes (*Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*), sendo que as manifestações clínicas são usualmente proporcionais à carga parasitária albergada pelo indivíduo.⁽⁴⁾

Pesquisa realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas – Alfenas, MG, Brasil.

¹Professor da disciplina Parasitologia Clínica e Humana na Universidade José do Rosário Vellano; Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas e mestrando em Ciência Animal – Unifenas – Alfenas, MG, Brasil.

²Graduandos do Curso de Farmácia – Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas – Alfenas, MG, Brasil.

Um dos levantamentos multicêntricos das parasitoses intestinais realizados no País revelou uma prevalência de 28,5% em escolares com idade de 7 a 14 anos.⁽¹⁾

Estas parasitoses têm ocorrência maior entre crianças devido ao fato destas brincarem no chão e levarem as mãos sujas à boca e, muitas vezes, sem que os pais e responsáveis percebam, alimentam-se sem lavar as mãos. O sistema imunológico das crianças está menos apto a reconhecer e combater estes agentes patogênicos. Além disso, a desnutrição, comum nas populações de baixa renda, diminui a capacidade de resposta orgânica e a capacidade de resposta a tratamentos medicamentosos.

A realização do exame parasitológico das fezes consiste num importante procedimento em laboratórios de análises clínicas, pois podem confirmar suspeitas clínicas de parasitoses intestinais, doenças que são causas de mortalidade e morbidade em países subdesenvolvidos.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos na Universidade José do Rosário Vellano obtendo um parecer favorável, sob registro de nº 24/2009.

Objetivos

- Orientar as crianças a respeito das parasitoses intestinais e suas profilaxias;
- Verificar se ocorre abordagem do assunto nas escolas;
- Averiguar a incidência atual de parasitoses na população estudada e comparar os resultados das duas escolas, já que uma atende exclusivamente a zona urbana e outra atende crianças da zona urbana e rural;
- Traçar o perfil higiênico-sanitário das crianças e de suas famílias por meio da análise das respostas dadas pelas crianças a um questionário aplicado de forma individual com questões de múltipla escolha.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas duas escolas da cidade de Alfenas, MG. Inicialmente, foram realizadas visitas aplicando-se questionários individualmente às crianças, visando estabelecer o perfil higiênico-sanitário da população e estabelecer relações dos resultados com o meio ambiente e com fatores predisponentes às parasitoses, tais como saneamento básico, hábitos alimentares e pessoais, além do contato com animais domésticos. Após a aplicação, realizaram-se palestras educativas com o propósito de alertar sobre os riscos de adquirir parasitoses e sua prevenção.

Foi proposto às crianças que trouxessem amostras para análises. Em relação à orientação da coleta foi utilizado material explicativo sobre a forma correta visto que o frasco de utilização foi do tipo PARATEST®.

As 171 amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Clínica situado no bloco 13 (Curso de Farmácia/campus Alfenas - Unifenas) e armazenadas de 2º

a 8°C. Utilizou-se a metodologia de Ritchie, porém adaptado ao uso do PARATEST®. Analisou-se o sedimento em triplicata ao microscópio, utilizando-se como corante o lugol, e efetuou-se a visualização na objetiva de 10X e confirmação na de 40X.

RESULTADOS

Resultado geral

Foram analisadas amostras de 171 crianças, sendo que 80 dessas amostras foram da escola da Zona Rural (escola A) e 91 da escola do centro de Alfenas, MG (escola B). Das 171 amostras analisadas, 31 foram positivas para pelo menos um tipo de parasita intestinal, sendo que, dessas 31 amostras, 20 eram provenientes da escola A e 11 eram da escola B. Essas 31 amostras representam um total de 18,12% de casos positivos para algum tipo de parasita (Gráfico1).

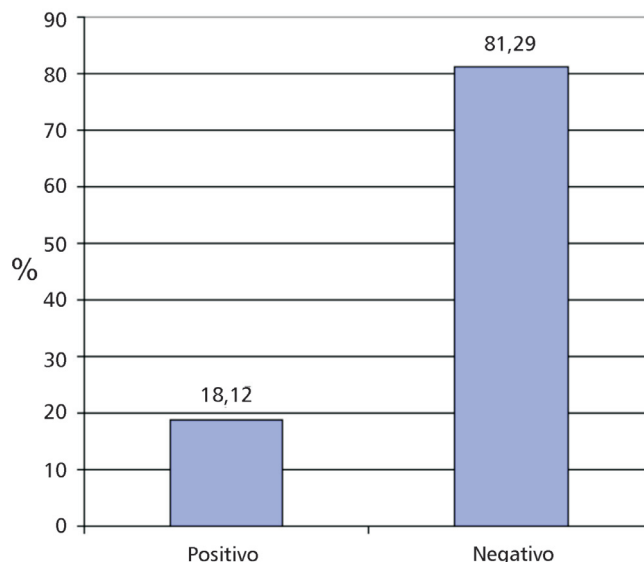


Gráfico 1. Percentual de casos positivos nas 171 amostras analisadas.

Dentre as 171 amostras analisadas, 87 eram do sexo masculino e 84 eram do sexo feminino. O sexo masculino apresentou positividade de 23%, enquanto o sexo feminino apresentou uma positividade de 13,09% (Tabela1).

Tabela 1- Percentual de casos positivos das 171 amostras segundo o sexo

Sexo	Número de amostras analisadas	Número de amostras positivas	Percentual de positividade (%)
Masculino	87	20	(23)
Feminino	84	11	(13,09)

Em relação ao poliparasitismo, foram encontrados 8 casos de poliparasitismo e 23 casos de monoparasitismo. Os casos de poliparasitismo representaram 25,81% dos casos positivos. Todos os casos de poliparasitismo foram associação de *Entamoeba coli* com *Giardia lamblia* (sete

casos) ou com *Blastocystis hominis* (um caso), ou seja, todos os casos foram na forma de diparasitismo (Tabela 2).

Tabela 2 - Percentual de monoparasitismo e poliparasitismo das 31 amostras positivas

Parasitismo	Número de casos positivos	Percentual de positivos	
		Em relação ao total (%)	Em relação ao número de casos positivos (%)
Monoparasitismo	23	(74,20)	(13,45)
Poliparasitismo	8	(25,80)	(4,67)

Foram encontrados, nas amostras analisadas, 24 casos de infecção por *Entamoeba coli*, sendo que 16 destes casos foram monoparasitismo e oito casos associados a outro parasita; dez infectados com *Giardia lamblia*, sendo três sob a forma de monoparasitismo e sete sob poliparasitismo; dois casos de *Blastocystis hominis*, sendo um associado a outro parasita; dois casos de monoparasitismo por *Endolimax nana* e um caso de monoparasitismo por *Taenia sp* (Tabela 3).

Tabela 3 - Ocorrência dos parasitos em relação à totalidade da população estudada, e em relação ao número de casos positivos

Parasito	Nº absoluto	Ocorrência na população estudada (%)	Ocorrência na população estudada (%)
<i>Entamoeba coli</i>	24	14,03	77,42
<i>Giardia lamblia</i>	10	5,85	32,26
<i>Blastocystis hominis</i>	2	1,17	6,45
<i>Endolimax nana</i>	2	1,17	6,45
<i>Taenia sp.</i>	1	0,58	3,23

Resultados por escola

Na escola A, da qual foram analisadas 80 amostras, 20 foram positivas para, pelo menos, um tipo de parasita, ou seja, 25% de positividade para a escola A.

Na escola B, da qual foram analisadas 91 amostras, 11 foram positivas para, pelo menos, um tipo de parasita intestinal, correspondendo a 12,08% de positividade para a escola B (Tabela 4).

Em relação ao sexo foi um total de 42 amostras do sexo masculino e 38 do sexo feminino na escola A. Dos 20 casos positivos, 13 eram do sexo masculino e sete eram do sexo feminino. E na escola B foram 45 amostras do sexo masculino e 46 do sexo feminino, onde foram encontrados 11 casos positivos, dos quais sete eram do sexo masculino e quatro do feminino (Tabela 4).

Em relação ao mono e poliparasitismo, na escola A foram confirmados 14 casos de monoparasitismo e seis

Tabela 4 - Percentual e números de casos positivos por sexo e números de amostras analisadas por escola

Escola	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas	Percentual de positividade (%)	Casos positivos masculinos	Casos positivos femininos
Escola A	80	20	(25)	13 (em 42)	7 (em 38)
Escola B	91	11	(12,08)	7 (em 45)	4 (em 46)

casos de poliparasitismo, sendo que, desses seis casos de poliparasitismo, cinco eram associação de *Entamoeba coli* com *Giardia lamblia* e um era de *Entamoeba coli* com *Blastocystis hominis*. E na escola B, foram nove casos de monoparasitismo e dois de poliparasitismo, dentre 11 casos positivos. Os dois casos de poliparasitismo foram associação de *Entamoeba coli* com *Giardia lamblia* (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de casos com mono e poliparasitismo das amostras positivas por escola

Escola	Casos positivos	Mono-parasitismo	Poli-parasitismo	Associações
Escola A	20	14	6	<i>E.coli</i> + <i>G. lamblia</i> <i>E.coli</i> + <i>B. hominis</i>
Escola B	11	9	2	<i>E.coli</i> + <i>B. hominis</i>

Análise do conhecimento sobre parasitoses e o grau de exposição a possíveis focos

Para avaliar o conhecimento sobre parasitoses, bem como o grau de exposição, foi elaborado um questionário que abordava o assunto. A entrevista ocorreu antes da palestra, de forma oral e individual, onde a criança respondeu diretamente ao entrevistador (Tabela 6).

Tabela 6 - Percentual das respostas ao questionário respondido pelos alunos das escolas A e B durante a entrevista

Pergunta	Resposta	Total	(%)
Você sabe o que é parasitose?	Sim	59	(32,5)
	Não	123	(67,5)
Você sabe como adquire?	Sim	47	(25,8)
	Não	135	(74,2)
Você já teve alguma parasitose?	Sim	43	(23,6)
	Não	139	(76,4)
Você tem animal de estimação?	Sim	104	(57,8)
	Não	67	(35,2)
O animal frequenta lugares públicos?	Sim	45	(43,3)
	Não	59	(56,8)
Você já fez exame de fezes?	Sim	104	(57,1)
	Não	78	(42,9)
Já tomou algum medicamento para verminose?	Sim	70	(38,5)
	Não	112	(61,5)
O assunto verminose foi falado em sua sala por sua professora ou outra pessoa?	Sim	93	(51,1)
	Não	89	(49,9)
Você lava as mãos antes das refeições?	Sempre	140	(77,0)
	Algumas vezes	33	(18,2)
	Nunca	9	(4,95)
Você lava as mãos depois de ir ao banheiro?	Sempre	160	(87,9)
	Algumas vezes	18	(9,8)
	Nunca	4	(2,3)
Você ou sua mãe tem costume de lavar frutas e verduras antes de comer?	Sempre	170	(93,3)
	Algumas vezes		(2,8)
	Nunca		(3,9)
Em sua casa você bebe água	Filtrada	129	(70,88)
	Torneira	46	(25,27)
	Mineral	7	(3,85)
Já tomou algum medicamento para verminose?		32,55%	(67,45)

DISCUSSÃO

O exame parasitológico de fezes, na prática médica, é de fundamental importância para o diagnóstico das parasitoses intestinais, devendo ser rotina nos serviços médicos, pois as enteroparasitoses são muito frequentes em nosso meio. Não existe um método capaz de evidenciar todos os ovos e larvas de helmintos e cistos ou trofozoítos de protozoários intestinais. Alguns métodos, entretanto, são mais usados rotineiramente, pois são capazes de evidenciar maior número de formas parasitárias, além de serem de execução fácil e barata.

Quando comparado a estudos feitos com alunos provenientes de escolas públicas de outras cidades do Brasil, a ocorrência de parasitoses em Alfenas (18,71%) mostrou-se relativamente baixa. Encontraram em crianças de Natal (RN) 76,0% de prevalência, em Salvador (BA) 66,1%, e em Sero-pédica (RJ) 33,88%.

A grande variação de percentual, de acordo com Silveira,⁽⁵⁾ pode ser influenciada pelas características ambientais, socioeconômicas e de saneamento básico de cada município.

A utilização de amostra única pode ser um fator também importante, pois um exame parasitológico apresenta boa especificidade e a sua sensibilidade alcança até 95% quando utilizado no mínimo três amostras.

De acordo com Neves,⁽⁶⁾ esse resultado baixo não elimina a necessidade de adoção de medidas de controle e combate às parasitoses intestinais.

Observou-se uma alta frequência de *Entamoeba coli* (77,42% dos casos positivos) e *Giardia lamblia* (32,26% dos casos positivos) evidenciando a necessidade da adoção de medidas de cuidado com a água ingerida e utilizada no preparo dos alimentos, tendo em vista que a principal via de transmissão desses parasitas é a água, o que fortalece a importância da implementação do sistema de tratamento de esgoto na cidade. O questionário fortalece essa questão, onde a maioria dos entrevistados confirma a utilização de água filtrada, a lavagem das mãos após ir ao banheiro e a lavagem de frutas e verduras.

Komagome et al.⁽⁷⁾ relatam que 65,4% das crianças tinham conhecimento do diagnóstico realizado através do exame parasitológico das fezes, valor bem próximo deste trabalho com relação à pergunta "Você já fez exame de fezes", onde 57,1% responderam de forma positiva.

De acordo com os dados da Tabela 1, crianças do sexo masculino apresentaram maior percentual de infectividade por parasitos. A maior prevalência da infecção entre as crianças do gênero masculino pode estar relacionada ao fato de que os meninos ficam mais expostos ao ambiente peridomiciliar durante as atividades de lazer.⁽⁸⁾ A maioria das crianças do sexo masculino de um estudo realizado por Komagome et al.⁽⁷⁾ teve como local disponível para as suas brincadeiras as ruas e/ou quadras esportivas sem pavimentação.

A escola A, que atende em maior proporção crianças da zona rural, apresentou um percentual de positividade de 25%, enquanto a escola B, que atende exclusivamente crianças da zona urbana, apresentou um percentual de positividade de 12,08%.

Das crianças entrevistadas, aproximadamente 70% não sabiam o que é ou como se adquire parasitoses. Apesar de algumas turmas serem de alunos de 6 a 7 anos de idade, acredita-se que o trabalho tenha atingido um de seus principais objetivos, que foi justamente orientar ensinando ou aprimorando os conhecimentos dos alunos a respeito das doenças parasitárias.

Pelo fato de a entrevista ter sido feita com as próprias crianças, não foi possível descartar a presença de alguns dados discrepantes no questionário, como, por exemplo, 76,4% disseram não terem tido parasitose, porém aproximadamente 70% delas não sabiam o que era tal doença. O que pode ter interferido também nesses valores foi o fato de não conter, no questionário, a opção "não sei" na pergunta nº 3, pois pode ter ocorrido de muitas dessas crianças que não sabiam o que era a doença terem respondido que não tiveram uma parasitose pelo desconhecimento do assunto.

A maior parte das crianças relatou possuir animais domésticos, principalmente cachorros e gatos. Esses animais, se não cuidados adequadamente, transmitem diversas zoonoses. Foi relatado ainda que a maioria desses animais frequenta lugares públicos, o que é mais um agravante, pois estes animais entram em contato com outros animais nas ruas. Segundo Thadei,⁽⁹⁾ as pulgas, frequentes em animais de rua, podem servir de vetores para certas parasitoses intestinais. Os animais domésticos, ao entrarem em contato com os não domesticados, podem contrair parasitoses através das pulgas, e com isso se tornarem possíveis vetores destas doenças dentro de suas residências, infectando finalmente o homem.

De acordo com a Tabela 6, pode-se perceber ainda que o exame de fezes tem se tornado cada vez mais valorizado, visto que grande parte das crianças respondeu já ter feito o EPF.

Em relação aos hábitos de higiene percebeu-se diante dos resultados que as crianças os conhecem, ou seja, sabem que é necessário lavar as mãos ao se alimentarem e depois de ir ao banheiro, além de lavarem os alimentos. O fato de a maioria das crianças responder positivamente as perguntas feitas na parte do questionário relacionado a hábitos de higiene significa que, mesmo que elas não sigam esses hábitos corretamente e sempre, elas sabem que eles existem e são necessários.

Aproximadamente 71% das crianças disseram que em casa tomam água filtrada, sendo que o ideal seria a ingestão de água tratada. Pode-se até relacionar o fato de que uma parcela das crianças relatou que ingere água da torneira e isso pode ter contribuído para a incidência relativamente maior de *Entamoeba coli* e *Giardia lamblia*, já que os cistos de ambos os parasitas são resistentes às concentrações

de cloro usadas habitualmente no tratamento da água para o abastecimento público, o que favorece a veiculação hídrica destes parasitas, segundo Silva et al.⁽¹⁰⁾

Os casos positivos foram emitidos laudos e encaminhados aos Postos de Saúde, localizados nas proximidades das escolas.

CONCLUSÃO

A ocorrência de parasitoses na população estudada foi relativamente baixa se comparada com outros autores, porém apresentou-se uma elevada incidência de protozoários que são veiculados na maioria das vezes por água, sugerindo a deficiência no tratamento do sistema de esgoto.

Nos resultados dos questionários observou-se que as crianças estão cientes dos hábitos corretos de higiene, porém não se sabe em qual proporção esses hábitos são utilizados no dia-a-dia.

Percebeu-se que o assunto parasitoses tem sido abordado nas escolas pelas professoras, segundo relatos das crianças, porém, um aumento da abordagem seria ideal, visto que apenas 50% das crianças relataram que o assunto já foi tratado em sala de aula.

A técnica de Ritchie apresenta uma satisfatória sensibilidade. Entretanto, novos estudos devem ser realizados no sentido de aumentar o número de coletas, visto que foi efetuada apenas uma coleta e até mesmo a utilização de pelo menos duas metodologias para eficiência no diagnóstico e/ou possíveis comparações de metodologias.

Summary

*The aim of this work was to evaluate the occurrence of parasitic infections in schoolchildren between 6 and 12 years of public education in Alfenas, MG. That were chosen for two elementary schools, one located in the city center and another in the neighborhood of Gaspar Lopes. Was passed a questionnaire to students, and soon after attended educational lectures on "parasites". We collected fecal samples of children with the use of PARATEST® and these samples were analyzed by the modified Ritchie. Of 171 samples analyzed, 31 were positive for at least one type of parasite, which represents 18.12% of degree of positivity, low percentage in comparison to the work of other authors, carried out in other cities. The *Entamoeba coli* and *Giardia lamblia* was the parasite most commonly found (14.03 and 5.85% respectively), a fact that may have links with the habit of drinking tap water, reported by 25% of children. It was noticed by the questionnaire, the children are aware of good hygiene habits. The theme "parasites" by teachers in schools is assessed, however, must be further encouraged.*

Keywords

PARATEST®; Parasites; Children

REFERÊNCIAS

1. Alves MS, et al. Incidência de parasitoses em escolares da Escola Municipal de Educação Infantil Sant'Ana Itatiaia Juiz de Fora - MG e sua possível correlação com a qualidade da água para consumo. Rev Bras Anál Clín. Rio de Janeiro: 1998.
2. Araújo CF, Fernández CL. Prevalência de parasitoses intestinais na cidade de Eirunepé, Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(1):69.
3. WHO - World Health Organization. The world health report WHO. Geneve: 1997.
4. Rey L. Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856p
5. Silva AA. Incidência de Blastocystis hominis na população da cidade do Rio de Janeiro, RJ. Newslab. 2006;76:86-96.
6. Neves DP. Parasitologia Dinâmica. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2006.
7. Komagome, et al. Fatores de risco para infecção parasitária intestinal em crianças e funcionários de creche. Ciência, Cuidado e Saúde (Maringá). 2007;6(2):442-7.
8. Faleiros JM, Gallo G, Silva MM, Rafal R, Nasorri AR, Pipino LF, et al. Ocorrência de enteroparasitoses em alunos da escola pública de ensino fundamental do município de Catanduva (São Paulo, Brasil). Rev Inst Adolfo Lutz. 2004;63:243-7.
9. Thadei, Carmello. Pulgas em geral. São Paulo: 2008. Disponível em www.saudeanimal.com.br. Acesso em 03.11.2009.
10. Silva JO, Capuanol DM, Takayanagui OM; Giacometti Júnior E. Enteroparasitoses e oncomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Rev Bras Epidemiol. 2005;8(4):385-92.

Correspondência

Alexandre Ponciano

Rua Gabriel Moura Leite, 431 – Centro

37130-000 – Alfenas, MG

Tel.: (35) 3299-3128 / 32911-1737

AGRADECIMENTOS

À Universidade José do Rosário Vellano pelo apoio à pesquisa.

Viabilidade de *Candida albicans* estocada em água destilada estéril a -20°C

Candida albicans viability store at -20°C in sterile distilled water

Antonella Souza Mattei
Cecília Bittencourt Severo
Luciana da Silva Guazzeli
Flávio de Mattos Oliveira
Luiz Carlos Severo

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o método de conservação de leveduras do gênero *Candida* estocadas em água destilada estéril a baixas temperaturas. Utilizaram-se 240 cepas de *Candida albicans* estocadas em água destilada estéril a -20°C, durante o período de seis meses a oito anos. As cepas foram subcultivadas em duplicata em ágar de Sabouraud e incubadas a 35°C, por 96 horas. Houve recuperação de 68,4% das 240 leveduras estocadas, sendo que a maior porcentagem de viabilidade foi referente ao período de seis meses e a menor foi de três anos. O método utilizado para o armazenamento das leveduras possui vantagens quando comparado a outros, além de ocupar pouco espaço, é facilmente executado e possui baixo custo.

Palavras-chave

Leveduras; Coleção de cultura; Manutenção; Congelamento.

INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, as infecções fúngicas têm crescido significativamente em importância na prática médica. Essa situação é decorrente do aumento do número de indivíduos imunocomprometidos na população humana que, por se apresentarem criticamente enfermos ou submetidos a procedimentos invasivos, tornaram-se extremamente suscetíveis a doenças por fungos oportunistas.⁽¹⁾

Neste contexto, *Candida* spp é considerada o agente de infecção fúngica sistêmica mais prevalente, representando cerca de 8% a 10% de todos casos. Indubitavelmente, o aumento de 500% na taxa de infecção fúngica hospitalar, observado em várias partes do mundo, a partir da década de 80, impactou diretamente as taxas de candidíase invasiva, gerando, da mesma forma, aumentos nos percentuais de infecção nosocomial por membros desse gênero. Nos últimos 10 anos, também numerosos estudos têm documentado o aumento da incidência de infecção por *Candida* spp no Brasil.⁽²⁻⁵⁾

Como o aumento na frequência de isolamentos de fungos oportunistas foi acompanhado do aumento nas taxas de mortalidade e resistência aos antifúngicos, a pesquisa micológica passou a ter maior destaque dentro das doenças infecciosas. Consequentemente, a manutenção de isolados clínicos em coleções de cultura de laboratórios de micologia médica passou a ser considerada de fundamental importância para estudos retrospectivos e prospectivos associados à morfologia, fisiologia, biologia molecular e genética, suscetibilidade a drogas antifúngicas e epidemiologia desses

agentes. No entanto, a qualidade do material preservado deve ser assegurada. Métodos de conservação devem, então, garantir, por longos períodos de tempo, a pureza, a viabilidade e a estabilidade dos isolados.⁽⁶⁻⁸⁾ Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis (Tabela 1), mas o custo financeiro, a complexidade técnica e o comportamento idiosincrático das espécies fúngicas frente a cada método de conservação condicionam a escolha.⁽⁸⁾

Dentre as metodologias de preservação menos complexas e pouco onerosas estão aquelas que utilizam fungos em cultura. A conservação de fungos em meios sólidos requer que certos critérios técnicos sejam levados em consideração, pois os nutrientes podem ser consumidos totalmente, exaurindo os meios e acarretando a diminuição da viabilidade dos organismos estocados. A fim de se evitarem rupturas do *status* de saúde dos isolados causadas pelo esgotamento e ressecamento desses meios, subcultivos periódicos são normalmente necessários. No entanto, efeitos deletéreos sobre a patogenicidade e a virulência fúngica podem ocorrer em função das passagens sucessivas para novos meios. A contaminação por ácaros e fungos ambientais ainda pode ocorrer em coleções de cultura mantidas em tubos de ensaio com meios sólidos.^(6,9)

Na rotina dos laboratórios de análises clínicas, os métodos que contêm meios sólidos como matriz normalmente mais utilizados são subcultivos sucessivos em ágar, óleo mineral estéril e água destilada estéril. Outros métodos como a liofilização e a criopreservação em nitrogênio líquido têm sido também utilizados. De maneira geral, tais métodos apresentam melhor rendimento do que aqueles que empregam

¹Aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Doutor em Ciências Pneumológicas/UFRGS, Laboratório de Micologia, Hospital Santa Rita, Santa Casa-Complexo Hospitalar, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Professor Associado da Faculdade de Medicina, UFRGS, Pesquisador 1B CNPq, Porto Alegre, RS, Brasil.

Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita, Santa Casa – Complexo Hospitalar, Porto Alegre, RS, Brasil.

Tabela 1 - Métodos de preservação de fungos filamentosos e leveduriformes mais frequentemente descritos na literatura.

Método de preservação	Microorganismo estudado (n)	Tempo de conservação	Viabilidade (%)	Referência
Caldo BHI adicionado de glicerol a -80°C	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Trichosporon</i> (35)	6 meses	100%	Cavalcanti et al ⁽⁶⁾
Caldo BHI adicionado de glicerol a -20°C	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Rhodotorula</i> (328)	3 a 4 anos	99 a 90%	Silva et al ⁽⁷⁾
Salina a 25°C	<i>Malassezia pachydermatis</i> (48)	6 meses	39,6%	Girão et al ⁽⁸⁾
Água destilada estéril a 25°C	Diferentes gêneros de fungos filamentosos (43)	12 meses	100%	Diogo et al ⁽⁹⁾
Água destilada a 4°C	Diferentes gêneros de fungos filamentosos (26)	2 anos	100%	Bueno e Gallardo ⁽¹⁰⁾
Caldo BHI adicionado de glicerol a -20°C	<i>Cryptococcus neoformans</i> (30)	4 meses	100%	Nery et al ⁽¹¹⁾
Água destilada estéril a 25°C	Diferentes gêneros de leveduras (34)	6, 12, 18, 24 meses	100 a 60%	Rodrigues et al ⁽¹²⁾

BHI; Infusão Cérebro-Coração

ágares, pois a pureza e a estabilidade morfofisiológica alcançam níveis mais elevados, já que o metabolismo celular é drasticamente diminuído. Contudo, estes, por serem mais sofisticados, são pouco acessíveis à maioria dos laboratórios de micologia clínica. Não obstante haver vários métodos de preservação, não há uma técnica universal para todos os tipos de fungos e que, ao mesmo tempo, atendam parâmetros de qualidade e custo. Assim, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de se buscar a melhor forma de preservação desses micro-organismos; por isso, diferentes técnicas têm sido desenvolvidas e diferentes resultados têm sido obtidos.⁽⁶⁻¹³⁾

A presente pesquisa objetivou avaliar o método de conservação de leveduras do gênero *Candida* estocadas em água destilada estéril a -20°C, tendo em vista ser um método de fácil execução e apresentar custos aceitáveis, bem como ser adequado ao trabalho em laboratórios clínicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas 240 amostras clínicas de *Candida albicans* de origem humana, provenientes de diversos sítios anatômicos e pertencentes à Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre, RS.

Consecutivamente à identificação pelo sistema comercial ID 32C da Biomérieux®, conforme instruções do fabricante, os isolados clínicos de *C. albicans* foram preservados como fragmentos de cultura suspensos em 5 mL de água destilada estéril, acondicionados em tubos Eppendorf, à temperatura de -20°C, em freezer, por um período de seis meses a oito anos.

Para a avaliação da viabilidade e estabilidade, as amostras foram subcultivadas, em duplicata, em ágar de Sabouraud dextrosado e incubadas a 35°C, por 96 horas, com visualização diária do crescimento. A confirmação da identidade das amostras viáveis foi procedida em equipamento ID 32C da Biomérieux®, como mencionado anteriormente.

RESULTADOS

Das 240 amostras de levedura testadas, 68,4% foram recuperadas após longos períodos de preservação em água

destilada. O maior percentual de viabilidade foi observado no período de seis meses de conservação. Neste, todas as amostras estudadas foram recuperadas. No entanto, a menor taxa de viabilidade (41,7%) foi observada no período de preservação de três anos. Na Tabela 2, são apresentados os resultados obtidos nos ensaios.

Tabela 2 - Relação do número de leveduras examinadas com o número de amostras viáveis, após o período de 6 meses a 8 anos

Tempo de estocagem	Amostras analisadas	Amostras viáveis
8 anos	7	5 (71,5%)
7 anos	5	4 (80%)
6 anos	5	4 (80%)
5 anos	36	21 (58,4%)
4 anos	52	43 (82,7%)
3 anos	60	25 (41,7%)
2 anos	30	19 (63,4%)
1 ano	29	27 (93,1%)
6 meses	16	16 (100%)
Total	240	164 (68,4%)

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Leveduras de origem clínica são facilmente isoladas em meios de cultura, todavia, a manutenção de culturas viáveis tem apresentado problemas metodológicos.⁽⁶⁾ Alguns métodos resultam em baixos níveis de sobrevivência e instabilidade das propriedades morfológicas e bioquímicas das cepas preservadas,⁽⁷⁾ impossibilitando estudos retrospectivos⁽⁸⁾ de amostras clínicas.

Bueno e Gallardo,⁽¹⁰⁾ Rodrigues et al.⁽¹²⁾ descreveram a recuperação de 100% de fungos filamentosos e leveduriformes armazenados em água destilada, em temperatura ambiente, por um período de cinco anos. Todavia, quando comparado ao presente estudo, a taxa de viabilidade aqui obtida foi menor (68,4%).

Em outros estudos, a recuperação de cepas de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* variou de 90% a 100%, sendo, contudo, utilizado o método de preservação em caldo infusão cérebro-coração (BHI), a temperatura de -20°C, tendo

como crioprotetor, o glicerol.^(7,11) No presente trabalho, as taxas de viabilidade obtidas foram de 42% a 82%. A menor taxa encontrada na avaliação em tela pode ser decorrente da diferença entre os líquidos de preservação, bem como à falta de um crioprotetor.

A sobrevivência de fungos depende da temperatura e período de armazenamento, sendo que a estocagem a -20°C em *freezer* proporciona viabilidades positivas por quatro a cinco anos, em decorrência da redução do metabolismo celular até o nível de dormência artificial.⁽⁷⁾ Porém, a formação de cristais de gelo pode alterar essa viabilidade.^(11,13) Isso poderia explicar a baixa taxa geral de recuperação das leveduras nesse estudo. Uma alternativa a esse problema poderia ser a adição de glicerol, cuja eficiência como protetor celular foi demonstrada por Silva et al.,⁽⁷⁾ com a recuperação de 90% das leveduras estocadas, durante três e quatro anos.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo (Tabela 2) com aqueles apresentados na Tabela 1 permite constatar que os dados aqui demonstrados são compatíveis com os resultados encontrados por outros autores.⁽⁶⁻¹²⁾ Diferenças no tempo de preservação e o tipo de cepa estocada podem explicar as variações observadas na taxa de viabilidade dos organismos.

Métodos sofisticados de preservação, como liofilização e nitrogênio líquido, têm, claramente, maior capacidade de manter estáveis as características morfofisiológicas dos fungos. Diversos estudos têm mostrado que a liofilização e a criopreservação em nitrogênio líquido permitem recuperar, depois de longos períodos de estocagem, um elevado número de cepas com morfologia e patogenicidade inalteradas. No entanto, o alto custo de execução dessas técnicas é um fator limitante, principalmente para os pequenos laboratórios de análises clínicas.^(6,8,11)

A maior taxa de recuperação de cepas ocorreu no período de preservação compreendido entre seis meses a um ano (Tabela 2), o que demonstra a adequação do método para estocagens em curtos períodos de tempo. No entanto, foram aceitáveis as taxas de recuperação acima de seis anos de preservação (71,5%-80,0%). Além disso, a manutenção em água destilada otimiza espaços nas coleções de cultura de fungos, é menos laboriosa e requer pequeno investimento.⁽⁹⁾ Outras vantagens do método incluem certa proteção das culturas preservadas frente à contaminação por fungos, bactérias e ácaros do ambiente, bem como evita a dessecação e o esgotamento dos meios de cultura que podem levar a importantes perdas na viabilidade.

Summary

This study aimed to evaluate the maintainance of Candida genus stored at -20°C in sterile distilled water. We used 240 strains of Candida albicans stored at -20°C in sterile distilled water from six months to eight years. The strains subcultured on Sabouraud agar and incubated at 35°C for 96 h in two sets. It was recovered 68.4% of 240 yeast, the six months period was the highest percentage of viability and the three years was lowest. The used method in the

study for yeast storage has advantages when compared to others, little space takes up, easiness and low cost.

Keywords

Yeast; Mycology collection; Mantainance; Freezing method

AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de doutorado.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microb Rev. 2007;20(1):133-63.
2. Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, D'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2004;46:239-41.
3. Barberino MG, Silva N, Reboucas C, Barreiro K, Alcântara AP, Netto EM, Albuquerque L, Brites C. Evaluation of blood stream infections by Candida in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. Braz J Infect Dis. 2006;10:36-40.
4. Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T, Rosas RC. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. Infect Control and Hosp Epidemiol. 2007;28:570-6.
5. Pasqualotto AC, Moraes AB, Zanini RR, Severo LC. Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. Infect Control and Hosp Epidemiol. 2007;28:799-804.
6. Cavalcanti SDB. Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo. Dissertação [Mestrado em Ciências] - Faculdade de Medicina da USP; 2010.
7. Silva JO, Costa PP, Chinarelli SH. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. RBAC. 2008;40(1):73-4.
8. Girão MD, Prado MR, Brilhante RS, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJ, Rocha M. Viabilidade de cepas de Malassezia pachydermatis mantidas em diferentes métodos de conservação. Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37(3):229-33.
9. Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. An Bras Dermatol. 2005;80(6):591-594.
10. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Rev Iberoam Micol. 1998;15:166-8.
11. Nery AS, Melhem MSC, Gomes AML. Manutenção da levedura Cryptococcus sp por congelamento. Laes & Haes. 2001;129:194-8.
12. Rodrigues E, Lírio V, Lacaz C. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1992;34(2):159-65.
13. Spanemberg A, Sanches EMC, Hummel J, Valente P. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de células leveduriformes. Acta Scientiae Veterinariae. 2008;36:43-5.

Correspondência

Antonella Souza Mattei

Rua Prof. Annes Dias, 285

Hospital Santa Rita, Laboratório de Micologia

Porto Alegre, RS

Tel (51) 3214-8410, 8500-5925

Exame citológico do derrame papilar, fibroadenoma, lipoma, cistos mamários, papiloma intraductal e câncer de mama

Cytology test of nipple discharge, fibroadenoma, lipoma, cysts, intraductal papilloma and breast cancer

Ana Rúbia Baú¹

Ezequiel Antônio Dalla Corte²

Vera Regina Andrade Vargas²

Resumo

O diagnóstico precoce do câncer de mama é realizado pelo autoexame das mamas, exame clínico das mamas, mamografia e pelo exame de ultrassonografia. Porém, outros exames que se destinam à confirmação cito-histológico consistem na citologia de material colhido por punção aspirativa por agulha fina, histopatologia do material colhido por punção aspirativa por agulha grossa e biópsia. A citologia é um importante instrumento de diagnóstico em diversas patologias pela sua simplicidade e precisão, tendo uma sensibilidade elevada. Esse exame é indispensável ao diagnóstico das lesões palpáveis da mama e junto com o exame físico e mamográfico fornecem o triplice diagnóstico, elevando ainda mais a sensibilidade de detecção de qualquer patologia mamária, sem ter a necessidade de um procedimento mais agressivo. O objetivo desse estudo foi revisar algumas doenças das mamas com ênfase ao diagnóstico citopatológico. Foi realizada uma revisão da literatura em livros e artigos científicos de revistas impressas e eletrônicas disponíveis, que continham descrições dos aspectos citomorfológicos das patologias da mama.

Palavras-chave

Citologia; Punção aspirativa por agulha fina; Fibroadenoma; Câncer de mama

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres no mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sem considerar os tumores da pele não melanoma. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, apontaram que o número de novos casos de câncer de mama será de 52.680, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. No estado do Rio Grande do Sul, região sul do Brasil, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com taxas brutas de incidência de 81,03 por 100 mil mulheres e um número de 4.610 casos novos por esse tipo de câncer para o ano de 2012.⁽¹⁾

Os métodos de detecção das doenças da mama são: o autoexame das mamas (AEM), o exame clínico das mamas (ECM) e o exame mamográfico das mamas (MMG).^(2,3) O AEM consiste em um processo sistemático e metódico, simples e indolor, realizado pela própria mulher com o objetivo de detectar nódulos mamários. Deve ser realizado mensalmente, aos 10 dias que seguem a menstruação, sendo que em mulheres na menopausa, pode ser realizado a qualquer

dia do mês.⁽³⁻⁵⁾ O ECM deve ser realizado anualmente em mulheres, a partir de 40 anos de idade, como forma de detecção de lesões sugestivas de câncer. Ele é realizado pela história clínica, pelo exame físico ou avaliação da morfologia, simetria e vascularização da mama.^(2,6) No MMG é realizada radiografia das mamas, que permite a detecção precoce do câncer por ser capaz de mostrar lesões em fase inicial, sendo realizada anualmente, a partir de 35 anos de idade. Essa mamografia é utilizada no rastreamento do câncer de mama e tem resultado em um aumento do número de pacientes que apresentam lesões mastológicas impalpáveis que, para melhor orientação terapêutica, necessitam de estudos citológico e histopatológico.^(1,7-10)

Além do AEM, ECM e MMG, o exame de ultrassonografia permite uma clara diferenciação entre nódulos sólidos e císticos, tornando-se assim, um valioso complemento à MMG, sobretudo devido à sua sensibilidade e especificidade em avaliações de mamas densas em mulheres jovens e em mulheres grávidas.^(2,10) Outras formas de diagnóstico são realizadas através de punções e biópsias, que se destinam à confirmação cito-histológica das lesões detectadas pela clínica e pelos métodos de imagem. Esses exames

Pesquisa Realizada como Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Santo Ângelo, RS, Brasil.

¹Graduanda do Curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus de Santo Ângelo, RS, Brasil.

²Professor(a) da disciplina de Citologia Clínica do Curso de Farmácia, URI – Campus de Santo Ângelo, RS, Brasil.

consistem na citologia de material colhido por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), e histopatologia de material colhido por punção aspirativa por agulha grossa (PAG) e biópsia.⁽²⁾ A biópsia percutânea (BC) é um procedimento que consiste na retirada de pequenos fragmentos de tecidos para exame anatomopatológico ou histopatológico, permitindo um diagnóstico definitivo.^(8,11)

A citologia é considerada um importante instrumento de diagnóstico em doenças mamárias pela sua simplicidade e precisão, tendo sozinha valor elevado (70% a 90%) de sensibilidade.⁽¹²⁾ A punção aspirativa por agulha fina pode ser indicada para investigar: massas palpáveis, independente de serem consideradas benignas ou malignas; massas não palpáveis detectadas por exame de imagem, que são consideradas benignas ou com características tipicamente malignas; suspeita de recidiva local de câncer de mama; avaliação de lesões císticas e confirmação do diagnóstico de câncer de mama quando a biópsia não está disponível, não é possível realizar ou está contraindicada. O exame citológico de lesões palpáveis da mama junto com o exame físico e a MMG fornecem o tríplex diagnóstico com sensibilidade de 99,6%.^(8,12-14)

O relatório citológico da punção aspirativa por agulha fina deve começar com uma declaração indicando a adequação da amostra para avaliação citológica. A adequação da amostra dependerá do tipo de lesão. Os achados citológicos devem ser correlacionados com a clínica e com os achados de imagem. Logo, deverá seguir uma descrição dos tipos de células presentes, observando a presença de células benignas ou malignas, células atípicas e como se apresenta o fundo do esfregaço. A classificação citológica para diagnósticos representa a interpretação das conclusões sobre o que foi analisado na amostra e compreende as seguintes categorias: material inadequado; benigna; atípica/indeterminado; suspeita de malignidade e maligna.⁽¹³⁾

O objetivo desse estudo foi revisar algumas doenças das mamas com ênfase ao diagnóstico citopatológico. Foi realizada uma revisão narrativa, com caráter de atualização do conhecimento, em livros e artigos científicos de revistas impressas e eletrônicas disponíveis, que continham informações sobre as patologias da mama e seus diagnósticos, apresentando detalhes sobre os aspectos citomorfológicos de patologias benignas da mama, assim como de câncer de mama. Para a realização dessa pesquisa foram utilizadas várias fontes de busca, tais como: Scientific Electronic Library Online (SciELO), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (PUBMED) e Instituto Nacional do Câncer (INCA). Para a busca, foram utilizadas as seguintes palavras-chave em português: doenças benignas da mama; câncer de mama; neoplasias mamárias; rastreamento de câncer de mama; diagnóstico de câncer de mama; autoexame de mamas; exame clínico das mamas; mamografia; citologia da mama; punção aspirativa por agulha fina; cistos mamários; mastite;

fibroadenoma; derrame papilar. Em inglês, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: *benign breast disease; breast cancer; breast neoplastic; breast cancer screening; breast cancer diagnosis; breast self-exam; clinical breast exam; mammogram; breast cytology; fine-needle aspiration cytology; breast cysts; mastitis; fibroadenoma; spill papillary*. Para ilustrar as descrições dos aspectos citológicos das doenças da mama descritas nesse artigo, foram utilizadas fotomicrografias de punção aspirativa por agulha fina cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Osvaldo Cruz, Santo Ângelo, RS.

DOENÇAS DA MAMA

Existem nódulos que aparecem na mama das mulheres no início da menacme, que podem aumentar no período pré-menstrual, que são nodularidades consideradas normais e denominadas de alterações funcionais benignas da mama. Para essas alterações funcionais existiam várias denominações como displasia mamária, displasia cíclica, mastopatia fibrocística, doença cística, alteração fibrocística, entre outras, que confundiam tanto os médicos como pacientes. Porém, nódulos palpáveis na mama podem ser desde patologias benignas até cânceres da mama, sendo que massas palpáveis da mama são benignas em até 80% dos casos, e o diagnóstico diferencial dessas envolve cistos mamários, fibroadenomas, papilomas, lipomas, cânceres entre outros.^(2,12,13,15-18) Entre as doenças da mama, essa revisão vai se limitar a mastite, fibroadenoma, lipoma, cistos mamários, papiloma e câncer de mama.

Mastite

A mastite é uma doença inflamatória da mama que pode estar associada à gestação e período puerperal (pós-gestacional), sendo esta última a mais frequente. Esta doença caracteriza-se por hiperemia, calor, dor, inchaço e ingurgitamento mamário, podendo evoluir para abscessos quando não tratada. A mastite aguda puerperal ocorre durante a amamentação associada à infecção bacteriana, sendo principalmente pela bactéria *Staphylococcus aureus*. A via de contaminação é a transpapilar, através da sucção do recém-nascido na hora de amamentar.^(2,17,18) A ectasia ductal é uma doença inflamatória, que ocorre no período não puerperal e corresponde à dilatação dos ductos terminais da mama, com consequente aumento de restos de células e secreções no seu interior, podendo causar um processo inflamatório ao redor dos ductos, chamado de mastite periductal. Este processo inflamatório pode causar dor mamária, derrame papilar e nódulos mamários relatado pela mulher, e ao exame clínico; além desses sinais, podem ser observadas retração e fistula mamária.⁽¹⁷⁾ A descarga papilar é a saída espontânea de secreção pela papila mamária quando não está associada à lactação, sendo um sinal inespecífico que pode ser encontrado em diversas situações como condições benignas

até câncer. Outro processo inflamatório, que pode ocorrer, é a mastite granulomatosa como secundária à tuberculose, sífilis ou infecções fúngicas. Esse processo pode simular carcinomas avançados.^(3,15-17)

No exame citológico do derrame papilar é necessária uma análise de grande quantidade de células para se evitar um resultado falso-negativo. Nesse exame, normalmente, são observadas numerosas células de inflamação aguda e crônica. Apresenta exsudato leucocitário com grande quantidade de polimorfos neutrófilos, com alguns histiócitos e células gigantes multinucleados. Também podem ser obser-

vadas células epiteliais que mostram modificações reativas, como o aumento nuclear que não excede a duas vezes o tamanho de uma hemácia e nucléolos visíveis. Em estágio mais avançado, surgem células inflamatórias crônicas, inclusive linfócitos, e as células epiteliais perdem a aparência reativa. O fundo pode apresenta-se proteico com debris celulares (Figura 1, A). Na mastite granulomatosa, o esfregaço apresenta numerosas células inflamatórias, com um maior predomínio de neutrófilos do que linfócitos e histiócitos multinucleados e vasos sanguíneos em proliferação, porém com ausência de necrose (Figura 1, B).^(7,15,16,19-22)

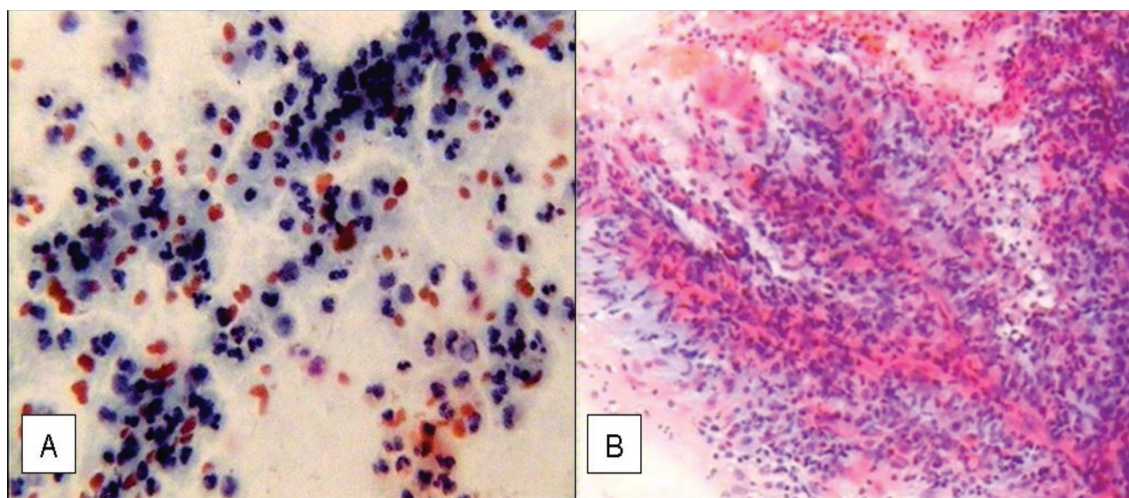


Figura 1. Fotomicrografia de esfregaço de paciente com diagnóstico citológico de mastite. Em A, esfregaço de descarga mamária com neutrófilos polimorfonucleares, eritrócitos e debris celulares (Coloração de Papanicolaou, x 400). Em B, esfregaço de punção aspirativa por agulha fina de paciente com mastite granulomatosa com numerosas células inflamatórias com predomínio de neutrófilos, linfócitos e histiócitos e vasos sanguíneos em formação (Coloração de Papanicolaou, x 100).

Fibroadenoma

O fibroadenoma é a neoplasia mamária fibroepitelial mais frequente em mulheres com idades entre 20 e 35 anos. O fibroadenoma tem origem lobular e consiste na proliferação do estroma mamário e do epitélio ductolobular. Ele surge em qualquer lugar da mama, tendo maior incidência no quadrante súpero-lateral. Caracteriza-se por ser um tumor benigno, com aspecto sólido, bem delimitado, de consistência fibroelástica, multiplicidade, bilateralidade e mobilidade dos nódulos.^(2,12,23-25) O fibroadenoma, geralmente, é assintomático, exceto no período de gestação e lactação sendo descoberto pela palpação da própria paciente no autoexame das mamas. Clinicamente, apresenta-se como um pequeno nódulo indolor que cresce lentamente de um a três centímetros, mas pode atingir grandes proporções. No exame mamográfico, o diagnóstico do fibroadenoma torna-se um pouco mais difícil devido à sua textura, que é idêntica à da glândula mamária. No exame de ultrassonografia, ele aparece como uma imagem nodular, circunscrita, ovalada e com margens bem delimitadas.^(23,24,26,27)

O exame citológico tem alta sensibilidade (99,6%) para o diagnóstico do fibroadenoma e a coleta do material é realizada por punção aspirativa com agulha fina.⁽¹²⁾ A característica dos esfregaços citológicos do fibroadenoma mais comum é a presença de células epiteliais em folhetos de monocamadas e com contornos bem definidos, apresentando células mioepiteliais sobrepostas e diversos núcleos desnudos no fundo, além de células de estroma com celularidade baixa. Esses esfregaços são altamente celulares, aparecendo grandes folhetos planos de células ductais, que possuem núcleos uniformes, finamente granulares, nucléolos pequenos e pouco citoplasma. Muitos dos folhetos mostram ramificações, seja em chifre de veado, taco de golfe ou grupos celulares epiteliais em dedo de luva formando agrupamentos arborescentes. Outro detalhe característico é a presença de células mioepiteliais na superfície dos folhetos, parecendo sementes de gergelim sobre um pãozinho. Também, pode apresentar um fundo com células estromais fusiformes espalhadas e núcleos bipolares desnudos e hiper cromáticos, além de fragmentos de estroma tipicamente hipocelulares. Não são encontradas células inflamatórias e mostra evidência de necrose (Figura 2).^(2,7,15,16,19-21,24)

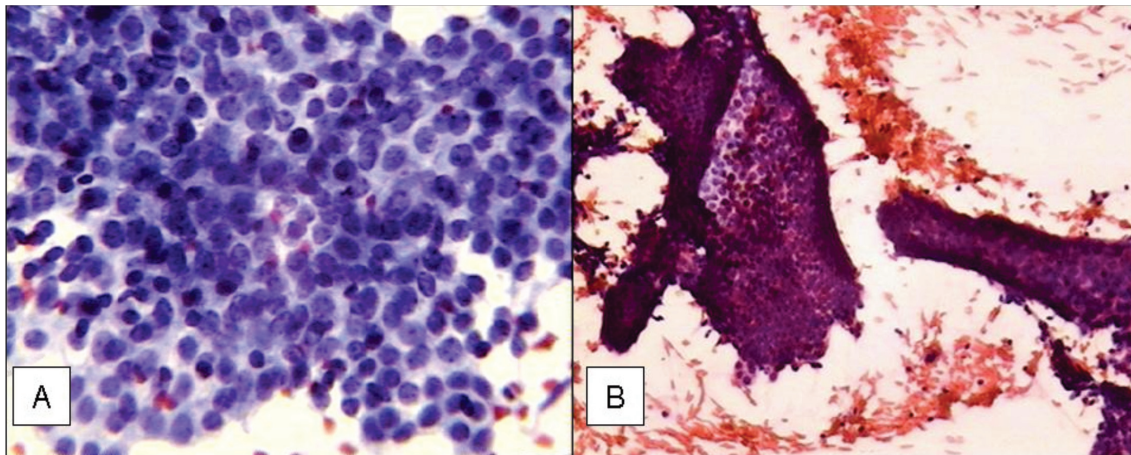


Figura 2. Fotomicrografia de esfregaços da mama, colhido por punção aspirativa por agulha fina, de paciente com diagnóstico citológico de fibroadenoma. Em A, apresenta um lençol de células ductais com células mioepiteliais (Coloração de Papanicolaou, x 400); em B, apresenta agrupamentos coesos de células ductais característicos de fibroadenoma (Coloração de Papanicolaou, x 400).

Lipoma

O lipoma é uma proliferação benigna de células lipídicas, formando nódulos amolecidos ou com consistência elástica, nem sempre bem delimitados e podem atingir grandes proporções que modificam as delimitações da mama. Geralmente estes nódulos são indolores, e em seu estágio inicial causam hemorragias, seguidas de necrose liquefativa central de gordura. É um processo inflamatório muito freqüente, levando em conta a histologia da mama, que é formada por uma grande quantidade de tecido adiposo, porém sua importância reside no diagnóstico diferencial com o câncer de mama. No autoexame das mamas, a mulher observa um nódulo que ao exame clínico apresenta-se amolecido ou com consistência elástica, nem sempre bem delimitado que pode ser grande.^(2,12)

No diagnóstico citológico do lipoma, o fundo pode apresenta-se sujo, com uma quantidade pequena de células epiteliais ductais, macrófagos espumosos, histiócitos gigantes multinucleados. Esse esfregaço citológico também pode apresentar agrupamentos de células adiposas maduras, sem atividade mitótica, algum estroma e por vezes necrose gordurosa, além de detritos celulares e componentes inflamatórios (Figura 3).^(7,13,15,16,19-21)

Cistos mamários

Os cistos mamários formam-se pela expansão e/ou dilatação dos lóbulos. Estes nódulos são elásticos, podendo ser delimitados ou não, mas sempre maiores que 3 mm. São mais frequentes em mulheres com idade de 35 a 50 anos, ou seja, na idade de involução dos lóbulos. Podem aumentar ou até desaparecer sem tratamento médico e

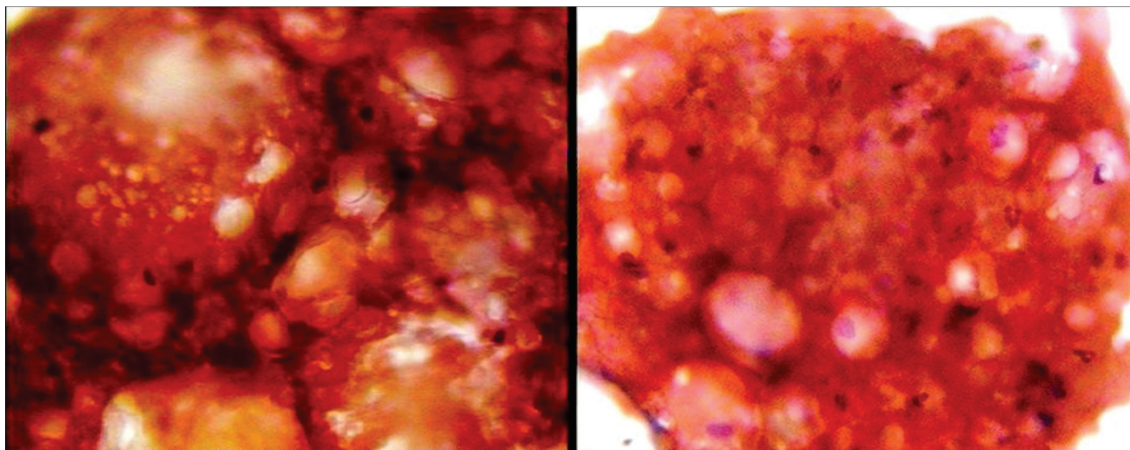


Figura 3. Fotomicrografias de esfregaço da mama, colhido por punção aspirativa por agulha fina, de paciente com diagnóstico citológico de lipoma, mostrando agrupamentos de células adiposas (Coloração de Papanicolaou, x 400 e 100).

podem causar desconforto e dor local devido à distensão de tecidos. Seus principais agravantes são a ativação estromal por esteroides sexuais durante os ciclos reprodutivos, menarca precoce e menopausa tardia, nuliparidade, oligoparidade ou primiparidade tardia e amamentação curta.⁽¹²⁾ Ao exame clínico, os cistos são elásticos, delimitados ou não e pouco móveis. Como nem todo cisto é palpável, às vezes, é um achado de nódulo à MMG. A ecografia dos cistos os diferencia de nódulos sólidos. Na punção aspirativa por agulha fina (PAAF), o líquido pode ser claro ou sanguinolento.^(2,12,17,28)

Aspirados destas lesões podem ser acelulares ou podem conter células ductais e células inflamatórias, inclusive histiócitos multinucleados. A característica mais notável é a presença de restos císticos finamente granulares, com macrófagos de citoplasma esponjoso (Figura 4, A). A parede do cisto pode sofrer metaplasia apócrina, com produção ativa de líquido, sendo que mostra alguns folhetos de células apócrinas. Essas células apócrinas apresentam citoplasma granular e limites precisos, outras vezes exibem modificações degenerativas (Figura 4, B).^(12,15,16,20,21)

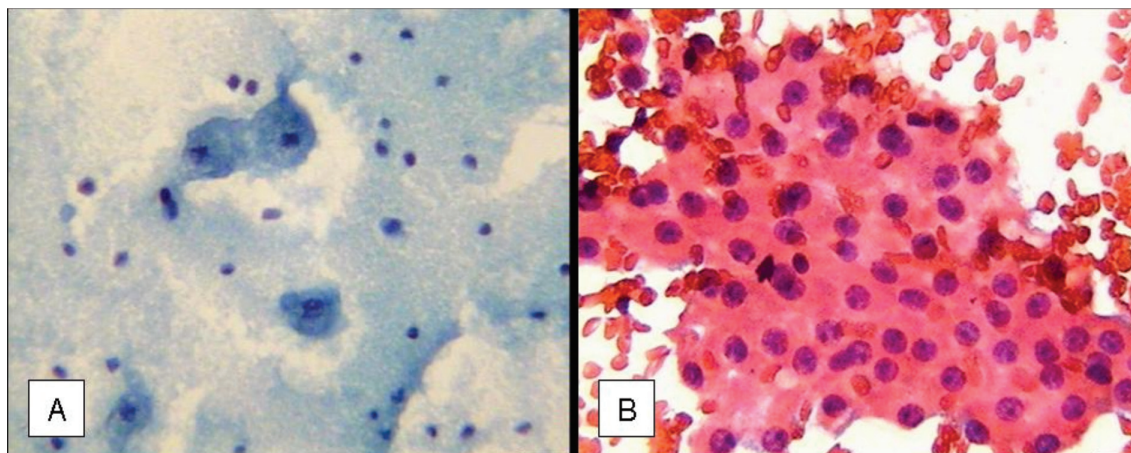


Figura 4. Fotomicrografias de esfregaços da mama, colhidos por punção aspirativa, de pacientes que apresentavam cistos. Em A, presença de macrófagos de citoplasma esponjoso e restos císticos granulares (Coloração de Papanicolaou, x 250), e em B presença de grupos de células apócrinas (Coloração de Papanicolaou, x 400).

Papiloma

O papiloma intraductal é uma neoplasia epitelial benigna, menos frequente, caracterizada por proliferações das células epiteliais sem atipias dos grandes ductos subareolares. Possui um potencial de malignidade baixo (RR de 1,3), sendo importante o diagnóstico diferencial com o carcinoma, pois ambos produzem massas palpáveis e descarga papilar.^(2,12,16,23) A principal queixa relatada pelas mulheres é a secreção espontânea mamilar ou descarga que pode ser hemorrágica ou serosa, espontânea e unilateral. No diagnóstico clínico, é importante encontrar o ponto gatilho pressionando o complexo aréolo-papilar com o dedo indicador para encontrar o ducto comprometido. O exame mamográfico fornece poucos subsídios, e a citologia do fluxo apresenta uma baixa sensibilidade e baixo valor preditivo de malignidade (30% de resultados falso-negativos). O exame histopatológico é realizado da extirpação do papiloma, sendo considerado o diagnóstico definitivo da lesão. O tumor é benigno, não é considerado precursor do carcinoma da mama.^(2,12,16)

No exame citológico, são observadas células epiteliais ductais coesas; arranjos em bola (poucas células, citoplasma claro), núcleos grandes hipercromáticos; fundo proteináceo; células mioepiteliais e macrófagos espumo-

sos com hemossiderina (eritrócitos fagocitados). Em casos suspeitos, os esfregaços são hemorrágicos com macrófagos e grupos tridimensionais de células ductais com núcleos ovóides de cromatina homogênea. Nos casos positivos para malignidade, os esfregaços apresentam células atípicas isoladas ou em pequenos blocos, com núcleos pleomorfos, hipercromáticos e cromatina grosseira (Figura 5).^(15,16,20,21,28)

Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença genética multifatorial que apresenta vários fatores etiológicos, complicando o seu entendimento. Esta doença é responsável pelo maior número de óbitos por câncer entre as mulheres, no mundo, sendo mais frequente em mulheres no período perimenopausa, podendo aparecer com uma frequência de 4% em mulheres com menos de 35 anos com sintomas mamários. Quando o câncer de mama acomete mulheres jovens, é considerado muito grave pela baixa suspeição clínica, pela dificuldade do exame devido às mamas densas e também pelo não rastreamento mamográfico nesta faixa etária.^(26,29) Os carcinomas são divididos em dois grupos, denominados carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. O carcinoma *in situ* é caracterizado por células neoplásicas que estão limitadas

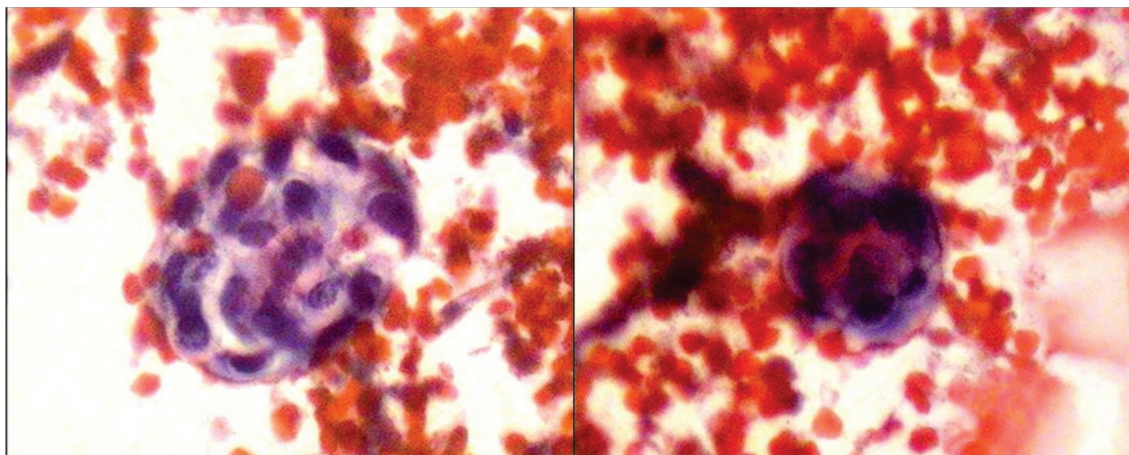


Figura 5. Fotomicrografias de esfregaços de derrame papilar de paciente com diagnóstico citológico sugestivo de papiloma, confirmado pela histopatologia. Apresentam arranjos em bola de células epiteliais com citoplasma claro (Coloração de Papanicolaou, x 400).

aos ductos e lóbulos, não ultrapassando a membrana basal, não invadindo os linfáticos nem os vasos sanguíneos e não produzindo metástases. O carcinoma invasivo ou infiltrante, que invade o estroma, chega até a vasculatura causando metástases.⁽³⁰⁾

Na citologia, a diferença entre carcinoma ductal *in situ* e invasivo é extremamente difícil e em alguns casos impossível. O esfregaço que contém grande quantidade de células com características de malignidade não apresenta maiores dificuldades. Os critérios incluem celularidade aumentada onde são observadas várias células atípicas mal preser-

vadas, isoladas ou em agregados, apresentando núcleos com tamanho excedendo a duas vezes o tamanho de uma hemácia. As células tumorais podem apresentar o citoplasma finamente granular e vacuolizado. O núcleo pode apresentar sobreposição, hiperchromatismo com anisocariose e pleomorfismo, irregularidade na distribuição de cromatina e mitoses atípicas, nucléolos proeminentes ou imperceptíveis. Os agrupamentos celulares apresentam perda de coesão e dispersão celular. O fundo pode apresentar-se grumoso, obscurecido por inflamação, sangue ou fragmento de células (Figura 6).^(4,5,7,15,16,20,21,31-33)

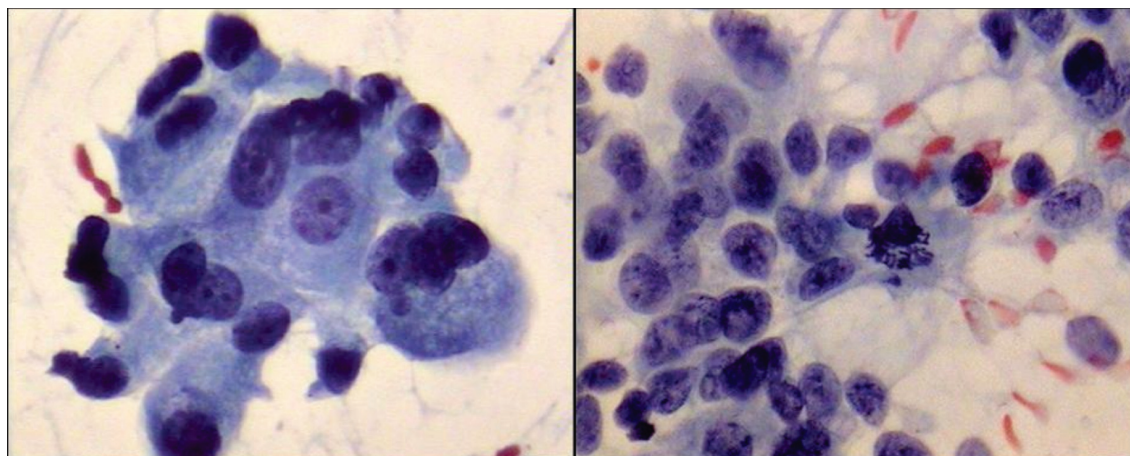


Figura 6. Fotomicrografias de esfregaço da mama, colhido por punção aspirativa por agulha fina de paciente com diagnóstico citológico sugestivo de câncer, confirmado pela histopatologia. Apresenta células com anisocariose, núcleos com pleomorfismo, irregularidade na distribuição de cromatina e nucléolos evidentes (Coloração de Papanicolaou, x 400).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações reunidas neste estudo visam contribuir para um melhor conhecimento sobre o diagnóstico citológico de algumas patologias da mama de material colhido por punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Conforme foi

demonstrado nessa revisão, as características citológicas das doenças da mama estão bem estabelecidas, sendo esse um método considerado importante no diagnóstico das patologias mamárias pela sua simplicidade, precisão e elevada sensibilidade. Foram encontrados poucos trabalhos científicos publicados referentes à análise

citológica que descrevessem os aspectos citológicos das patologias mamárias.

É importante ressaltar que não houve intenção de esgotar o assunto e, como perspectivas futuras, sugerimos novos estudos, incluindo um maior número de informações, principalmente sobre os aspectos citológicos das doenças mamárias.

Summary

Early diagnosis breast cancer is done by breast self-examination, clinical breast and mammography examination and by ultrasound. However, other tests intended for cyto-histological confirmation in cytology consist of material collected by fine-needle aspiration cytology, histopathology material collected by core-needle biopsy. The cytology is an important diagnostic tool in various diseases due to its simplicity and accuracy, with high sensitivity. This exam is essential for the diagnosis of palpable breast lesions and along with the physical examination and mammography provides the triple diagnosis, further increasing the sensitivity of detection of any breast pathology, without the need for a more aggressive procedure. The aim of this study was to review the literature on the diagnosis of breast diseases with emphasis on cytological diagnosis. We conducted a review of literature in books and scientific articles of printed and electronic journals available, containing descriptions of cytomorphological aspects of breast diseases.

Keywords

Cytology; Fine-needle aspiration cytology; Fibroadenoma; Breast cancer

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Setor de Citologia do Laboratório de Análises Clínicas Osvaldo Cruz, Santo Ângelo, RS, pelas fotomicrografias utilizadas, no presente artigo, para ilustrar as descrições citológicas.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. - Rio de Janeiro: Inca, 2011.
2. Kamra HT, Gadgil PA, Chaware SA, Kolhe AB, Sakinlawar PW. Cytohistological correlation of early changes in spontaneously infarcted fibroadenoma-a rare case report. *Ecancermedical-science*. 2012;6:257.
3. Monteiro APS, Arraes EPP, Pontes LB, Campos MSS, Ribeiro RT, Gonçalves REB. Autoexame das Mamas: Frequência do Conhecimento, Prática e Fatores Associados. *RBGO*. 2003;25 (3):201-5.
4. Freitas RJ, Koifman S, Santos NRM, Nunes MOA, Melo GG, Ribeiro ACG, Melo AFB. Conhecimento e prática do autoexame de mama. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52(5):337-41.
5. Lui PC, Tse GM, Tan PH, Jayaram G, Putti TC, Chaiwun B, Chan NH, Lau PP, Mak KL, Khin AT. Fine-needle aspiration cytology of metaplastic carcinoma of the breast. *J Clin Pathol* 2007; 60(5):529-33.
6. Dias-Da-Costa JS, Olinto MTA, Bassani D, Marchiinati CRE, Bairoos FS, Oliveira MLP, Hartmann M, Patussi MP. Desigualdades na realização do exame clínico de mama em São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007;23 (7):1603-12.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. CONPREV. Diagnóstico histopatológico e citopatológico das lesões da mama. Rio de Janeiro, CONPREV, 2002.
8. Kemp C, Elias S, Borrelli K, Schor AP. Punção aspirativa por agulha fina orientada por ultra-sonografia em lesões não palpáveis. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2001;(5):321-7.
9. Moutinho MSP, Elias S, Kemp C, Nazário ACP, Baracat EC. Acurácia diagnóstica da biópsia percutânea com agulha grossa orientada por estereotaxia nas lesões mamárias categoria BI-RADS 4. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(12):608-13.
10. Vargas RA, Vargas EB, Vargas VRA, Menezes HS. Correlação entre exame clínico das mamas, exame mamográfico e exame histopatológico de mulheres atendidas numa clínica de mastologia no Sul do Brasil. *Rev Bras Mastol*. 2008;18:99-106.
11. Valejo FAM, Tiezzi DG, Campos DA, Félix FL. Avaliação da eficiência da biópsia excisional após agulhamento de lesões não palpáveis da mama. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(4):200-4.
12. Nazário ACP, Rego MF, Oliveira VM. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(4):211-9.
13. National Breast Cancer Centre. 2004. Breast fine needle aspiration cytology and core biopsy: a guide for practice, National Breast Cancer Centre, Camperdown, NSW.
14. Reis FJC, Andrade JM, Velludo MASL, Oliveira SA, Feitosa RB, Marana HRC, Bighetti S. Punção Biópsia Aspirativa (PBA) com agulha fina no diagnóstico diferencial de patologias da mama. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 1998;20(4):209-213.
15. Goulart APS, Silva RR, Volbrecht B, Viegas J, Zerwes FP, Frasson AL. Mastite granulomatosa lobular idiopática: relato de caso. *Rev Bras Mastologia*. 2011;21(1):46-49.
16. McKee GT. Citopatologia. Rio de Janeiro: Editora Artes Médicas; 2001.
17. Menke CH, Biazús JV, Xavier NL, Cavalheiro JA, Rabin EG, Bittelbrunn A, Cericatto R. Rotinas em Mastologia, 2ª edição, Porto Alegre, RS, 2007.
18. Robbins S, Cotran R. Bases patológicas das doenças. 8ª edição, Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, 2006.
19. Bandyopadhyay R, Nag D, Mondal SK, Mukhopadhyay S, Roy S, Sinha SK. Distinction of phyllodes tumor from fibroadenoma: Cytologists' perspective. *J Cytol*. 2010;27(2):59-62.
20. Bland KI, Copeland III EM. La Mama, manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas (Vol. 1). Editora Médica Panamericana. 3ª Edición. Madrid, 2007.
21. Demay RM. Practical principles of cytopathology. ASCP Press. Chicago, United States, 1999.
22. Tse GM, Poon CS, Law BK, Pang LM, Chu WC, Ma TK. Fine needle aspiration cytology of granulomatous mastitis. *J Clin Pathol* 2003; 56:519-21.
23. Acevedo JC, Aliaga N. Patología benigna de la mama: información para el médico general. *Rev Méd Clín las Condes*. 2009;20(1):75-83.
24. Nikumbh DB, Desai SR, Madan PS, Patil NJ, Wader JV. Bilateral giant juvenile fibroadenomas of breasts:a case report. *Patholog Res Int*. 2011;2011:482046.
25. Souza JA. Avaliação da atividade proliferativa no epitélio mamário adjacente a fibroadenoma em mulheres tratadas com tamoxifeno. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2000;22(7):429-33.
26. Calado SS, Lima MCCA. Estudo morfológico dos fibroadenomas da mama: uma análise comparativa entre grupos etários. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40:411-9.
27. Poveda CA, Castaño N, Sará JA. Fibroadenoma juvenil. Presentación de um caso y revisión de la literatura. *Revista Colombiana de Cancerología*, 2007;11(1):70-2.

28. Andrea CE, Sobral ACL, Costa ESM, Totsugui JT, Araújo SR, Collaço LM. Citologia do derrame papilar. J Bras Patol Med Lab. 2006; 42:333-7.
29. Crippa CG, Hallal ALC, Dellagiustina AR, Traebert EE, Gondin G; Pereira C. Perfil clínico e epidemiológico do câncer de mama em mulheres jovens. Arquivos Catarinenses de Medicina. 2003;32(3):50-8.
30. Thuler LC. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. Rev Bras Cancerol. 2003;49(4):227-38.
31. Olina L, Dalben I, Lucca LA. Análise das oportunidades de diagnóstico precoce para as neoplasias malignas de mama. Rev. Assoc Med Bras. 2003;49(2):185-90.
32. Guidelines of the Papanicolaou Society of Cytopathology for Fine-Needle Aspiration Procedure and Reporting. The Papanicolaou Society of Cytopathology Task Force on Standards of Practice. Diagn Cytopathol. 1997;17(4):239-47. Comment in: Diagn Cytopathol. 1999;21(2):152-3.
33. Zhao C, Raza A, Martin SE, Pan J, Greaves TS, Cobb CJ. Breast fine-needle aspiration samples reported as "proliferative breast lesion": clinical utility of the subcategory "proliferative breast lesion with atypia". Cancer. 2009;117(2):137-47.

Correspondência

Vera Regina Andrade Vargas
Rua Barão de Santo Ângelo, 1305
98801-740 – Santo Ângelo, RS
Tel.: (55) 3313-7990
vravargas@gmail.com