

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analysis

Volume 47 Número 3 Ano 2015

CARTA DO PRESIDENTE / LETTER FROM THE PRESIDENT

- 63** A responsabilidade na produção do Conhecimento
The responsibility in the Knowledge production
Aquino JL

EDITORIAL / EDITORIAL

- 64** Ética das Virtudes em Análises Clínicas
Ethics of Virtues in Clinical Analyses
Neufeld PM

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO / UPDATE

- 66** Estresse oxidativo no lúpus eritematoso sistêmico
Oxidative stress in systemic lupus erythematosus
Barreira TG, Xavier AR, Kanaan S, Rosário NF, Silva AA

ARTIGO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

- 74** Análise da mobilização e coleta de células-tronco hematopoiéticas do sangue periférico (CTHSP) para transplante autólogo no Hospital Universitário de Santa Maria, RS
Analysis of the mobilization and collection of peripheral blood stem cells (PBSC) for autologous transplantation in the University Hospital of Santa Maria, RS
Scapin V, Pereira DV, Pereira WV, Oliveira LZ, Diefenbach CF, Cósier VM, Silva JE
- 81** Correlação entre citologia, colposcopia e histologia no diagnóstico das lesões intraepiteliais e carcinoma do colo do útero
Correlation between cytology, colposcopy and histology in diagnosing lesions of intra-epithelial and cervical carcinoma
Nobrega SF, Miguel MS, Rolim LA
- 86** Avaliação da velocidade de hemossedimentação do analisador automático Microsed-System® em relação ao método de Westergren e correlação com os valores da proteína C-reativa (PCR)
Erythro sedimentation speed evaluation of automatic analyzer Microsed-System® compared to Westergren method and correlation with the C-reactive protein (CRP) values
Vianna LF, Vaucher RA, Itaquí SR, Silva JE
- 91** Hemocultura: etiologia e suscetibilidade das amostras provenientes de pacientes internados em hospital público
Blood culture: etiology and susceptibility of samples from patients admitted in public hospital
Rocha ML, Pereira NC
- 96** Perfil de sensibilidade de *staphylococcus* sp. isolados de infecções hospitalares em um hospital de nível IV no Rio Grande do Sul, Brasil
Sensitivity profile of staphylococcus sp. isolated of hospital infections in a level IV hospital in Rio Grande do Sul, Brazil
Herman CT, Wirzbicki DC, Oliveski CC, Colet CF

COMUNICAÇÃO BREVE / SHORT COMMUNICATION

- 101** Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre a estabilidade dos parâmetros do hemograma
Effects of time and storage temperature over the stability of hemogram parameters
Oliveira LS, Batista CC, Coimbra CN
- 105** Erros pré-analíticos em medicina laboratorial: uma avaliação preliminar em diferentes laboratórios de análises clínicas
Pre-analytical errors in laboratory medicine: a preliminary evaluation in different clinical laboratories
Faria GM, Pereira RL, Lourenço PM
- 110** Avaliação do desempenho do plasma humano em relação ao plasma de coelho no teste da coagulase livre
Performance evaluation of the human plasma in relation to the rabbit plasma in the test of free coagulase
Espósito MC, Oliveira DA, Quinteiro DS, Romão JV
- 113** *Salmonella* sp. em ovos e cloacas de galinhas e seu risco para a saúde pública
Salmonella sp. on eggs and chickens sewers and your risk for public health
Santos LK, Silveira JG, Jacociunas LV
- 117** INSTRUÇÕES AOS AUTORES / INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analysis

Editor-chefe/Editor-in-Chief

Paulo Murillo Neufeld (RJ)

Editores Eméritos/Honorary Editors

Mateus Mandu de Souza (RJ)

Editores Associados/Associate Editors

Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)

Paulo Jaconi Saraiva (RS)

Lauro Santos Filho (PB)

Publicação oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC
Official Publication of Brazilian Society of Clinical Analysis

Publicação Trimestral/Quarterly Publication

Assinatura anual/Annual Subscription
R\$ 195,00

Assinatura Internacional
Foreign Annual Subscription
US\$ 48,00

Produção Editorial e Gráfica/Publisher
Trasso Comunicação Ltda

Tiragem/Circulation
5.200 exemplares/Copies



DIRETORIA EXECUTIVA / EXECUTIVE BOARD

Jerolino Lopes Aquino (MT)
Presidente/President

Maria Elizabeth Menezes (SC)
Vice-Presidente/Vice-President

Jairo Epaminondas Breder Rocha (RJ)
(in memoriam)
Secretário-Geral/General Secretary

Luiz Roberto dos Santos Carvalho (BA)
Secretário/Secretary

Estevão José Colnago (RJ)
Tesoureiro/Treasurer

Marcos Kneip Fleury (RJ)
Tesoureiro Adjunto/Assistant Treasurer

Luiz Fernando Barcelos (RS)
Diretor Executivo/Executive Director

Conselho Fiscal/Fiscal Board
Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)
Maria da Conceição de L. Oliveira (SE)
Lenira da Silva Costa (RN)

Suplentes/Alternates

Gilcilene Maria dos Santos (DF)
Jorge Luiz Joaquim Terrão (ES)
Paulo Roberto Hatschbach (PR)

Endereço para correspondência/Editorial Office

Rua Vicente Licínio, 99 Tijuca - Rio de Janeiro, RJ - Brasil
20270-902 - Fone: 21 2187-0800 - Fax: 21 2187-0805
E-mail: rbac@sbac.org.br

Afiliações/Affiliations



Comitê Editorial/Editorial Board

Bioquímica Clínica/Clinical Biochemistry

Álvaro Largura (PR), Marcelo Quintão Mendes (MG), Geraldo Picheth (PR), Marileia Scartezini (PR), Arício Treitinger (SC), Paolo Mocarelli (ITA), Dulcineia Saes Parra Abdalla (SP), Ary Henrique Filho (GO), Daniel Mazzota (AR), Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Marinez Oliveira Sousa (MG), José Edson P. da Silva (RS), Rafael Noal Maresco (RS)

Citologia Clínica/Clinical Cytology

Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Carlos Eduardo de Queiroz Lima (PE), Rita Gorete Amaral (GO), Alexandre Sherley Casimiro Onofre (SE), Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade/Quality Control

José Abol Corrêa (RJ), Luís Fernando Barcelos (RS), Mateus Mandu de Souza (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Gabriel de Souza Lima Oliveira (SP)

Endocrinologia/Endocrinology

Carlos Alberto Camargo (SP), Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia/Toxicology

Regina Helena Queiroz (SP), Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia Clínica/Clinical Microbiology

Antônio Márcio Lopes (MG), Raimundo Diogo Machado (RJ), Estevão José Colnago (RJ), Amauri Braga Simonetti (RS), Cássia Maria Zocoli (SC), Carmen Paz Oplusti (SP), Raissa Mayer R. Catão (PB)

Imunologia Clínica/Clinical Immunology

Mateus Mandu de Souza (RJ), Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira (SP), Adelaide José Vaz (SP), Sílvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto Pucca (SP)

Parasitologia Clínica/Clinical Parasitology

Antônio Pedro Soares (MG), Geraldo Atilio de Carli (RS), Jerolino Lopes Aquino (MT), Alverne Passos Barbosa (GO), Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)

Micologia Clínica/Clinical Micology

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Maria José Gianini (SP), Regina Célia Candido (SP), Rosane Rhan (MT)

Biologia Molecular/Molecular Biology

Mário Hiroyuki Hirata (SP), Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Marcelo Ávila Mascarenhas (RS), Kelly Melo (SP), Maria Elizabeth Menezes (SC)

Hematologia Clínica/Clinical Hematology

Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Celso Spada (SC), Paulo César Naoum (SP), Julio Cezar Merlin (PR), Paulo Henrique da Silva (PR), Robson Ferreira Ferraz Santos (RJ), José Edson Paz da Silva (RS)

Entidades mantidas pela SBAC Entities maintained by the SBAC

PNCQ - Programa Nacional de Controle de Qualidade/National Program of Quality Control
Coordenador/Coordinator: Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

DICQ Sistema Nacional de Acreditação/National System of Accreditation
Coordenador/Coordinator: André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)

CEPAC - Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas/Post Graduation Center
Coordenadora/Coordinator: Maria Elizabeth Menezes (SC)

CB-36 - ABNT
Superintendente/Superintendent: Humberto Marques Tiburcio (MG)

CSM-20
Coordenador Técnico/Technical Coordinator: Luiz Fernando Barcelos (RS)

Comissões Institucionais/ Institutional Commissions

Coordenador Geral/General Coordinator:
Jerolino Lopes Aquino (MT)

Comissão de Congressos/Congress Commission:
Coordenador Geral de Congressos/
General Congress Coordinator: Irineu K. Grinberg (RS)
Assessoria Científica/Scientific Advice:
Jerolino Lopes Aquino (MT); Luiz Fernando Barcelos (RS), Marcos Kneip Fleury (RJ)

Normas e Habilitação/Norms and Qualification:
Coordenação/Coordination:
Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)
Membros/Members: Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ), Mateus Mandu de Souza (RJ), Estevão José Colnago (RJ), Luiz Fernando Barcelos (RS), Willy Carlos Jung (SC)

Ensino/Education:
Paulo Murillo Neufeld (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Mateus Mandu de Souza (RJ)

Ética/Ethics:
Henrique Tommasi Netto (ES), Francisco Einstein do Nascimento (CE), Maria da Conceição L. Oliveira (SE)



Jerolino Lopes Aquino

A responsabilidade na produção do Conhecimento

The responsibility in the Knowledge production

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas é uma entidade científica profissional, sem fins lucrativos, criada com o objetivo principal de desenvolver a especialidade de Análises Clínicas e os Laboratórios Clínicos, assim como acompanhar as necessidades da população para receber uma atenção primária de saúde com melhor qualidade.

Comprometida com a difusão do conhecimento científico, a SBAC se afirma como referência de conteúdo extremamente qualificado e constrói parcerias, nacionais e internacionais, com órgãos e instituições de peso, garantindo a troca de conhecimento.

Acreditamos que é através da pesquisa e desenvolvimento científico que chegamos a grandes avanços tecnológicos capazes não só de produzir conhecimento como também de trazer benefícios ao ser humano.

Sabemos que a realidade brasileira atual, de crise econômica e política, com um futuro ainda incerto e conturbado na área das Análises Clínicas, com inúmeras questões no que se refere à remuneração de serviços laboratoriais, em especial no SUS, tende a refrear investimentos seja nas pesquisas ou nos cursos voltados para o crescimento profissional, como pós-graduações, mestrados e doutorados.

Porém, reconhecemos o valor dos profissionais empenhados em estudar, progredir e ainda compartilhar o conhecimento e, por isso, temos tanto compromisso com a *Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC*. Ela é parte do movimento de propagação de pesquisas, principalmente na área de biodiagnóstico, mas também nas áreas de gestão e controle de qualidade, saúde pública e tecnologia médica e laboratorial.

Publicada desde 1969, é o único periódico totalmente voltado às Ciências Laboratoriais, seguindo um rigoroso padrão de seleção do conteúdo por uma equipe altamente qualificada, sendo indexada pela LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e classificada pela Comissão de Avaliação do Programa Qualis do Ministério da Educação, nas categorias Ciências Biológicas, Medicina, Odontologia, Saúde Coletiva e Interdisciplinar.

Caro colega, desejamos que aproveite a sua leitura, enriqueça seus conhecimentos e colabore com a revista enviando seu trabalho para avaliação e, quem sabe, publicação.

Um forte abraço,

Jerolino Lopes Aquino
Presidente da SBAC

Ética das Virtudes em Análises Clínicas

Ethics of Virtues in Clinical Analyses

O conceito de virtude (*aretê*) tem sua origem na Antiguidade Grega, estando seus fundamentos baseados nas filosofias de Sócrates, Platão e Aristóteles.⁽¹⁾ A sabedoria, a justiça, a temperança e a coragem são consideradas as quatro virtudes cardeais. Os gregos consideravam a virtude uma qualidade essencial que faz do ser o que ele é. Então, é virtuoso o homem que tenta ser bom e perfeito, utilizando a razão e o conhecimento para atingir esse objetivo, porque essas qualidades são próprias do homem. O contrário da virtude é o vício, que é caracterizado, basicamente, pela ignorância, que é a ausência da razão e do conhecimento.⁽²⁾

Para Sócrates, os indivíduos deveriam concentrar seus esforços em serem virtuosos. Segundo esse filósofo, há uma relação estreita entre virtude e felicidade. Duas teses sobre virtude e felicidade em Sócrates são propostas. Uma delas (instrumental) diz que Sócrates considera a virtude como um meio para se obter as coisas boas (prazerosas) e, consequentemente, a felicidade. A outra (constitutiva) diz que Sócrates considera a sabedoria, uma virtude, o único bem e que sua posse implica na felicidade. A posse da virtude é a felicidade para o homem, sua ausência, a infelicidade. Desse modo, as virtudes, quando possuídas por um indivíduo, tornam-no bom e, logo, feliz.⁽³⁾

Para Platão, numa primeira fase de sua vida, virtude é conhecimento. Para esse filósofo, todo princípio ético é fundamentado pela razão, por isso, o conhecimento (ciência teórica) é o princípio fundamental e unificador de todas as virtudes. Assim sendo, em Platão, as virtudes se constituem da primazia da razão sobre o senso comum e sobre os vícios da ignorância (ausência de virtude) ou dos desejos. Virtude é o controle, ordem, equilíbrio, proporcionalidade, justiça. Numa segunda fase, o conhecimento continua sendo o princípio unificador, no entanto, o conceito de virtude se evidencia como uma unidade que se harmoniza pelo pressuposto das diferenças, fazendo emergir a ação e o conflito e mostrando que o conhecimento é necessário, mas não suficiente para unificar as virtudes. Segundo Platão, virtude é uma capacidade ou faculdade humana, desse modo, é suscetível de ser desenvolvida e aprimorada. Pela natureza ensinável das virtudes, sua busca, aprendizado e ensinamentos devem prosseguir por toda a vida. Ao homem virtuoso, sempre será dado conhecer o bem e o belo.⁽⁴⁾

Para se prosperar como ser humano, de acordo com Aristóteles, deve-se cultivar as virtudes. O pensamento aristotélico é teleológico (*telos*: finalidade, *logos*: estudo). Isso significa dizer que ele entende as coisas em termos dos objetivos que elas perseguem e das funções para as quais elas foram projetadas.⁽²⁾ A ética de Aristóteles é caracterizada, então, pelo finalismo da razão. Esse finalismo da razão é a teleologia que será identificada como o bem.⁽⁵⁾ Para esse filósofo, as virtudes não têm um fim em si mesmas, mas são um meio para se alcançar um objetivo, o bem. Aristóteles considera que o bem para o homem é a eudaimonia (felicidade, bem-aventurança). As virtudes são as qualidades que permitem ao indivíduo atingir a felicidade, considerada o bem supremo.⁽¹⁾ Ele define a virtude como uma disposição (intencional), ao invés de um sentimento ou uma faculdade.⁽²⁾ Em Aristóteles, a prudência (meio termo) é um elemento essencial para a vida virtuosa, pois evita os extremos (excesso ou deficiência). No entanto, a virtude irá depender de julgamentos, por força da reta razão, para repudiar esses excessos e alcançar o meio termo (*mesótês*).⁽⁶⁾

Para Aristóteles, as virtudes se distinguem em intelectuais e éticas. As intelectuais, dianoéticas ou da razão nascem do ensino e requerem experiência e tempo.⁽¹⁾ Elas são divididas em uma parte científica (intelecto expeculativo) e em uma parte calculativa ou

deliberativa (intelecto prático). A primeira se baseia em coisas de causas imutáveis e invariáveis, e a segunda se baseia em coisas de causas mutáveis ou passíveis de variação. A científica compreende a ciência (*epistême*) ou conhecimento teórico ou puro (demonstração) e a sabedoria filosófica (*sophía*) ou o estudo da totalidade das coisas e suas causas primeiras (contemplação). A calculativa compreende a arte (*téchne*) e a sabedoria prática (*phrónesis*), também chamada de discernimento ou prudência, sendo que *téchne* se ocupa do que pode ser produzido (*poietón*) e *phrónesis* se ocupa do que pode ser objeto de ação (*praktón*).⁽⁶⁾ Outra forma de dividir as esferas de conhecimento em Aristóteles é através da tripartição (categorias cognitivas): *theoria* (conhecimento como atividade da *epistême*, *sophía* e *nous* [inteligência ou intelecto intuitivo]), *práxis* ou saber agir (ação como atividade de hábito prudencial ou *phrónesis*) e *poiésis* ou saber fazer (produção como atividade da *téchne*).^(6,7) Tem-se, então, que são cinco as disposições (*héxeis*) em virtude pelas quais o homem alcança a verdade [excelência] por meio da afirmação ou da negação: a arte (*téchne*), a ciência (*epistême*), o discernimento (*phrónesis*), a sabedoria (*sophía*) e a inteligência (*nous*).^(6,8)

Em conformidade com Aristóteles, as virtudes éticas/morais são adquiridas pelo hábito ou pelo costume (*éthos*) e abarcam a coragem, temperança, liberalidade, magnificência, magnanimidade, ambição apropriada, paciência, veracidade, testemunha, simpatia, modéstia e justa indignação.^(1,2) É pela prática de atos corajosos que o homem se torna corajoso. É pela prática de atos temperantes que o homem se torna temperante. É pela prática de atos justos que o homem se torna justo. É pela prática da paciência, verdade, simpatia e modéstia que o ser humano se torna paciente, verdadeiro [sincero], simpático [agradável].⁽¹⁾

Apesar da existência de muitas correntes éticas, a ética da virtude tem uma estrutura teórica sólida e útil para se compreender a moralidade, discernir o que se deve fazer e ser, defender virtudes específicas relacionadas a problemas morais correntes e compreender a psicologia moral das pessoas virtuosas.⁽²⁾ Numa menção ao conceito de virtude que, em Aristóteles, é a disposição que torna o homem bom e o faz desempenhar bem a sua função, é possível ter, como noção de virtude, o correto desempenho da função. No caso da bioética, para determinar [em essência] o que seria um homem bom, deve-se analisar não o homem em si, mas a função que ele desempenha.^(2,9)

Em análises clínicas, parte-se da ideia da prevalência do interesse do paciente e sua busca pela saúde e bem-estar. Obter o bom desempenho da função de analista clínico, conforme Aristóteles, é verificar a aproximação da conduta profissional a esse fim. A ética das virtudes poderia proporcionar uma base conceitual para a ética profissional. Neste sentido, a virtude poderia ser entendida como um conceito normativo para a ética da profissão de analista clínico.^(2,10)

Para a elaboração de uma teoria normativa da ética do profissional do laboratório clínico, baseada em virtudes, são elementos essenciais: a definição de *telos* [finalidade]: fato da doença (vulnerabilidade do paciente), ato de profissão (conhecimentos necessários à realização das análises laboratoriais) e ato de diagnóstico (direcionamento dos conhecimentos e técnicas para a produção do laudo laboratorial); a definição da virtude a ser aplicada (definida como traço de carácter que predispõe o indivíduo à excelência de intenções e de desempenho em relação à atividade das análises clínicas); determinação das virtudes passíveis de tornar o indivíduo um bom profissional das análises clínicas (fidelidade, honestidade intelectual, benevolência, desconsideração de interesses próprios, compaixão, justiça e prudência).⁽²⁾

Espera-se do analista clínico que ele exiba tais disposições quando essas forem requeridas e que elas sejam habituais à prática do profissional. Para um bom exercício das análises clínicas, deve haver um balanço entre o bem do paciente e as obrigações do profissional de laboratório.^(2,5,10)

REFERÊNCIAS

1. Auler JA, Bert, SM. A Ética das Virtudes e a Prática Médica nos Laboratórios de Reprodução Assistida. *Phronesis: Revista do Curso de Direito da FEAD*. 2010;6:80-99.
2. Van Hooff S. *Ética da Virtude*. Petrópolis: Editora Vozes. 2013, 277pp.
3. Dinucci AA. Relação entre Virtude e Felicidade em Sócrates. *Filosofia Unisinos*. 2009;10(3):254-64.
4. Feitosa ZML. A Questão da Unidade e do Ensino das Virtudes em Platão. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Tese, 2006, 167pp.
5. Silva SL. A Ética das Virtudes em Aristóteles. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale dos Sinos. Dissertação. 2008, 76pp.
6. Sangall IJ, Stefani J. Noções Introdutórias sobre Ética das Virtudes Aristotélicas. *Conjectura*. 2012;17(3):49-68.
7. Koike K, Lincoln PCL. Entre a *Epistêmê* e a *Phrónesis*: Antigas Lições para a Moderna Aprendizagem em Administração. Encontro da Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração-ANPAD, 2000. <http://www.anpad.org.br/enanpad/2000/html/enanpad2000-org-960-resumo.html>. Acesso em 10 set 2015.
8. Puentes FR. A *Téchne* em Aristóteles. *HypnoΣ*. 1998;3(4):129-35.
9. Nodari PC. A Ética Aristotélica. *Síntese Nova Fase*. 1997;24(78):383-410.
10. Petry FB. Princípios ou Virtudes na Bioética? *Controvérsia*. 2005;1(1):49-65.

Paulo Murillo Neufeld, PhD

Editor-Chefe da RBAC

Estresse oxidativo no lúpus eritematoso sistêmico

Oxidative stress in systemic lupus erythematosus

Thais Guimarães Barreira¹

Analucia Rampazzo Xavier²

Salim Kanaan³

Natalia Fonseca do Rosário⁴

Andréa Alice da Silva⁵

Resumo

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela elevada presença de autoanticorpos e por comprometer diversos órgãos e sistemas. O estresse oxidativo celular está envolvido no desenvolvimento das várias características clínicas observadas nesta doença, além de apresentar importante relação com a sua gênese e patogênese. Neste contexto, esse trabalho tem como objetivo fazer um levantamento bibliográfico das principais moléculas envolvidas no estresse oxidativo no LES e correlacionar seus efeitos no acompanhamento da evolução e patogênese dessa doença, como ferramentas de diagnóstico e prognóstico. Os marcadores de estresse oxidativo mais comuns encontrados foram o malondialdeído, o 4-hidroxi-nonenal, a 8-hidroxideoxiguanosina, o radical hidroxila, o óxido nítrico, além da substância glutathione e enzimas antioxidantes, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Sendo assim, embora apareçam algumas divergências entre a correlação de alguns marcadores de estresse oxidativo com a atividade da doença, a maioria dos estudos mostrou importante relação desses marcadores com o desenvolvimento e agravamento do LES. Apesar da necessidade de estudos longitudinais, podemos sugerir grande potencial das moléculas de estresse oxidativo como ferramenta no diagnóstico e prognóstico no LES.

Palavras-chave

Lúpus eritematoso sistêmico; Estresse oxidativo; Radicais livres; Espécies reativas de nitrogênio; Espécies reativas de oxigênio

INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela elevada presença de autoanticorpos e por provocar uma variedade de manifestações clínicas em diferentes sistemas do organismo, isoladamente ou em conjunto, como artrite, erupções cutâneas, vasculites, alterações nos sistemas nervoso central, renal e cardiopulmonar. Esta doença é comum em todo o mundo e apresenta altas taxas de incidência e prevalência, sendo mais frequente em mulheres durante o período reprodutivo, porém as formas mais graves são observadas nos homens e crianças.^(1,2) Há poucos relatos sobre a epidemiologia do LES no Brasil, embora se saiba que foram encontradas taxas de incidência semelhantes a de outros países, na região sul

do país.⁽²⁻⁴⁾ Devido às suas características clínicas e diferentes manifestações, as taxas de morbidade e mortalidade tornam-se igualmente elevadas.⁽⁵⁾

Embora a etiologia do LES ainda não esteja totalmente esclarecida, é sabido que a sua patogênese está associada tanto com predisposições genéticas quanto com influências ambientais, resultando em um desequilíbrio no sistema imunológico, levando à produção de autoanticorpos e formação de imunocomplexos. Esses imunocomplexos se depositam em diversos tecidos do organismo, sendo responsáveis pela ativação de células do microambiente tecidual e células do sistema imune, que, consequentemente, em cascata, liberam inúmeros mediadores inflamatórios, contribuindo para exacerbação da resposta inflamatória.^(6,7) Das várias especulações sobre os mecanismos

¹Farmacêutica-Bioquímica; Especialização em Ciências do Laboratório Clínico da UFRJ; Mestranda em Patologia - Depto. de Patologia, HUAP/UFF Niterói, RJ.

²Doutorado em Bioquímica pela USP-Ribeirão Preto. Professora Adjunto da Universidade Federal Fluminense – UFF – Departamento de Patologia.

³Mestrado em Biofísica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Professor Adjunto da Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói, RJ

⁴Biomédica; Especialização em Hematologia da UFRJ, Especialização em Patologia Clínica em Oncologia, INCA; Mestranda em Patologia – Departamento de Patologia, HUAP/UFF.

⁵Doutora em Ciências – Biologia Celular e Molecular pela Fiocruz. Professora Associada da Universidade Federal Fluminense – UFF. Departamento de Patologia.

Instituição: Universidade Federal Fluminense (UFF) – Departamento de Patologia – Niterói, RJ.

Artigo recebido em 10/04/2014

Artigo aprovado em 15/05/2015

envolvidos nesse processo, sabe-se que o estresse oxidativo, gerado pelo desequilíbrio entre a formação e a remoção de substâncias reativas, em decorrência da ativação celular exacerbada, tem papel primordial no desenvolvimento das manifestações clínicas observadas nesta doença.^(8,9) Mais recente, Perl observou que o estresse oxidativo no LES é compartimentado, iniciando-se nas células TCD4-CD8- e, progressivamente, atingindo outras células envolvidas na resposta imune e na fisiopatogenia do LES.⁽¹⁰⁾

Neste contexto, os marcadores de estresse oxidativo vêm sendo cada vez mais pesquisados e utilizados nos estudos sobre a patogênese da doença.⁽¹¹⁻¹⁸⁾

ESPÉCIES REATIVAS NA LESÃO CELULAR E NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

As espécies reativas, em geral, são formadas por compostos com um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, possuindo alta capacidade de reagir com várias substâncias celulares, o que acarreta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídios de membrana e agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. Assim, dentre as espécies reativas presentes no organismo, temos as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que são geradas, principalmente, pela atividade de algumas enzimas envolvidas nos processos de oxidação, como citocromo oxidase, xantina oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase e as isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), essenciais para o funcionamento celular.⁽¹⁹⁾ As ERO e ERN são bem conhecidas por desempenhar papéis paradoxais ao organismo, tanto causando benefícios como malefícios, através da indução de reações do tipo radicalares. Qualquer desequilíbrio destas reações pode levar ao estresse oxidativo celular.^(8,20-27)

Um exemplo de reação radicalar importante é o processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que é desencadeada pela reação das espécies reativas com os ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, provocando perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo celular e, conseqüentemente, morte celular. Essa reação gera como principal produto o malondialdeído.^(20,24,28,29)

Algumas espécies reativas provocam dano à estrutura do DNA. Quando o ataque é na desoxirribose, leva à ruptura da dupla hélice, gerando como produto a 8-hidroxideoxiguanosina. Entretanto, quando é nas bases nitrogenadas, pode ser reparado pela excisão de novos nucleotídeos. Em contrapartida, os danos oxidativos nas proteínas já sintetizadas não podem ser reparados, resultando na degradação irreversível dessas macromoléculas oxidadas pelos proteossomas, gerando, como um dos produtos de reação, o 4-hidroxinonenal.^(20,24,28,30)

No LES, o acúmulo de espécies reativas pode ser gerado pelas células inflamatórias, que são constantemente estimuladas pela presença de depósitos teciduais de imuno-

complexos, formados, principalmente, por autoanticorpos.⁽⁶⁾ Em virtude disso, o uso da quantificação de radicais livres e seus produtos como marcadores de estresse oxidativo celular poderia contribuir no acompanhamento da evolução e da patogênese do LES (Tabela 1), uma vez que o desenvolvimento das manifestações clínicas tem correlação direta com a presença de reações radicalares celulares.^(18,31-37)

Tabela 1

Espécies reativas	Tipos	Alvo das reações radicalares	Produtos formados	No LES	Referências
Espécies reativas de oxigênio (ERO)	Oxigênio Singlet O_2 $^1\Sigma_g^+$	Lipoperoxidação das Membranas	Malondialdeído (MDA)	↑	46,64,76 70
	Radical hidroxila ($HO^\bullet$)	Oxidação das Proteínas	$HO^\bullet$ - albumina (albumina amunogênica) $HO^\bullet$ - IgG (imunoglobulina imunogênica)	↑	56 2
	Ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Oxidação dos aminoácidos das proteínas (Catalase, albumina)	4-hidroxi-nonenal (HNE)	↑	11,27
		Oxidação do DNA			
	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Oxidação do DNA	8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG)	↑	32,33
Espécies reativas de nitrogênio (ERN)	Óxido Nítrico ($NO^\bullet$)	Hiperpolarização da Membrana Mitocondrial	Peroxinitritos	↑	18,36,47,48
	Nitritos ($NO_2^\bullet$) Nitratos ($NO_3^\bullet$)				
	Peroxinitritos ($ONOO^\bullet$)	Oxidação do DNA Oxidação dos aminoácidos	DNA imunogênico 3-Nitrotirosina	↑	1,18

Radical Hidroxila

O radical hidroxila ($HO^\bullet$) é considerado o mais deletério ao organismo, por ser altamente reativo, embora a meia-vida seja curta. É formado *in vivo*, principalmente pela redução do peróxido de hidrogênio por um metal de transição, normalmente ferro (Fe^{3+}) ou cobre (Cu^{2+}).⁽²⁰⁾ O $HO^\bullet$ vem sendo estudado em várias doenças, mostrando-se importante na oxidação de proteínas plasmáticas, como albumina e imunoglobulinas.^(14,34,38-40)

Alguns estudos têm demonstrado um importante papel do $HO^\bullet$ na etiologia da autoimunidade do LES.^(14,41) A reação deste radical com imunoglobulina G (IgG) humana altera a estrutura da imunoglobulina e, conseqüentemente, insere novos epítomos, tornando-a altamente imunogênica e induzindo um aumento significativo nos títulos de anticorpos anti-IgG. Estes dados são muito semelhantes aos observados no processo inflamatório do LES, que apresentam como característica grande diversidade das ligações antígeno-

anticorpo, e que estão de acordo com os achados de Rasheed e colaboradores, que observaram modificações na estrutura da albumina sérica pelo radical HO[•], tornando-a também muito imunogênica.^(14,41)

Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula produzida em diversas células através da oxidação da L-arginina. Dependendo do tipo celular, sua produção é catalisada por uma das três isoformas da NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) ou induzida (iNOS).⁽⁴²⁾ O aumento da produção de NO tem importante papel na patogênese de diversas doenças autoimunes, inclusive LES, devido à sua participação nas diferentes funções celulares, como a produção de citocinas, transdução de sinal, funções mitocondriais e apoptose.⁽⁴³⁾ O NO pode ter uma ação direta ou indireta no meio celular, através dos seus derivados peroxinitrito e superóxidos,⁽⁴⁴⁾ podendo ser esta espécie reativa, quando em quantidades alteradas, a causa ou consequência de alterações celulares no LES e de outras doenças.

Estudos experimentais de LES utilizando camundongos MRL/lpr, como o de Reilly e colaboradores, observaram uma redução significativa da atividade do LES acompanhada da redução da produção de NO e outras espécies reativas, depois do tratamento dos animais com inibidores específicos da iNOS, como o NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) e L-N⁶-(1-iminoetil) lisina (L-NIL).⁽⁴⁵⁾

Num estudo longitudinal, Oates e colaboradores demonstraram associações positivas entre a produção sérica de NO e a atividade da doença.⁽¹³⁾ De modo interessante, os pacientes com nefrite lúpica, confirmada através de biópsia, também apresentaram altas concentrações de NO sérico, sendo possível que o NO colabore para uma resposta pró-inflamatória, visto que ele promove a proliferação de células Th1, além de favorecer a síntese de IFN-γ e diferenciação dessas células por indução seletiva de IL-12Rβ2 via cGMP.⁽⁴⁶⁾

O excesso de NO aumenta a hiperpolarização mitocondrial dos linfócitos T de pacientes com LES, contribuindo para a desregulação dessas células e, consequentemente, afetando suas funções.⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ Corroborando, Nagy e colaboradores observaram que o aumento na produção de NO em monócitos de pacientes com LES afetam as funções de células T vizinhas, sugerindo, portanto, que essa desregulação dos linfócitos T colabora com os fenômenos de autoimunidade.⁽⁵⁰⁾

Malondialdeído

O malondialdeído (MDA) é um dialdeído formado como produto secundário da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, principalmente o ácido araquidônico. A alta reatividade dessa molécula permite sua atuação no interior e exterior da célula, interagindo com biomoléculas, como ácidos nucleicos e proteínas, oca-

sionando danos irreversíveis aos mecanismos que envolvem a funcionalidade celular.⁽⁵¹⁾ A quantificação do MDA nos sistemas biológicos, como marcador de estresse oxidativo, é um parâmetro importante para avaliação da lesão celular associada às diversas doenças sistêmicas, principalmente o LES.^(52,53)

Sendo assim, Shah e colaboradores observaram um aumento significativo das concentrações circulantes de MDA em pacientes com LES e correlação com a atividade da doença, sugerindo, portanto, que mecanismos de lesão celular decorrentes do processo de peroxidação lipídica estejam envolvidos no agravamento do quadro clínico.⁽¹⁶⁾ Resultados similares foram observados por Wang e colaboradores, através da quantificação de anticorpos anti-MDA.⁽⁵⁴⁾ Já Tewthanom e colaboradores observaram falta de correlação entre MDA e severidade da doença, fato este que pode ser explicado pela distinção em relação à terapêutica, já que, no primeiro estudo, os pacientes não foram submetidos a qualquer tipo de terapia anti-inflamatória.⁽⁵⁵⁾ Mais recentemente, Pérez e colaboradores, através da quantificação por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), observaram níveis maiores de MDA, em pacientes com LES, no entanto, sem correlação com a duração ou com a atividade da doença.⁽⁵⁶⁾

Embora existam na literatura resultados conflitantes, tudo indica que os níveis exacerbados de MDA estão relacionados com a lesão de membrana celular e, portanto, a quantificação desta molécula pode ser utilizada como um marcador de lesão celular no LES. Esses trabalhos também mostraram que há diferentes formas de quantificar o MDA.

De modo interessante, o MDA é capaz de oxidar a lipoproteína de baixa densidade (LDL), originando o ox-LDL. Apesar de existir uma reação cruzada entre anticorpos anti-ox-LDL e anticorpos anticardiolipina,⁽⁵⁷⁾ o ox-LDL tem sido correlacionado com manifestações cardiovasculares em pacientes com LES.⁽¹⁰⁾ Neste sentido, além da detecção direta do MDA, as modificações provocadas por este, seja nas proteínas ou nos lipídeos, são fortes candidatos a biomarcadores no LES, mas ainda são necessários novos estudos, levando em consideração a terapia que os pacientes são submetidos.

4-hidroxinonenal

O aldeído insaturado, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), é o produto mais importante da degradação peroxidativa de ácidos graxos ômega-6 e apresenta alta citotoxicidade, principalmente, devido à sua propriedade de formar bases de Schiff pela reação com aminoácidos, sobretudo com os resíduos de lisina e histidina presentes nas proteínas.⁽⁵⁸⁾

Estudo *in vitro* de modificação de proteínas endógenas, como a albumina (HSA) pelo HNE em pacientes com LES, demonstrou aumento da imunogenicidade da albumina, após a ligação do HNE, via indução de anticorpos anti-HSA-HNE, uma vez que a albumina fica com exposição de novos

epítomos pela mudança estrutural. Os autores sugerem que, *in vivo*, o aumento circulante da albumina modificada pela HNE seria capaz de estimular a produção de autoanticorpos, pelo reconhecimento destes diferentes epítomos.⁽¹²⁾

A ligação do HNE com outras proteínas presentes nas células, como a enzima catalase, induz à mudança estrutural e perda de funcionalidade em pacientes com LES. A ligação HNE-catalase provoca uma diminuição da sua atividade antioxidante e, consequentemente, desequilíbrio do estado redox celular, que é fortemente associado com o agravamento da doença.⁽⁵⁷⁾

8-hidroxideoxiguanosina

A 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) é um produto gerado da oxidação das bases nitrogenadas da molécula de DNA, através do ataque de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio.⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ A modificação estrutural na dupla hélice do DNA pode torná-las mais suscetíveis às interações com autoanticorpos do LES, promovendo, assim, o aumento da formação de complexos imunológicos.⁽⁶⁰⁾

Como exemplo de aplicação no LES, temos o trabalho desenvolvido por Maeshima e colaboradores, que utilizaram esse marcador para estudar os efeitos oxidativos danosos da alta intensidade da luz solar em pacientes com LES, observando níveis urinários significativamente mais elevados de 8-OHdG em pacientes doentes.⁽⁶²⁾

SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES NO LÚPUS ERYTEMATOSO SISTÊMICO

Normalmente, em condições fisiológicas, a produção das espécies reativas é balanceada por sistemas antioxidantes eficientes, enzimáticos e não enzimáticos, capazes de limitar os níveis intracelulares dessas substâncias e prevenir a indução de danos celulares.⁽⁶³⁾ Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e a glutatona peroxidase (GPx), as últimas envolvidas na redução e oxidação da glutatona. O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, como tocoferóis, ascorbato, ácido úrico, vitamina D, β -caroteno, transferrina, ceruloplasmina, mas destaca-se a glutatona forma reduzida (GSH).⁽⁶⁴⁾

Desordens ambientais, nutricionais, patológicas ou qualquer outro fator externo ou interno podem diminuir esses sistemas de defesa antioxidantes e levar ao desequilíbrio no estado redox, e, consequentemente, ao estresse oxidativo celular.⁽⁹⁾ Portanto, essas moléculas também são importantes marcadores utilizados na avaliação do dano oxidativo gerado em diversas doenças, inclusive em doenças autoimunes, como o LES.

As principais substâncias antioxidantes utilizadas atualmente como marcadores de estresse oxidativo no LES são a glutatona, as enzimas glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase.

Glutaciona

A glutatona é um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) composto por três aminoácidos: cisteína, ácido glutâmico e glicina. Em situações normais, a glutatona é encontrada em maior concentração sob a forma reduzida, descrita como GSH e em menor concentração sob a forma oxidada (GSSG), sendo a razão GSH/GSSG utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos. A GSH é responsável pela detoxificação do H_2O_2 e outras substâncias devido à sua forte capacidade redutora.^(65,66)

Tewthanom e colaboradores associaram, pela primeira vez, a diminuição nos níveis de GSH plasmáticos com os diferentes graus de severidade do LES, através da utilização do índice SLEDAI.⁽⁵⁵⁾ Contudo, em recente estudo em pacientes com LES, foi observada uma considerável diminuição nos níveis de GSH correlacionada ao aumento da expressão da enzima caspase-3 dos linfócitos, o que reflete apoptose. Esses resultados sugerem que a diminuição da GSH e de sua ação protetora predispõe as células à morte diretamente pela formação de poros mitocondriais, aumento da permeabilidade das membranas, além da ativação de enzimas apoptóticas.⁽¹⁷⁾

Glutaciona Peroxidase

Enzima envolvida na oxidação da glutatona, a GPx é responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos.⁽⁶⁴⁾ Apresenta-se sob quatro formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma de mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, a formação de hidroperóxido da timina pelo ataque ao DNA celular.^(67,68)

Essa molécula antioxidante foi um dos alvos de estudo para a avaliação do estresse oxidativo em pacientes com LES, onde foi observada que a diminuição da atividade enzimática tem relação direta com o dano celular e a atividade da doença, associada, principalmente, à nefrite e alopecia, sugerindo o uso da GPx e de outras substâncias antioxidantes como alvos terapêuticos.⁽¹¹⁾

Catalase

A CAT é uma enzima antioxidante endógena importante, sendo responsável pela desintoxicação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, limitando assim os efeitos deletérios dessa substância.⁽⁵⁷⁾ Assim, a CAT tem sido considerada um importante regulador de estresse oxidativo que pode interferir na evolução da doença autoimune.⁽⁶⁹⁾

D'Souza e colaboradores observaram que a CAT está principalmente sob a forma oxidada nos pacientes com LES,

ocasionando, portanto, uma diminuição significativa da sua atividade antioxidante. Por sua vez, essa ineficiência da enzima afeta ainda mais o equilíbrio oxidante-antioxidante celular, favorecendo, assim, o desenvolvimento de estresse oxidativo.⁽⁵⁷⁾

Superóxido dismutase

As enzimas superóxido dismutases encontradas em humanos são as associadas a íons: a cobre/zinco, a Cu/ZnSOD (citossol, lisossomos e núcleo) e ao manganês MnSOD (mitocondrial) ou na sua forma extracelular ECSOD.^(70,71)

A Cu/ZnSOD foi utilizada na avaliação do dano oxidativo em alguns trabalhos com pacientes com LES. Foi verificada uma diminuição da atividade da SOD, altos níveis de anticorpos anti-SOD circulantes e maiores quantidades de dienos conjugados nos pacientes com LES. A presença desses anticorpos foi associada ao aumento do dano causado pelos radicais livres.^(9,72) Em outros trabalhos, a diminuição da atividade da SOD e a baixa ação protetora antioxidante de outras substâncias foram correlacionadas com o aumento do estresse oxidativo no LES, o que, consequentemente, contribuiu com a patogênese desta doença, através do dano celular e tecidual gerado, causando disfunções em células imunológicas, estimulando a produção de autoantígenos e aumento da reatividade dos autoanticorpos.⁽⁷³⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos estudos obteve resultados relevantes e consistentes, mostrando a importante contribuição do estresse oxidativo para o desenvolvimento e agravamento do LES, mesmo utilizando metodologias diferentes. Para isso, foram analisados os marcadores mais importantes e atuais nesta doença, tanto radicais livres, quanto substâncias antioxidantes. O aumento de radicais livres, sejam eles espécies reativas ou produtos da lesão celular, geram uma resposta imunológica do tipo pró-inflamatória, visto que, em alguns estudos, ocorreu proliferação de células Th1 e síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , o que contribui ainda mais para ativação celular exacerbada, podendo ser primordial para o agravamento das manifestações clínicas do LES, como a nefrite e alopecia. Além disso, essas espécies contribuem para o desenvolvimento da autoimunidade desta doença, através da capacidade reativa dessas moléculas com algumas proteínas, como a IgG, albumina e a catalase, promovendo a inserção de novos epítomos em suas estruturas químicas, tornando-as altamente imunogênicas ou induzindo a perda da sua funcionalidade.

Na maioria dos estudos, foi observada a relação dos marcadores de estresse oxidativo com o desenvolvimento desta doença e, em alguns casos, com ainda mais relevância, foi demonstrada essa relação com a atividade e a severidade do LES (Figura 1).

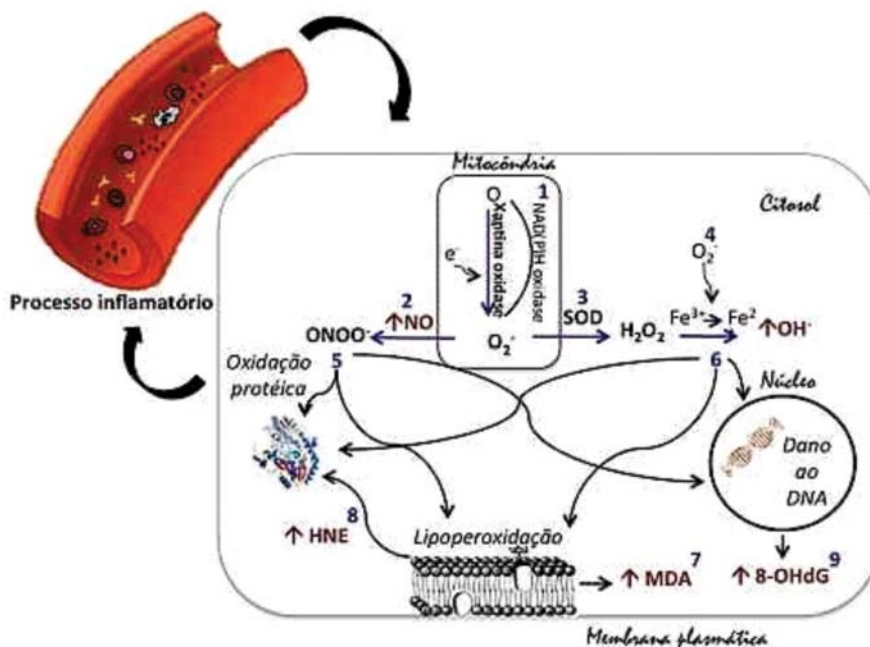


Figura 1. 1: O ânion radical superóxido é formado pela ação da enzima NAD(P)H-oxidase e xantina oxidase ou de forma não enzimática, através da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria; 2: Formação de peroxinitrito pela reação do ânion superóxido com o óxido nítrico; 3: Formação de peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase; 4: Formação de radical hidroxil na Reação de Fenton; 5: Danos ocasionados pelo potencial oxidativo do peroxinitrito (em proteínas, lipídios e DNA); 6: O radical hidroxil provoca dano na molécula de DNA, reagindo com as suas bases nitrogenadas e levando à quebra da cadeia dupla, além de causar danos na membrana plasmática oxidando os ácidos graxos insaturados, causando a lipoperoxidação e provocando modificações nas estruturas moleculares e nas funções de diversas proteínas, como albumina e imunoglobulina; 7: Lipoperoxidação gerando como produto o malondialdeído (MDA); 8: Lipoperoxidação do ácido graxo ômega-6 gerando como produto o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), que leva à oxidação proteica; 9: Lesão ao DNA pelos radicais hidroxil e peroxinitrito (ruptura da molécula) formando 8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG).

A baixa ação protetora antioxidante também foi correlacionada com o aumento do estresse oxidativo no LES, o que consequentemente contribuiu com a patogênese desta doença, através do dano celular e tecidual gerado, causando disfunções em células imunológicas, apoptose, aumento da produção de autoantígenos e da reatividade dos auto-anticorpos.

Portanto, podemos concluir que essas moléculas são promissores biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico do LES, além de contribuírem como ferramentas para avaliar o dano celular causado nesses pacientes.

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease characterized by exacerbated circulating autoantibodies and committing various organs and systems. The cellular oxidative stress is involved in the development of several clinical features observed in this disease, in addition to presenting important relationship with its genesis and pathogenesis. This work aims to make a bibliographical survey of the main molecules used as markers of oxidative stress in the SLE and their effects on the monitoring of the evolution and pathogenesis of this disease, as tools of diagnosis and prognosis. The most common oxidative stress markers found were the malondialdehyde, the 4-hydroxy-nonenal, 8-hydroxydeoxyguanosine, the hydroxyl radical and nitric oxide, besides the glutathione and the antioxidant enzymes, glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase. Thus, although some differences appear between the correlations of some markers of oxidative stress with the activity of the disease, most studies have shown important relationship of these markers with the development and aggravation of the SLE. Therefore, we suggest that these molecules may be used in the diagnosis and prognosis as a tool to evaluate cellular damage in SLE patients.

Keywords

Systemic Lupus Erythematosus; Oxidative stress; Free radicals; Reactive nitrogen species; Reactive oxygen species

REFERÊNCIAS

- Gurevitz SL, Snyder JA, Wessel EK, Frey J, Williamson BA. Systemic lupus erythematosus: a review of the disease and treatment options. *Consult Pharm*. 2013 Feb;28(2):110-21.
- Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 2010 Feb;39(4): 257-68.
- Nakashima CA, Galhardo AP, Silva JF, Fiorenzano GR, Santos AB, Leite MF, et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. *Rev Bras Reum*. 2011;51(3):235-9. [Article in English, Portuguese]
- Vilar MJP, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*. 2002; 11(8):528-32.
- Gordon C. Long-term complications of systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl*. 2002 Oct;41(10):1095-100.
- Gigante A, Gasperini ML, Afeltra A, Barbano B, Margiotta D, Cianci R, et al. Cytokines expression in SLE nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011 Jan;15(1):15-24.
- Yap DYH, Lai KN. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside. *Nephrol Carlton Vic*. 2013 Apr;18(4):243-55.
- Avalos I, Chung CP, Oeser A, Milne GL, Morrow JD, Gebretsadik T, et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. *Lupus*. 2007;16(3):195-200.
- Kurien BT, Scofield RH. Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus. *Life Sci*. 2003 Aug 15;73(13): 1655-66.
- Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Nov;9(11):674-86.
- Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis*. 2011 Oct;14(4):325-31.
- Khatoun F, Moinuddin, Alam K, Ali A. Physicochemical and immunological studies on 4-hydroxynonenal modified HSA: implications of protein damage by lipid peroxidation products in the etiopathogenesis of SLE. *Hum Immunol*. 2012 Nov;73 (11):1132-9.
- Oates JC, Shaftman SR, Self SE, Gilkeson GS. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Jan;58(1):263-72.
- Rasheed Z, Sheikh Z, Ahmad R, Rasheed N, Sheikh N, Ali R, et al. Enhanced recognition of reactive oxygen species damaged human serum albumin by circulating systemic lupus erythematosus autoantibodies. *Autoimmunity*. 2007 Nov;40(7):512-20.
- Segal BM, Thomas W, Zhu X, Diebes A, McElvain G, Baechler E, et al. Oxidative stress and fatigue in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012 Aug;21(9):984-92.
- Shah D, Kiran R, Wanchu A, Bhatnagar A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol Lett*. 2010 Mar 10;129(1):7-12.
- Shah D, Sah S, Wanchu A, Wu MX, Bhatnagar A. Altered redox state and apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*. 2013 Apr;218(4):620-7.
- Wang G, Pierangeli SS, Papalardo E, Ansari GAS, Khan MF. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Arthritis Rheum*. 2010 Jul;62(7):2064-72.
- Júnior LR, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova*. 2001;24(1):112-9.
- Barreiros A, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova*. 2006;29(1):113.
- Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*. 1996 May;47(3):233-61.
- Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*. 1998 Oct;19(4-5):221-357.
- Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):378-84.
- Nathan C, Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol*. 2013 May;13(5):349-61.
- Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):385-400.
- Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1984;105:273-82.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006 Mar 10;160(1):1-40.
- Ronsein GE, Miyamoto S, Bechara E, Mascio P, Martinez GR. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Quím Nova*. 2006;29(3):563-8.
- Klein RA. The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Sep 8;210(3):486-9.

30. Evans MD, Cooke MS, Akil M, Samanta A, Lunec J. Aberrant processing of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 14; 273(3):894-8.
31. Camandola S, Poli G, Mattson MP. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J Neurochem*. 2000 Jan;74(1): 159-68.
32. Hartley DP, Kroll DJ, Petersen DR. Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: detection of 4-hydroxynonenal- and malondialdehyde-protein adducts. *Chem Res Toxicol*. 1997 Aug;10(8):895-905.
33. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc*. 1973 Aug;32(8):1870-4.
34. Praticò D. F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis*. 1999 Nov 1;147(1):1-10.
35. Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, et al. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Für Tierernährung*. 1999;52(3):203-22.
36. Singh RB, Shinde SN, Chopra RK, Niaz MA, Thakur AS, Onouchi Z. Effect of coenzyme Q10 on experimental atherosclerosis and chemical composition and quality of atheroma in rabbits. *Atherosclerosis*. 2000 Feb;148(2):275-82.
37. Wu T, Xie C, Han J, Ye Y, Weiel J, Li Q, et al. Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2012;7(6):e37210.
38. Rasheed Z, Ahmad R, Rasheed N, Ali R. Reactive oxygen species damaged human serum albumin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2007 Sep;26(3):395-404.
39. Rasheed Z. Hydroxyl radical damaged immunoglobulin G in patients with rheumatoid arthritis: biochemical and immunological studies. *Clin Biochem*. 2008 Jun;41(9):663-9.
40. Rasheed Z, Ahmad R, Ali R. Structure and immunological function of oxidised albumin in lung cancer: its potential role as a biomarker of elevated oxidative stress. *Br J Biomed Sci*. 2009;66(2):67-73.
41. Al-Shobaili HA, Al Robaee AA, Alzolibani A, Khan MI, Rasheed Z. Hydroxyl radical modification of immunoglobulin G generated cross-reactive antibodies: its potential role in systemic lupus erythematosus. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2011;4:11-9.
42. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Zurakowski A. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism*. 2004 Oct; 53(10):1268-73.
43. Vladutiu AO. Role of nitric oxide in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995 Jul;76(1 Pt 1):1-11.
44. Habib S, Ali A. Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem IJCB*. 2011 Jan;26(1):3-17.
45. Reilly CM, Farrelly LW, Viti D, Redmond ST, Hutchison F, Ruiz P, et al. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by pharmacologic inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Kidney Int*. 2002 Mar;61(3):839-46.
46. Niedbala W, Wei X-Q, Campbell C, Thomson D, Komai-Koma M, Liew FY. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25): 16186-91.
47. Nagy G, Géher P, Koncz A, Perl A. [Signal transduction abnormalities in systemic lupus erythematosus]. *Orv Hetil*. 2005 Jul 31; 146(31): 1625-30.
48. Perl A, Fernandez DR, Telarico T, Doherty E, Francis L, Phillips PE. T-cell and B-cell signaling biomarkers and treatment targets in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2009 Sep;21(5):454-64.
49. Perl A. Emerging new pathways of pathogenesis and targets for treatment in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2009 Sep;21(5):443-7.
50. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):210.
51. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*. 2001;37(3):293-303.
52. Amara A, Constans J, Chaugier C, Sebban A, Dubourg L, Peuchant E, et al. Autoantibodies to malondialdehyde-modified epitope in connective tissue diseases and vasculitides. *Clin Exp Immunol*. 1995 Aug;101(2):233-8.
53. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 2000 Jun 9;742(2):315-25.
54. Wang G, Li H, Firoze Khan M. Differential oxidative modification of proteins in MRL+/+ and MRL/lpr mice: Increased formation of lipid peroxidation-derived aldehyde-protein adducts may contribute to accelerated onset of autoimmune response. *Free Radic Res*. 2012 Dec;46(12):1472-81.
55. Tewthanom K, Janwityanuchit S, Totemchockchayakarn K, Panomvana D. Correlation of lipid peroxidation and glutathione levels with severity of systemic lupus erythematosus: a pilot study from single center. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Société Can Sci Pharm*. 2008;11(3):30-4.
56. Pérez YG, Pérez LCG, Netto RCM, Lima DSN, Lima ES. Malondialdeído e grupo sulfidril como biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reum*. 2012;52(4):656-60.
57. D'souza A, Kurien BT, Rodgers R, Shenoi J, Kurono S, Matsumoto H, et al. Detection of catalase as a major protein target of the lipid peroxidation product 4-HNE and the lack of its genetic association as a risk factor in SLE. *BMC Med Genet*. 2008;9:62.
58. Moore K, Roberts LJ 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 1998 Jun;28(6):659-71.
59. Collins AR, Horváthová E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans*. 2001 May;29(Pt 2):337-41.
60. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. 8-Hydroxy-deoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett*. 1994 Jul 11;348 (2):131-8.
61. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2004 Jan;339(1-2):1-9.
62. Maeshima E, Liang X-M, Otani H, Mune M, Yukawa S. Effect of environmental changes on oxidative deoxyribonucleic acid (DNA) damage in systemic lupus erythematosus. *Arch Environ Health*. 2002 Oct;57(5):425-8.
63. Tam LS, Li EK, Leung VYF, Griffith JF, Benzie IFF, Lim PL, et al. Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. *J Rheumatol*. 2005 Feb;32(2):275-82.
64. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Oxford; 2007.
65. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2003 Jul 1;333(1):19-39.
66. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura J de F, Manfredini V, Benfato M da S, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30(5):1323-38.

67. Czuczajko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E, Halota W, Kedziora J. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(4):1147-54.
68. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000 Jul 15;356(9225):233-41.
69. Ahsan H, Ali A, Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* 2003 Mar;131(3):398-404.
70. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2007 Feb;115(2):81-103.
71. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 8;533(1-3):222-39.
72. Mansour RB, Lassoued S, Gargouri B, El Gaïd A, Attia H, Fakhfakh F. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2008 Apr;37(2):103-8.
73. Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A. Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology.* 2011 Sep;216(9):1010-7.

Correspondência

Thais Guimarães Barreira

*Rua Marquês do Paraná, 303,
Hospital Universitário Antônio Pedro, 4o andar
Departamento de Patologia, Sala 4
24033-900 - Niterói, RJ*

Análise da mobilização e coleta de células-tronco hematopoiéticas do sangue periférico (CTHSP) para transplante autólogo no Hospital Universitário de Santa Maria, RS

Analysis of the mobilization and collection of peripheral blood stem cells (PBSC) for autologous transplantation in the University Hospital of Santa Maria, RS

Valusia Scapin¹

Dalnei Veiga Pereira²

Waldir Veiga Pereira³

Liliane Zimmermann de Oliveira⁴

Cristiane Fração Diefenbach⁵

Virgínia Maria Côser⁶

José Edson Paz da Silva⁷

Resumo

Objetivo: Avaliar os resultados da mobilização e coleta de células-tronco hematopoiéticas do sangue periférico (CTHSP) e identificar as características dos pacientes atendidos na instituição. **Métodos:** Foram revisados retrospectivamente os prontuários de 176 pacientes com diagnósticos de Mieloma Múltiplo (MM), Linfoma de Hodgkin (LH), Linfoma não Hodgkin (LNH), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e outras neoplasias no período de dezembro de 1996 e 2011. **Resultados:** A mediana de idade dos pacientes foi de 42 anos, sendo 76,6% adultos e 23,3% pediátricos. Os diagnósticos mais frequentes foram MM (30,7%), LH (26,7%) e LNH (19,9%). Os métodos e regimes de mobilização incluíram o uso de G-CSF associado ou não a diferentes quimioterápicos: ciclofosfamida; ifosfamida, carboplatina e etoposídeo (ICE) e quimioterápicos relacionados ao tratamento do paciente. Foram realizadas 203 mobilizações e 474 coletas com média de 2,33 coletas por paciente. O regime de mobilização com melhor rendimento de células CD34+ foi G-CSF associado a quimioterápicos relacionados ao tratamento do paciente. A mediana de rendimento de células nucleadas totais obtida no estudo foi $7,01 \times 10^9/\text{kg}$ e de células CD34+ foi $2,63 \times 10^6/\text{kg}$. Dezoito pacientes (10,2%) não atingiram o número desejado após mobilização e coleta, sendo que a maioria dos pacientes (89,8%) atingiu a contagem de células CD34+ esperada. **Conclusão:** Constatou-se que fatores como o diagnóstico, o tratamento prévio de quimioterapia e radioterapia, o regime de mobilização, a contagem de leucócitos no início da coleta, os dias de administração de G-CSF e os dias pós-quimioterapia de mobilização necessitam ser considerados para a coleta de CTHSP, sendo que antes dos procedimentos cada paciente deve ser avaliado em relação à sua doença e fase de evolução.

Palavras-chave

Transplante de células-tronco hematopoiéticas; Leucaférese; Mobilização de células-tronco hematopoiéticas

INTRODUÇÃO

O tratamento com células-tronco hematopoiéticas (CTH) é uma das modalidades de terapia celular que tem mostrado crescente eficácia no tratamento de pacientes, adultos e crianças, com doenças malignas e benignas.⁽¹⁾

Apesar de representar menos de 0,05% das células sanguíneas em condições normais, o aumento das células CD34+ circulantes pode ser alcançado utilizando-se vários regimes de mobilização. A maneira mais usada para promover a circulação de células CD34+ envolve o uso de fatores de crescimento hematopoiéticos, que podem ser usados com ou

¹Farmacêutica Bioquímica. Mestrado pela Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS.

²Médico e professor adjunto de Hematologia da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Especialista em Hematologia e Hemoterapia.

³Professor Titular de Hematologia-Oncologia da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS.

Doutorado em Oncologia-Hematologia pela Universidade de São Paulo – USP – São Paulo, SP.

⁴Farmacêutica-bioquímica do Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM. Mestrado em Engenharia de Produção pela Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS.

⁵Médica do Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM – Santa Maria, RS.

⁶Médica do Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM – Santa Maria, RS.

Doutorado em Genética pela Universidade Federal do Paraná – UFPR – Curitiba, PR.

⁷Professor Doutor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS.

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria – Hospital Universitário de Santa Maria – Santa Maria, RS.

Artigo recebido em 15/01/2014

Artigo aprovado em 13/07/2015

sem associação à quimioterapia. A combinação de fator de crescimento e quimioterapia resulta em uma maior mobilização das células para o sangue periférico. A citocina mais comumente usada é o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) devido à sua eficácia quando comparada com outras (GM-CSF, SCF, eritropoetina) e por apresentar um perfil de toxicidade relativamente baixo.⁽²⁾

A mobilização de células-tronco com G-CSF, sem quimioterapia associada, em pacientes com câncer, pode oferecer algumas vantagens como prevenção de neutropenia febril, transfusões adicionais e também a facilidade de determinar o cronograma de coleta sem determinação diária de células CD34+ no sangue periférico.⁽³⁾

Este estudo retrospectivo da mobilização e coleta de células-tronco hematopoiéticas do sangue periférico (CTHSP) para transplante autólogo teve como objetivo avaliar os resultados destes procedimentos e identificar o perfil dos pacientes atendidos na instituição.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado através da revisão dos prontuários de 176 pacientes submetidos à mobilização e coleta de CTHSP para transplante autólogo, atendidos no Centro de Transplante de Medula Óssea (CTMO) e Centro de Tratamento da Criança e Adolescente com Câncer (CTCriaC) do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no período de dezembro de 1996 a dezembro de 2011. O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e aprovado sob nº 0106.0.243.000-11.

As variáveis avaliadas foram sexo, idade, diagnóstico, tratamento prévio de quimioterapia e radioterapia, regime de mobilização, contagem de leucócitos no início da coleta, dias de administração de G-CSF e dias pós-quimioterapia de mobilização, número de coletas, quantidade de células nucleadas totais e quantidade de células CD34+ coletadas.

As mobilizações das CTH da medula óssea foram realizadas utilizando-se diferentes regimes de quimioterapia associados ao G-CSF ou somente com G-CSF. A dose de G-CSF foi de 10 mcg/kg, via subcutânea, administrada diariamente até o último dia de coleta. A quantidade mínima de células CD34+ desejada era de $2,0 \times 10^6/\text{kg}$.

As coletas foram realizadas por aférese e iniciadas quando os leucócitos do sangue periférico atingiam mais de $1,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ para os pacientes mobilizados com G-CSF e quimioterapia, e, para os que receberam somente G-CSF, as coletas foram determinadas de acordo com a evolução diária dos hemogramas. Os procedimentos foram realizados pela equipe do Banco de Sangue e do Centro de Transplante de Medula Óssea (CTMO) em três equipamentos: Baxter CS3000 Plus (dezembro 1996 a maio 2001), Fresenius AS 104 (julho 2003 a abril 2004) e Cobe Spectra (julho 2000 a junho 2011). A solução utilizada como anticoagulante foi ACD-A. Alguns dos pacientes que não atingiram o mínimo

de células necessário na primeira mobilização foram posteriormente remobilizados, enquanto que, em outros, o procedimento não foi repetido.

A quantidade de células CD34+ nas amostras foi determinada por citometria de fluxo pelo Laboratório de Imunologia de Transplantes do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre no período de dezembro 1996 a abril 2002 e, a partir de maio 2002 a dezembro 2011, as análises foram realizadas no HUSM por citometria de fluxo em equipamento FACS Calibur (Becton Dickinson), conforme o protocolo ISHAGE (*International Society for Hemotherapy and Graft Engineering*). Foram usados anticorpos monoclonais fluorescentes CD34-PE (flicoeritrina) e CD45-FITC (fluoresceína), sendo analisados 200.000 eventos em cada amostra.

As CTHSP foram criopreservadas no laboratório de Criopreservação do Serviço de Hematologia-Oncologia do HUSM em câmara de congelamento à taxa programável (Cryoson BV-6, Germany), utilizando-se junto (DMSO) como agente crioprotetor na concentração de 10%. As bolsas contendo as CTHSP foram armazenadas em tanque de nitrogênio líquido na fase de vapor até o momento do transplante.

Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva das variáveis do estudo. A análise técnica estatística dos dados foi efetuada pelo teste de Kruskal-Wallis. Para as variáveis nominais foi usado o teste do qui-quadrado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As variáveis coletadas foram armazenadas em um banco de dados (Excel®2007) e analisadas pelo programa *Statistical Package for Social Science* 15.0 (SPSS).

RESULTADOS

Características da população pesquisada

Foram analisados 176 pacientes, sendo 98 do sexo masculino (55,7%) e 78 do sexo feminino (44,3%), com idades entre 01-69 anos (mediana 42 anos). Do total de pacientes, 41 (23,3%) pertenciam ao grupo com idade de até 21 anos, e 135 (76,7%) eram adultos. Quanto aos diagnósticos foram analisados 54 pacientes com Mieloma Múltiplo (MM – 30,7%), 47 com Linfoma de Hodgkin (LH – 26,7%), 35 com Linfoma não Hodgkin (LNH – 19,9%), 16 com Leucemia Mieloide Aguda (LMA – 9,1%), 24 com outras neoplasias (13,6%) – cinco com Tumor de Wilms, três com Tumor de Testículo, seis com Sarcoma de Ewing, três com Câncer de Mama, dois com Neuroblastoma, um com Meduloblastoma, um com Macroglobulinemia, um com Tumor de Sistema Nervoso Central (SNC), um com Amiloidose e um com PNET.

Foi observado que, apesar da amostra conter um percentual maior de homens (55,7%), não existiu diferença significativa quanto ao sexo. Quanto à idade, a maioria dos pacientes tinha mais de 21 anos (76,6%). Na avaliação do tipo de diagnóstico, há uma diferença significativa entre MM

(30,7%) e LH (26,7%) em relação à LMA (9,1%) e outras neoplasias (13,6%) - ($P<0,0001$).

Todos os pacientes tinham sido previamente submetidos a tratamento antes da mobilização. Estas terapias foram classificadas conforme as principais drogas utilizadas em: outras drogas; agentes alquilantes; mitoxantrone; análogos da platina; associação de agentes alquilantes e mitoxantrone; associação de agentes alquilantes e análogos da platina; associação de mitoxantrone e análogos da platina. Trinta e um pacientes (17,6%) tinham recebido radioterapia prévia à mobilização (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos pacientes submetidos à mobilização e coleta

Variáveis	Frequência (N)	Percentual (%)	P-valor
Sexo			
Feminino	78	44,3	0,132
Masculino	98	55,7	
Total (N)	176	100	
Idade			
≤ 21	41	23,3	<0,0001
>21	135	76,7	
Diagnóstico			
MM	54	30,7	<0,0001
LH	47	26,7	
LNH	35	19,9	
LMA	16	9,1	
Outras neoplasias	24	13,6	
Quimioterapia prévia			
Outras drogas	65	36,9	<0,0001
Agentes alquilantes	47	26,7	
Mitoxantrone	03	1,7	
Análogos da platina	04	2,3	
Alquilantes com mitoxantrone	02	1,1	
Alquilantes com análogos da platina	53	30,1	
Mitoxantrone com análogos da platina	02	1,1	
Radioterapia			
Sim	31	17,6	<0,0001
Não	145	82,4	

Mobilização das células-tronco

Em 152 pacientes foi realizada apenas uma mobilização, enquanto que em 24 pacientes foram realizadas duas ou três, totalizando 203 mobilizações. A mobilização

foi realizada com os seguintes regimes: ciclofosfamida associado a G-CSF em 111 (54,1%) pacientes; ifosfamida, carboplatina e etoposide (ICE) associado a G-CSF em 25 (12,2%); outros quimioterápicos relacionados ao tratamento do paciente associados a G-CSF em 19 (9,3%) e somente G-CSF em 48 (23,4%) pacientes.

No grupo analisado, 23,4% (48) das aféreses foram realizadas após G-CSF e 76,4% (155) após quimioterapia associada ao G-CSF.

Quando comparado o número de células nucleadas totais com os regimes de mobilização adotados, foi encontrado um rendimento maior no regime em que foi usado somente G-CSF em relação aos demais ($P<0,0001$). Quanto ao número de células CD34+ obtido quando comparados os regimes de mobilização, um rendimento maior foi observado entre os pacientes que foram submetidos a outros quimioterápicos relacionados ao tratamento do paciente associados ao G-CSF que não ciclofosfamida e ICE ou somente G-CSF ($P=0,003$) (Tabela 2).

Na correlação dos regimes de mobilização com o rendimento de células CD34+ para MM (1 e 4), LH (1, 2, 3 e 4) e LMA (1, 3 e 4) não houve diferença estatística entre os esquemas adotados ($P=0,240$; $P=0,792$ e $P=0,268$ respectivamente). Para LNH e outras neoplasias, o melhor regime de mobilização foi G-CSF associado a quimioterápicos relacionados ao tratamento do paciente (3), que demonstrou diferença estatística dos demais esquemas (1, 2 e 4), com $P=0,009$ e $P=0,004$ respectivamente.

Quanto ao número de coletas em relação ao regime de mobilização, observa-se que existiu diferença estatística entre os esquemas adotados ($P=0,003$), com maior número de coletas para os pacientes que usaram somente G-CSF (4) comparados com os esquemas que associaram G-CSF com ciclofosfamida ou ICE (1 e 2).

Coleta das CTHSP

Foram realizadas 474 coletas, com média de 2,33/paciente. O início da coleta nos pacientes mobilizados somente com G-CSF foi entre os dias 2 e 9 (mediana 3 dias), para os pacientes que foram mobilizados com G-CSF em associação com a quimioterapia entre os dias 9 e 19 (mediana 12 dias) pós-quimioterapia e após 2 e 18 dias de administração de G-CSF (mediana 4 dias). Os leucócitos do primeiro dia de coleta variaram entre 800 e 64.300/ μ L (mediana 5.500/ μ L). O rendimento de células nucleadas

Tabela 2 - Comparação de rendimentos com regimes de mobilização

Variáveis	Ciclofosfamida e G-CSF (1)	ICE e G-CSF (2)	Outros quimioterápicos e G-CSF (3)	Somente G-CSF (4)	P-valor
Md(1°Q-3°Q)*					
Células nucleadas totais $\times 10^8$ /kg	6,35 (3,95 - 8,38)	8,21 (3,98 - 4,51)	7,08 (4,79 - 12,25)	12,90(7,44 -17,68)	<0,0001
Células CD34+ $\times 10^6$ /kg	2,84 (2,02 -5,32)	2,44 (1,96 -5,02)	4,46 (2,72 -9,97)	2,19 (1,23 -2,79)	0

*Md (1°Q-3°Q) - mediana (1°Quartil-3°Quartil)

totais obtido foi entre 0,36 e 52,96x10⁸/kg (mediana 7,01), enquanto o rendimento de células CD34+ foi entre 0,0 e 29,86x10⁶/kg (mediana 2,63).

Dos 176 pacientes submetidos à coleta, 18 (10,2%) não atingiram o número desejado de células CD34+, sendo três MM, um LH, seis LNH, quatro LMA, um Sarcoma de Ewing, um Tumor de Testículo e dois Tumor de Wilms.

Quatro pacientes foram novamente mobilizados e não atingiram a quantidade mínima de células CD34+ (um MM, um LMA e dois LNH) enquanto 14 pacientes não foram novamente mobilizados por apresentarem contagem de células CD34+ insuficiente.

Quando comparado o número de coletas necessárias para atingir a quantidade mínima de células CD34+ com os diagnósticos, foi encontrada diferença entre MM e LH (P=0,004). Para a variável número de leucócitos do início da coleta foi observada diferença entre os diagnósticos LMA e outras neoplasias com MM que tem a menor mediana (P<0,0001). O número de células nucleadas totais obtido nos diagnósticos MM, LH e LNH demonstra diferença significativa com os diagnósticos de LMA e outras neoplasias, que apresentaram rendimentos maiores (P=0,001). Quanto ao número de células CD34+ obtido foi demonstrada diferença entre os diagnósticos de MM e os demais, com rendimento maior no MM (P=0,047) (Tabela 3).

Não foi observada influência do sexo no rendimento de células nucleadas totais (P=0,327) e células CD34+ obtidas nas coletas (P=0,415), porém foi encontrada uma diferença significativa no rendimento de células nucleadas totais em relação à idade dos pacientes, sendo que aqueles com idade ≤ 21 anos obtiveram um rendimento maior (P=0,005).

Não foi encontrada influência da radioterapia nas coletas quanto ao rendimento de células nucleadas totais e células CD34+ (P=0,208 e P=0,269).

Na análise de comparação dos regimes quimioterápicos prévios com o número de células nucleadas totais foi encontrada uma média de rendimento menor nos pacientes que foram submetidos à associação de agentes alquilantes e mitoxantrone (4) e à associação de mitoxantrone e derivados da platina (6) em relação ao grupo de pacientes que foram submetidos somente aos derivados da platina (3) – P=0,021. Os pacientes submetidos a agentes alquilantes (1) também obtiveram uma média de rendimento de células nucleadas totais maior que as do grupo submetido à associação deste com mitoxantrone (4), enquanto que para o rendimento de células CD34+ não houve diferença entre os grupos (P=0,086) (Tabela 4).

O rendimento diário de células coletadas dos pacientes foi avaliado apenas até o terceiro dia porque a maioria das coletas foi concentrada neste período de tempo. Foi observado que existiu diferença significativa entre os diagnósticos somente para células CD34+x10⁶/kg D1 (primeiro dia de coleta), sendo que essa diferença é encontrada entre o diagnóstico MM, que tem a maior média de rendimento nessa variável e difere do LNH e do LH que tem as menores médias, respectivamente (P=0,013). Os outros diagnósticos não diferem, nem da menor e nem da maior média. Para as demais variáveis do rendimento diário não houve diferença entre os diagnósticos.

Foi observado rendimento médio de células CD34+x10⁶/kg no dia D1 maior em relação ao rendimento do dia D3 (terceiro dia de coleta) na maioria dos diagnósticos.

Tabela 3 - Comparação entre as variáveis da coleta e diagnósticos

Variáveis Md (1°Q-3°Q)*	MM	LH	LNH	LMA	Outras neoplasias
Nº de coletas	2,00 (1,00-2,00)	3,00 (2,00-3,00)	2,00 (2,00-3,00)	2,00 (2,00-3,00)	2,50 (1,25-3,00)
Leucócitos no início da coleta/µL	3450 (1550-8200)	4700 (2300-10300)	3400 (1800-8300)	11650 (3650-38350)	14350 (5625-29675)
Células nucleadas totais x10 ⁸ /kg	5,76 (3,19-7,80)	8,07 (4,74-11,11)	6,85 (4,79-13,29)	7,20 (5,49-13,48)	12,21 (6,73-17,92)
Células CD34+ x10 ⁶ /kg	3,99 (2,71-6,31)	2,63 (1,97-4,57)	2,40 (1,59-4,02)	2,59 (1,43-5,17)	2,42 (2,04-5,43)

*Md (1°Q-3°Q) - mediana (1°Quartil-3°Quartil)

Tabela 4 - Quimioterapias prévias

Variáveis	0	1	2	3	4	5	6	P-valor
Md(1°Q-3°Q)*	6,4	10,1	6,9	10,4	2,3	6,8	5,6	0,021
Células nucleadas totais x10 ⁸ /kg	(3,5-9,0)	(6,2-13,8)	(5,7-12,8)	(5,9-16,3)	(0,9-3,6)	(4,5-15,6)	(4,4-6,8)	
Células CD34+ x10 ⁶ /kg	3,4 (2,3-5,3)	2,8 (1,9-6,7)	4,5 (1,6-7,3)	7,8 (1,6-12,2)	5,3 (5,3-5,3)	2,4 (1,9-3,9)	1,4 (0,4-2,4)	0,086

*0- outras drogas, 1- agentes alquilantes, 2- mitoxantrone, 3- análogos da platina, 4- associação de agentes alquilantes e mitoxantrone, 5- associação de agentes alquilantes e análogos da platina, 6- associação de mitoxantrone e análogos da platina

DISCUSSÃO

As células-tronco hematopoiéticas mobilizadas para o sangue periférico têm sido cada vez mais usadas para transplante com vantagens bem estabelecidas sobre as da medula óssea.^(3,4) Este estudo incluiu um grupo de pacientes bastante heterogêneo quanto aos diagnósticos de base, idade e regimes quimioterápicos utilizados antes das mobilizações e coletas. Assim, a análise dos resultados obtidos foi realizada conhecendo estas variáveis limitantes de comparação.

O início das coletas neste grupo foi baseado na recuperação de leucócitos dos pacientes após o uso de G-CSF ou G-CSF associado a diferentes regimes de quimioterapia demonstrando que é possível realizar este procedimento sem determinação prévia do número de células CD34+ no sangue periférico. A contagem de células CD34+ é melhor marcador para o rendimento de células na leucoaférese que a contagem de leucócitos do sangue periférico, sendo recomendado para determinar o tempo de coleta e para monitoramento da qualidade do produto reinfundido no paciente. Determinar o tempo ideal para iniciar a coleta de CTH após a mobilização é fundamental para se obter um bom rendimento. Muitas controvérsias ainda existem acerca do início do procedimento de aférese.⁽⁵⁾

As estratégias mais comuns para mobilização incluem apenas fatores de crescimento ou fatores de crescimento após quimioterapia. Porém, é ainda controversa a questão de qual o método mais seguro e mais previsível para mobilização de CTH.^(6,7) Neste estudo foi observado um maior rendimento de células nucleadas totais nos pacientes que foram mobilizados somente com G-CSF, porém o rendimento das células CD34+ foi maior quando associado G-CSF a quimioterapia. A combinação de fatores de crescimento e quimioterapia resulta em um efeito aditivo, ocorrendo uma maior mobilização de células-tronco para o sangue periférico.^(4,8) Para os pacientes que foram mobilizados com quimioterápicos relacionados ao tratamento do paciente associados ao G-CSF foi obtido um rendimento superior de células CD34+ aos demais esquemas adotados. Segundo Bensinger et al., a mobilização com quimioterápicos relacionados ao tratamento do paciente em combinação com G-CSF são regimes frequentemente bem sucedidos.⁽⁶⁾ O regime de mobilização com altas doses de ciclofosfamida associada a fatores de crescimento hematopoiéticos foi usado em 54,1% dos pacientes incluídos neste estudo. A administração de ciclofosfamida com G-CSF é muito difundida como um regime efetivo para mobilização de CTH e altamente eficaz contra células tumorais.⁽⁶⁾

Neste estudo não foi encontrado influência do sexo, idade e radioterapia prévia no rendimento de células CD34+. Em diferentes estudos, o efeito da idade do paciente na quantidade de células CD34+ obtidas foi analisado e revelou-se contraditório.^(9,10) Quanto às quimioterapias prévias realiza-

das não foi observada influência no rendimento de células CD34+, exceto um rendimento menor no número de células nucleadas totais dos pacientes que foram submetidos à mitoxantrone associado a agentes alquilantes e/ou aos derivados da platina, sendo esta variável difícil de mensurar devido ao grande número de agentes quimioterápicos usados em diferentes doses e combinações. Haas et al.,⁽¹¹⁾ em seu estudo, evidenciaram a quimioterapia e a radioterapia prévias como importantes fatores adversos para a eficiência da coleta. Mendrone Jr.⁽¹²⁾ relatou insucesso na mobilização de pacientes com prévia administração de Mitoxantrone ou agentes alquilantes. Para pacientes com administração prévia de derivados da platina e radioterapia não encontrou influência significativa na mobilização.

Na avaliação do rendimento diário de células CD34+ foi constatado um rendimento médio superior no primeiro dia de coleta em relação ao terceiro dia. O aumento das células-tronco no sangue periférico resultante do processo de mobilização é de curta duração, sendo assim necessário definir a época ideal para a aférese.⁽¹³⁾ Bini-Antunes et al., em um grupo de pacientes pediátricos, também demonstraram um rendimento de células CD34+ maior no primeiro dia de coleta.⁽¹⁴⁾

Constatou-se neste estudo uma falha de mobilização de 10,2% (18/176) dos pacientes, enquanto 89,8% (158/176) dos pacientes atingiram a dose desejada de CTH. Entre 5% e 46% dos pacientes submetidos à mobilização falham em alcançar a dose pré-fixada de CTH e, então, são considerados como mobilizadores pobres. Idade, sexo, diagnóstico e estágio da doença, envolvimento da medula, radioterapia prévia, tempo de diagnóstico, tempo entre a última quimioterapia e o regime de mobilização, agentes alquilantes, febre de origem desconhecida, dose e administração do fator de crescimento têm sido considerados como possíveis fatores de determinação de prognóstico negativo em diferentes pacientes.^(15,16) Foi observado que os pacientes com MM desta análise foram submetidos a um número menor de coletas e também obtiveram um número maior de células CD34+ em relação aos pacientes com outros diagnósticos. Em geral, o rendimento das coletas é maior em pacientes com mieloma múltiplo.⁽¹⁷⁾

Dos pacientes deste estudo com LNH, 33,3% (6/18) falharam em atingir o número desejado de células CD34+. Pacientes com LNH, principalmente aqueles com envolvimento da medula óssea, são mais frequentemente "maus" mobilizadores.⁽¹⁸⁾ Cerca de 21% a 48% dos pacientes com LNH mostraram-se pobres mobilizadores após administração de quimioterapia e G-CSF e, destes pacientes, 16% a 33% não mobilizaram células-tronco suficientes para coleta e transplante.^(19,20)

Para os pacientes com LMA neste grupo avaliado, 22,2% (4/18) não atingiram o mínimo desejado de células-tronco nas coletas. A leucemia aguda já foi associada a um baixo rendimento de CTHSP em comparação com outras doenças hematológicas malignas.⁽²¹⁾

Neste estudo, a mediana de células nucleadas totais obtidas ao final das coletas foi $7,01 \times 10^8/\text{kg}$ e de células CD34+ foi $2,63 \times 10^6/\text{kg}$, tendo como mediana de dois procedimentos de aférese por paciente. O número de coletas por aférese necessárias para se obter quantidade suficiente de células-tronco do sangue periférico depende do tipo de doença de base, das condições clínicas de cada paciente, do tipo de quimioterapia, da contagem de pré-coleta (CD34 no sangue periférico), da administração do fator de crescimento, do tempo ideal da aférese, do acesso vascular, da técnica e do tipo de instrumentos usados. Portanto, o resultado e a qualidade do produto obtido podem ser totalmente diferentes, de acordo não só com o equipamento, mas também com as condições clínicas dos pacientes.⁽²²⁾

CONCLUSÃO

No presente estudo concluiu-se que fatores como o diagnóstico, o tratamento prévio de quimioterapia e radioterapia, o regime de mobilização, a contagem de leucócitos no início da coleta, os dias de administração de G-CSF e os dias pós-quimioterapia de mobilização necessitam ser considerados para uma coleta satisfatória, sendo que cada paciente deve ser avaliado individualmente com sua doença. Também se observou que 89,8% dos pacientes estudados atingiram a dose de células CD34+ esperada após as mobilizações e coletas.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos colegas do Serviço de Hematologia-Oncologia, Centro de Transplante de Medula Óssea, Centro de Atendimento à Criança e Adolescente com Câncer e Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria.

Abstract

Objective: Evaluate the results of the mobilization and collection of peripheral blood stem cells (PBSC) and identify the characteristics of patients. **Methods:** The medical records of 176 patients diagnosed with Multiple Myeloma(MM),Hodgkin Lymphoma(HL), Non Hodgkin Lymphoma(NHL), Acute Myeloid Leukemia(AML) and other neoplasias were reviewed retrospectively in the period between December 1996 and 2011. **Results:** The median age of the patients was 42 years old, with 76.6% adults and 23.3% pediatric patients. The most frequent diagnoses were MM(30.7%),HL(26.7%) and NHL(19.9%).The methods and mobilization regimens included the use of G-CSF associated or not with different chemotherapy medication: cyclophosphamide,ifosfamide,carboplatin and etoposide (ICE) and chemotherapy drugs related to the patient's treatment. A number of 203 mobilizations and 474 collections were performed with an average of 2.33 collections per patient. The regimen of mobilization with the best CD34+cell performance was G-CSF plus chemotherapy drugs related to the patient's treatment. The median performance of total nucleated cells obtained in the study was $7.01 \times 10^8/\text{kg}$ and $2.63 \times 10^6/\text{kg}$ for CD34+ cells. Eighteen patients (10.2%) did not achieve the number desired after mobilization and collection, however, the majority of the patients (89.8%) achieved the CD34+cell count expected. **Conclusion:** It was verified that

factors such as diagnosis, previous chemotherapy and radiotherapy treatment, mobilization regimen, leukocyte count in the beginning of the collection, the days of administration of G-CSF and the post-chemotherapy days of the mobilization should be considered for the collection of PBSC, noting that before the procedures each patient should be evaluated in relation to his/her disease and evolution phase.

Keywords

Hematopoietic stem cell transplantation; Leukapheresis; Hematopoietic stem cell mobilization

REFERÊNCIAS

1. Silva Junior FC, Odongo FCA, Dulle FL. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009; 31 suppl. 1: 53-8.
2. Rowley SD. Practical Aspects of Stem Cell Collection. In R Hoffman, EJ Benz Jr., SJ Shattil, B Furie, HJ Cohen, LE Silbertein, P McGlave. Hematology - Basic Principles and Practice. New York: Churchill Livingstone; 2000. p.1642-58.
3. Watanabe H, Watanabe T, Suzuya H, Wakata Y, Kaneko M, Onishi T, et al. Peripheral blood stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor alone and engraftment kinetics following autologous transplantation in children and adolescents with solid tumor. Bone Marrow Transplant. 2006;37(7):661-8.
4. Reddy RL. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. Transfus Apher Sci. 2005;32(1):63-72.
5. Fontão-Wendel R, Lazar A, Melges S, Altobeli C, Wendel S. The absolute number of circulating CD34+ cells as the best predictor of peripheral hematopoietic stem cell yield. J Hematother. 1999; 8(3):255-62.
6. Bensinger W, Dipsio JF, McCarty JM. Improving stem cell mobilization strategies: future directions. Bone Marrow Transplant. 2009;43(3):181-95.
7. Takeyama K, Ohto H. PBSC mobilization. Transfus Apher Sci. 2004; 31:233-43.
8. Fu S, Liesveld J. Mobilization of hematopoietic stem cells. Blood Rev. 2000;14(4):205-18.
9. Han X, Ma L, Zhao L, He X, Liu P, Zhou S, et al. Predictive factors for inadequate stem cell mobilization in chinese patients with NHL and HL: 14-year experience of a single-center study. J Clin Apher. 2012;27(2):64-74.
10. Sakashita AM, Kondo AT, Ribeiro AAF, Cipolletta ANF, Colesanti MV, Hamerschlag N, et al. Fatores que afetam a coleta de células-tronco hematopoéticas do sangue periférico por leucáfese de grande volume: experiência de um único centro. Einstein. 2011;9 (2):196-200.
11. Haas R, Mohle R, Fruhauf S, Goldschmidt H, Witt B, Flentje M, et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. Blood. 1994;83(12):3787-94.
12. Mendrone Jr, A. Coleta de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico após administração de ciclofosfamida e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF): uma análise de 307 pacientes [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007. 163p.
13. Souza CA, Marques Junior JFC, Bouzas LFS. Fontes, Mobilização e Coleta de Células-Tronco Hematopoéticas para Transplante. In JC Voltarelli, R Pasquini, ETT Ortega. Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Editora Atheneu; 2009; p. 565-88.
14. Bini-Antunes M, Roncon S, Campilho F, Barbosa I, Leal H, Ávila A, et al. Colheita de células progenitoras hematopoéticas periféricas em doentes pediátricos. Arqui Med. 2006;20(1/2):25-9.
15. Ikeda K, Kozuka T, Harada M. Factors for PBPC collection efficiency and collection predictors. Transfus Apher Sci. 2004; 31(3):245-59.

16. Perseghin P, Terruzzi E, Dassi M, Baldini V, Parma M, Coluccia P, et al. Management of poor peripheral blood stem cell mobilization: incidence, predictive factors, alternative strategies and outcome. A retrospective analysis on 2177 patients from three major Italian institutions. *Transfus Apher Sci.* 2009;41(1):33-7.
17. Perea G, Sureda A, Martino R, Altes A, Martinez C, Cabezudo E, et al. Predictive factors for a successful mobilization of peripheral blood CD34+ cells in multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2001;80: 592-7.
18. Delamain MT, Metze K, Marques Jr JFC, Reis ARC, De Souza CA, Lorand-Metze I. Optimization of CD34+ collection for autologous transplantation using the evolution of peripheral blood cell counts after mobilization with chemotherapy and G-CSF. *Transfus Apher Sci.* 2006;34:33-40.
19. Perry AR, Watts MJ, Peniket AH, Goldstone AH, Linch DC. Progenitor cell yields are frequently poor in patients with histologically indolent lymphomas especially when mobilized within 6 months of previous chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21:1201-5.
20. Sugrue MW, Williams K, Pollok BH, Khan SA, Peracha S, Wingard JR, et al. Characterization and outcome of 'hard to mobilize' lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma.* 2000;39:509-19.
21. Pastore D, Specchia G, Mestice A, Liso A, Pannunzio A, Carluccio P, et al. Good and poor CD34+ cells mobilization in acute leukemia: analysis of factors affecting the yield of progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(11):1083-7.
22. Valbonesi M. Hemopoietic stem cells: technical and methodological considerations. *Stem Cells.* 1993;11(suppl. 3):58-63.

Correspondência

Valúcia Scapin

*Universidade Federal de Santa Maria,
Serviço de Hematologia-Oncologia,
Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)
Av. Roraima, Prédio 22, Bairro Camobi
97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil
Fone/Fax: (55)3220-8591*

Correlação entre citologia, colposcopia e histologia no diagnóstico das lesões intraepiteliais e carcinoma do colo do útero

Correlation between cytology, colposcopy and histology in diagnosing lesions of intra-epithelial and cervical carcinoma

Shaila Fontes da Nobrega¹

Marta Symony Vicente de Sousa Miguel²

Luciôla Abílio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim³

Resumo

O câncer do colo do útero é uma patologia que continua sendo um grave problema de saúde pública, sempre apresentando altas taxas de mortalidade feminina. É uma doença de progressão lenta, desenvolvendo-se a partir de transformações intraepiteliais que podem evoluir para uma lesão invasora, num período de 10 a 20 anos. No entanto, é possível sua prevenção. O diagnóstico do câncer do colo do útero é baseado na realização de três métodos complementares: a citologia, a colposcopia e a histologia. O presente estudo representa uma pesquisa quantitativa, retrospectiva e descritiva, relacionada à correlação entre citologia, colposcopia e histologia no diagnóstico das lesões intraepiteliais e carcinoma do colo do útero, na cidade de Patos, no estado da Paraíba. Foram analisados 37 laudos de pacientes que apresentaram citologia positiva e comparados com a colposcopia e a histologia. A colposcopia apresentou percentual de 73% (27/37) de concordância com a citologia, e a histologia apresentou percentual de 81% (30/37). A partir da análise do presente estudo, pode-se concluir que a associação dos métodos citológicos, colposcópico e histológicos apresenta maior eficiência do que quando utilizados isoladamente.

Palavras-chave

Câncer; Citologia; Colposcopia; Histologia

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é uma patologia que se apresenta como um grave problema de saúde pública, uma vez que este tipo de câncer ocupa o segundo lugar em incidência, atrás apenas do câncer de mama, e o quarto em mortalidade, em todo o Brasil. Em 2012, as estimativas davam conta de 17.540 novos casos, no país, conforme o Instituto Nacional do Câncer - INCA.⁽¹⁾

O câncer do colo do útero se desenvolve a partir de transformações intraepiteliais, não malignas e progressivas, que podem evoluir para uma lesão invasora, num período de 10 a 20 anos. Essa evolução se dá, na maioria dos casos, de forma lenta, passando por fases pré-clínicas detectáveis e curáveis.⁽²⁾ Os métodos de diagnóstico amplamente utilizados, para a detecção do câncer do colo do útero, consistem no exame citológico, no colposcópico e no histopatológico. Este último é considerado o padrão ouro do diagnóstico.⁽³⁻⁵⁾ É necessária a realização desses três métodos complementares, para correta interpretação e diagnóstico das lesões intraepiteliais e câncer do colo do útero, não

devendo o diagnóstico ser baseado em apenas um único método.⁽⁶⁾

O exame citológico apresenta uma boa sensibilidade e alta especificidade quando utilizado em populações como método de triagem. Uma das críticas mais frequentes a esse exame é a alta taxa de falsos-negativos, que pode variar de 6% a 68%.^(3,7) Sua principal finalidade é o rastreamento populacional das lesões intraepiteliais, as quais podem ser melhor definidas, a partir do exame colposcópico e estudo anatomopatológico. O sistema de Bethesda é o mais utilizado, classificando as anormalidades do epitélio escamoso cervical em: atipias celulares de significado indeterminado (ASC-US), atipias celulares que não se exclui lesão de alto grau (ASC-H), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma invasor, atipias em células glandulares sem outras especificações (AGC-SOE), atipias em células glandulares possivelmente neoplásicas (AGC-NEO), carcinoma *in situ* e adenocarcinoma.⁽⁶⁾

A colposcopia é um método rápido, realizado com um aparelho conhecido como colposcópico, o qual permite a

^{1,2}Aluna de graduação do curso de Biomedicina das Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos, PB, Brasil.

³Professora de Citopatologia do curso de Biomedicina das Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos, PB, Brasil.

visualização do colo do útero com aumento de dez a quarenta vezes, ampliando assim uma pequena lesão não observada pela inspeção visual desarmada. Esse método classifica os achados colposcópicos em normal, anormal, suspeito para câncer invasor e achado insatisfatório.^(3,4,8) O estudo colposcópico permite a identificação de alterações sutis do epitélio, imperceptíveis a olho nu, sendo um método de diagnóstico clínico que valoriza, sobretudo, mudanças do nível da superfície da cérvix. No caso da citologia, essa é uma técnica de laboratório que permite estudar as mudanças a nível celular, por isso, devem ser consideradas como sistemas complementares.⁽⁹⁾

A histopatologia é realizada com amostras retiradas de uma superfície suspeita da presença de lesão ou malignidade e está baseada em critérios morfológico-arquitetural e celular. Esse método é considerado padrão ouro do diagnóstico morfológico. Para esse exame, é utilizada a classificação de Richart: Neoplasia IntraEpitelial Cervical (NIC) grau I, II e III, conforme o grau da lesão, carcinoma e adenocarcinoma *in situ*.⁽⁴⁾

A prevenção e o diagnóstico precoce são de grande importância na terapêutica e prognóstico das pacientes, correspondendo às únicas maneiras de se reduzir a morbidade e mortalidade decorrentes das neoplasias; por isso, a importância dos exames periódicos utilizando essas técnicas.⁽³⁾

A citologia, a colposcopia e a histologia não devem ser utilizadas isoladamente como métodos para o diagnóstico das lesões intraepiteliais e carcinoma do colo do útero. Os três métodos são considerados complementares e devem ser usados em associação, porém, vários trabalhos apontam controvérsias entre os resultados. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi correlacionar os resultados dos exames citológicos, colposcópicos e histológicos no diagnóstico das lesões intraepiteliais e carcinoma do colo do útero, avaliando a concordância entre os resultados dos exames das pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo consistiu de uma pesquisa quantitativa, retrospectiva e descritiva, onde foram avaliados 37 prontuários de mulheres atendidas em um laboratório público localizado na cidade de Patos-PB, que apresentaram exame citológico com resultados positivos e que foram encaminhadas para colposcopia e biópsia, no período de 2008 a 2010. Foram considerados resultados positivos aqueles com presença de células epiteliais anormais, ou seja, resultados sugestivos de ASC-US, LSIL, HSIL e carcinoma invasor, de acordo com a classificação de Bethesda (2001). Os dados foram coletados a partir dos prontuários das pacientes, cuja faixa etária variou entre 19 a 72 anos de idade. Os resultados dos exames colposcópicos foram considerados como normais, anormais e insatisfatórios, pela não visualização da JEC (Junção escamo-coagular), e, para a histologia, foi

utilizada a classificação de Richart, sendo considerada positiva nos casos de NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma epidermoide. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa das Faculdades Integradas de Patos, protocolo CEP/FIP nº 0888/2010.

RESULTADOS

Neste trabalho, foram analisados 37 laudos de mulheres que se submeteram ao exame citológico de Papanicolaou, exame colposcópico e exame histológico. A fim de se proceder a correlação cito-colpo-histológica, foram considerados 37 laudos que apresentaram citologia positiva, nas quais foram realizados exames colposcópicos e histológicos. Dentre aquelas mulheres que apresentaram resultados citológicos positivos, foram diagnosticados sete casos de ASC-US, 16 casos de LSIL, 13 casos de HSIL e um caso de carcinoma epidermoide, como mostrado na Figura 1.

Dentre os 37 laudos com citologia positiva, a idade das pacientes variou de 19 a 72 anos, tendo uma incidência maior de LSIL entre 31 e 45 anos, HSIL entre 19 e 30 anos e carcinoma epidermoide acima dos 60 anos (Figura 2).

A Tabela 1 mostra o percentual das alterações citológicas em comparação com os resultados dos exames colposcópicos. O total de casos diagnosticados como ASC-US foi de sete amostras, sendo que, dessas, três (43%)

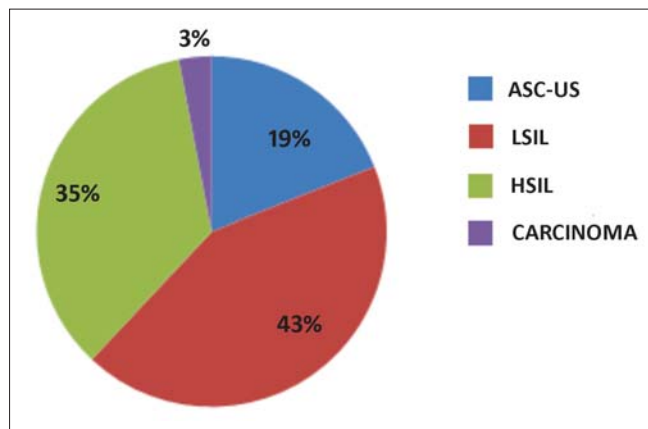


Figura 1. Percentual de exames citológicos positivos.

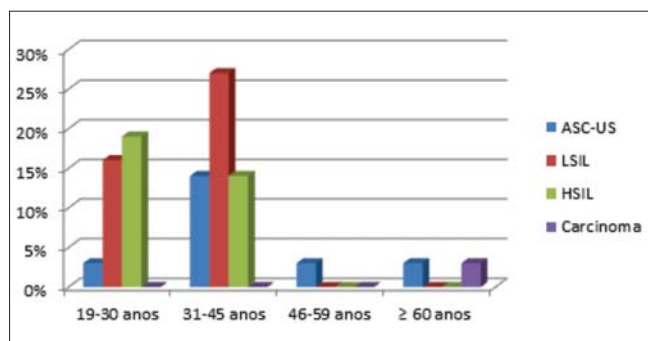


Figura 2. Distribuição das alterações citológicas de acordo com a faixa etária.

Tabela 1. Percentual de concordância entre os exames citológicos e colposcópicos

Citologia	Colposcopia							
	Normal		Anormal		Insatisfatória		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ASC-US	4	57%	3	43%	-	-	7	100%
LSIL	4	25%	12	75%	-	-	16	100%
HSIL	1	8%	11	84%	1	8%	13	100%
Carcinoma	-	-	1	100%	-	-	1	100%

foram considerados anormais na colposcopia e quatro (57%) foram considerados normais. Para os 16 casos de LSIL, 12 (75%) foram considerados anormais e quatro (25%) considerados normais. Relativamente à HSIL, 11 (84%) foram considerados anormais e um (8%) normal. Uma amostra clínica (8%) foi considerada insatisfatória por apresentar sangramento intenso e pela não visualização da JEC. Apenas um caso de carcinoma epidermoide foi diagnosticado tanto

pela citologia quanto pela colposcopia, exibindo, portanto, uma concordância de 100%.

A Tabela 2 mostra o percentual das alterações citológicas comparativamente aos resultados dos exames histológicos. Para os sete casos de ASC-US, três (43%) foram classificados como NIC I, um (14%) como NIC II e três (43%) foram considerados normais. Em relação aos 16 casos de LSIL, dez (63%) foram considerados NIC I, um (6%) foi considerado NIC II, um (6%) foi considerado NIC III, um (6%) foi considerado carcinoma e três (19%) normais. Nos 13 casos de HSIL, dois (15%) foram NIC I, quatro (31%) foram NIC II, cinco (38%) foram NIC III, um (8%) foi carcinoma e um (8%) foi considerado normal. Um caso de carcinoma epidermoide foi diagnosticado, concomitantemente, pela citologia e histologia, sendo que a histologia diagnosticou mais 2 casos de carcinoma não observados na citologia.

A correlação entre os exames citológicos e os colposcópicos e entre os citológicos e histológicos são apresentados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2 - Percentual de concordância entre os exames citológicos e histológicos

Histologia												
Citologia	Normal		NIC I		NIC II		NIC III		Carcinoma		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ASC-US	3	43%	3	43%	1	14%	-	-	-	-	7	100%
LSIL	3	19%	10	63%	1	6%	1	6%	1	6%	16	100%
HSIL	1	8%	2	15%	4	31%	5	38%	1	8%	13	100%
Carcinoma	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100%	1	100%

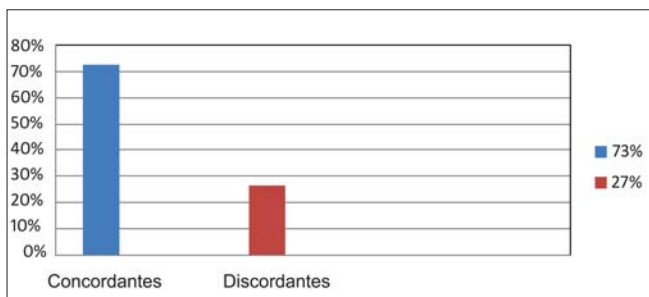


Figura 3. Correlação entre resultados dos exames citológicos com os resultados dos exames colposcópicos.

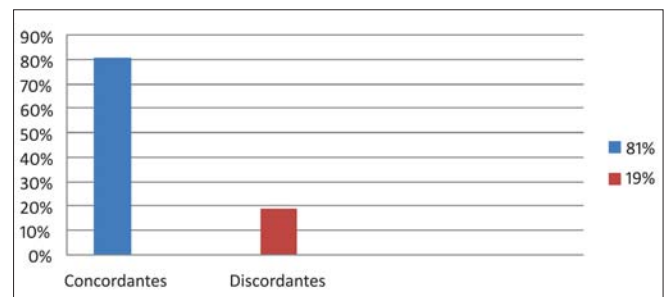


Figura 4. Correlação entre resultados dos exames citológicos com os resultados dos exames histológicos.

DISCUSSÃO

A principal finalidade do método citológico é o rastreamento populacional das lesões intraepiteliais.⁽³⁾ no entanto, a citologia é considerada como um método limitado.⁽¹⁰⁾ Uma amostra adequada é obtida através do preenchimento dos requisitos da fase pré-analítica como presença de células escamosas e glandulares, fixação adequada, esfregaço adequado (nem escasso, nem espesso), ausência de sangue, identificação da lâmina e preenchimento da ficha com dados da paciente.⁽¹¹⁾ A correlação entre citologia, colposcopia

e histologia no diagnóstico das lesões intraepiteliais e carcinoma é essencial para uma conduta adequada tanto para a prevenção quanto para o tratamento das lesões.⁽¹²⁾

No presente estudo, a correlação entre os exames citológicos positivos com os resultados dos exames colposcópicos foi de 73% de concordância. O maior grau de concordância, no entanto, foi entre os resultados citológicos de HSIL e anormalidades colposcópicas (84%). Já foi demonstrado que a acurácia de achados citológicos e colposcópicos está também na dependência do tamanho da lesão, pois maiores graus de NIC estão relacionados com lesões mai-

ores e mais profundas, facilmente detectadas e graduadas tanto pela citologia quanto pela colposcopia.⁽¹³⁾

No caso da correlação dos resultados dos exames citopatológicos e histopatológicos, o percentual foi de 81%, sendo considerado um elevado grau de concordância entre citologia e histologia. Apesar da necessidade da avaliação histológica para estabelecer o diagnóstico definitivo, esta situação nem sempre é alcançada, devido à ocasional impossibilidade de se detectar pela colposcopia áreas representativas da lesão que acomete o colo.⁽¹⁴⁾

No estudo retrospectivo de Stival et al.,⁽⁴⁾ a porcentagem bruta de concordância entre os resultados dos exames citológico e colposcópico foi de 92% e entre o citológico e o histológico foi de 69%. Asturizaga e David,⁽¹⁵⁾ em seu estudo prospectivo, compararam exames colposcópicos com resultados citológicos e histopatológicos de 115 pacientes, encontrando uma concordância entre citologia e colposcopia de 83,47% e uma concordância entre a citologia e a histologia de 79,16%. Pinho e Mattos⁽¹⁶⁾ avaliaram o grau de concordância entre exames citológicos e histológicos, encontrando uma taxa bruta de 65,1%. Nos estudos de Tuon et al.,⁽³⁾ a correlação entre o diagnóstico citológico e histológico foi de 50%, com o maior grau de concordância cito-histológica nas lesões de alto grau (79%). A correlação relatada pelos autores aqui mencionados para a citologia e colposcopia foi maior do que a encontrada neste estudo (73%), no entanto, a correlação entre citologia e histologia apresentou taxas claramente menores quando comparadas com a informada no presente trabalho (81%).

Um único caso de carcinoma foi diagnosticado pela citologia e confirmado pela colposcopia e pela histologia nos estudos de Junior et al.,⁽¹²⁾ sendo esse resultado semelhante ao do nosso estudo, onde foi observado um único caso de carcinoma diagnosticado pela citologia com 100% de concordância entre a colposcopia e histologia.

CONCLUSÃO

A partir da análise do presente estudo, pode-se concluir que a associação dos métodos citológico, colposcópico e histológico é eficaz na detecção das alterações neoplásicas do colo do útero, assim como de suas lesões precursoras, sendo a correlação cito-colpo-histológica de fundamental importância na identificação das categorias de maior dificuldade diagnóstica.

Agradecimentos

Às Dr^{as}. Joana Sabino e Dr^a. Elydiane, que viabilizaram o acesso às informações que possibilitaram completar o banco de dados do presente estudo.

Abstract

Cancer of the cervix is a disease that continues to be a public health problem, with high rates of female mortality. It is a slow progressive disease, developing from intraepithelial changes that may progress to an invasive lesion within 10 to 20 years. However the prevention is possible. The diagnosis of cancer of the cervix is based on the necessity of three complementary methods, cytology, colposcopy and histology. The present study deals with a descriptive, retrospective, quantitative research related to the correlation between cytology, colposcopy and histology in the diagnosis of squamous intraepithelial lesions and carcinoma of the cervix in the city of Patos in Paraíba. We analyzed 37 reports of patients who had positive cytology and compared with colposcopy and histology. Colposcopy showed percentage of 73% (27/37) concordance with cytology and histology showed the percentage of 81% (30/37). From the analysis of this study can conclude that the association of cytology, colposcopy and histological features more efficiently than when used alone.

Keywords

Cancer; Cytology; Colposcopy and Histology

REFERÊNCIAS

1. Inca - Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas para 2012. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 13 de Fevereiro de 2012.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Cartilha de Atualizações em Diagnóstico de Lesões do Colo do Útero - Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e Mama - Viva Mulher, p. 17-18, 2001.
3. Toun FFB, Bittencourt MS, Panichi MA, Pinto AP. Sensibility and specificity of cytology and colposcopy exams with the histological evaluation of cervical intraepithelial lesions. Rev Assoc Med Bras. 2002 Apr-Jun;48(2):140-4. [Article in Portuguese]
4. Stival CO, Lazzarotto M, Rodrigues YB, Vargas VRA. Avaliação comparativa da citologia positiva, colposcopia e histologia: Destacando a citologia como método de rastreamento do câncer do colo do útero. Rev. bras. anal. clin. 2005;37(4): 215-8.
5. Amaral RG, Souza NLA, Tavares SBN, Manrique EJC, Assem DZ, Azevedo LL, Queiroz RCF, Freitas RC, Fonsechi-Carvasan GA. Controle externo de qualidade dos diagnósticos citológicos no rastreamento do câncer cervical: Estudo piloto. Rev. bras. anal. clin. 2006;38(2):79-81.
6. Pias AA, Vargas VRA. Avaliação dos exames citológicos de papanicolaou com células epiteliais atípicas e respectivos exames colposcópicos com relação aos exames histopatológicos. Rev. bras. anal. clin. 2009;41(2):155-60.
7. Amaral RG, Santos SHR, Catharino JM, Silva LCB, Westin MCA, Cotta AC, et al. Revisão rápida de esfregaços cervicais como método de garantia interna de qualidade. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2003;39(2):151-5.
8. Carvalho JJ, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV. 1ª Edição, (21), 142, Editora BG Cultura, 2000.
9. Munhoz LMBS, Colturato PL, Borba TAG, Gonçalves S, Merlin JC, Haas P. Comparativo citológico, colposcópico e histológico de biópsia do colo uterino no Ambulatório Amarel Carvalho/Itararé-SP. Rev. bras. anal. clin. 2009;41(3):167-71.
10. Lapin GA, Derchain SFM, Tambascia J. Comparação entre a colposcopia oncológica de encaminhamento e a da gravidade das lesões cervicais intra-epiteliais. Revista de Saúde Pública. 2000; 34(2):120-5.
11. Lima DNO, Camara S, Mattos MGG. Diagnóstico citológico de ASCUS: sua importância na conduta clínica. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2002;38(1):45-9.
12. Junior JE, Cavalcante JR, Santiago RO, Silva DS. Citologia oncológica, colposcopia e histologia no diagnóstico de lesões epiteliais do colo uterino. News Lab. Edição 63, 2004.

13. Alves RR F, Teixeira TS, Netto JCA. Performance da citologia e colposcopia frente a histologia no rastreamento e diagnóstico das lesões precursoras do câncer do colo do uterino. DST - J Bras Doenças Sex Transm. 2002;14(5):33-8.
14. Filippin C, Hamada FM, Chistofoletti LD, Vieira DSC, Vituri CL. Possíveis discrepâncias dos achados colposcópicos, citológicos, histológicos e moleculares - relato de um caso de pequena lesão cervical. Rev. bras. anal. clin. 2009;41(1):65-8.
15. Asturizaga, R.; David, F. Correlation entre la colposcopia, citologia e histo-patologia. Cuad. Hosp. Clin.;Vol 3(1):45-48, 1986.
16. Pinho, A. A.; Mattos, M. C. F. I. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo do útero. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2002;38(3):225-31.

Correspondência

Lucíola Abílio Diniz Melquiades de Medeiros Rolim

Rua João Soares, 127 - Jardim Califórnia,

58700-310 – Patos, PB

Tel: 0xx(83) 87728435.

uciolajanio@yahoo.com.br

Avaliação da velocidade de hemossedimentação do analisador automático Microsed-System® em relação ao método de Westergren e correlação com os valores da proteína C-reativa (PCR)

Erythro sedimentation speed evaluation of automatic analyzer Microsed-System® compared to Westergren method and correlation with the C-reactive protein (CRP) values

Leandro Fernandes Vianna¹

Rodrigo de Almeida Vaucher^{1,2}

Sabrina Rosa Itaquí³

José Edson Paz da Silva⁴

Resumo

O MicroSed-System® (Vital Diagnóstico, Itália) é um analisador automático para a determinação da velocidade de hemossedimentação (VHS) que oferece coleta de sangue a vácuo em tubos fechados de vidro, com leitura automatizada de ponto final, após 30 minutos. A dificuldade para aquisição dos tubos padronizados para o equipamento tem forçado muitos laboratórios a confeccionar seus próprios tubos, durante suas rotinas laboratoriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de tubos confeccionados no laboratório para o equipamento MicroSed-System®, com o método de Westergren preconizado pelo Conselho Internacional de Padronização em Hematologia-ICSH (1988). Paralelamente, foi realizada uma correlação dos valores da VHS de um grupo de pacientes com valores quantificados da proteína C-reativa (PCR). Foram coletadas 139 amostras de pacientes ambulatoriais e internados no Hospital de Guarnição de Santa Maria (HGuSM, Brasil, RS), de ambos os sexos, com idade variando entre 18 e 78 anos. Cada amostra ensaiada para VHS foi analisada no equipamento MicroSed-System® e pelo método de Westergren, após diluição com uma solução de citrato de sódio 0,129 M. Os resultados dos valores obtidos para a VHS, no equipamento MicroSed-System® e pelo método de Westergren, indicaram boa correlação entre os métodos com coeficiente de correlação, segundo Pearson, igual a 0,984 ($p < 0,001$). Para a comparação dos valores da VHS e PCR, foi observada uma menor correlação, sendo o coeficiente igual a 0,791 ($p < 0,0001$), segundo Pearson. Assim, pode-se concluir que os tubos para MicroSed-System® confeccionados no laboratório podem ser utilizados como um método alternativo na determinação da VHS. Comparando os resultados da PCR e VHS foi observada menor correlação.

Palavras-chave

MicroSed-System®; Velocidade de hemossedimentação (VHS); método de Westergren, Proteína C-Reativa (PCR)

INTRODUÇÃO

A velocidade de hemossedimentação (VHS) ou velocidade de sedimentação globular (VSG), embora inespecífica, é um teste laboratorial simples e barato, usado amplamente para avaliação de fase aguda ou crônica da resposta inflamatória, em diversas condições, e para monitorar a resposta à terapia.^(1,2)

O método de referência para medida do VHS recomendado pelo ICSH foi baseado no método descrito por Westergren,⁽³⁾ usando sangue diluído (4 volumes de sangue em 1 volume de citrato de sódio ou salina) e sedimentado

em um tubo de vidro aberto de 300 mm de comprimento, montado verticalmente em uma estante, sendo o resultado lido em uma hora.⁽⁴⁻⁶⁾

Novas técnicas de medida de VHS automatizadas têm sido introduzidas no laboratório clínico. Estas apresentam certas vantagens em relação às técnicas manuais, tais como: a redução do tempo para execução do exame, redução da exposição ocupacional dos analistas, por ser um sistema fechado, automatização da leitura dos resultados, otimização do fluxo de trabalho e recursos humanos, utilização de uma única amostra para vários exames hematólogicos.^(5,7,8)

¹Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Guarnição de Santa Maria, RS.

²Professor Adjunto do Curso de Biomedicina, Centro Universitário Franciscano – UNIFRA – Santa Maria, RS.

³Acadêmica do Curso de Farmácia, Centro Universitário Franciscano – UNIFRA – Santa Maria, RS.

⁴Professor Adjunto do Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS.

O MicroSed-System® (Vital Diagnóstico, Itália) é um analisador automático para a determinação da velocidade de hemossedimentação (VHS), que oferece algumas destas facilidades. Contudo, os laboratórios clínicos detentores deste equipamento têm enfrentado dificuldade para aquisição de insumos do equipamento. A falta de tubos padronizados de VHS para esse equipamento tem forçado muitos laboratórios a confeccionar seus próprios tubos, durante suas rotinas laboratoriais.

A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína indicativa de fase aguda do processo inflamatório, sendo mais específica. Esta mostra um aumento precoce em relação ao VHS. A dosagem da proteína C-reativa é mais precisa, reprodutível e de fácil execução. Todavia, seus valores apresentam pequena correlação com os valores obtidos na VHS.⁽⁶⁾

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de tubos confeccionados no laboratório para o equipamento MicroSed-System® e correlacionar os valores encontrados com o método de Westergren, preconizado pelo ICSH.⁽⁵⁾ Paralelamente, foi avaliada a correlação dos valores das VHS com valores quantificados da proteína C-reativa (PCR) dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional Integrada (Santo Ângelo, RS), sob o número 087-4/PPH/09. Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletadas 139 amostras de pacientes ambulatoriais e internados no Hospital de Guarnição de Santa Maria, RS, que apresentavam na requisição os exames de VHS e PCR, de ambos os sexos e com idade entre 18 e 78 anos. As amostras foram coletadas em tubos próprios de VHS confeccionados no laboratório, tubos com citrato de sódio 0,129 M e tubos sem anticoagulante. Todas as amostras foram ensaiadas em, no máximo, três horas após a venopunção no MicroSed-System®. Neste equipamento, os resultados são obtidos por interpolação em uma curva de correção interna via software. A correção é feita pelo fabricante. O resultado final é compensado com a temperatura de referência de 18°C e mostrado em display digital. Para a realização do VHS, pelo método de Westergren, foram utilizadas pipetas de vidro específicas (graduação de 200 mm e diâmetro interno de 2,55 mm), preenchidas e dispostas, verticalmente, em suporte para esse fim. A determinação da PCR no soro dos pacientes foi realizada por método turbidimétrico em um *Turbitimer* (Dade Behring), sendo utilizado um controle imunológico nível 1 *turbitest* (Wiener Lab). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa MedCalc versão 11.2, sendo aplicado o Teste T de Student para comparar as médias. O Teste de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre o método de Westergren e o método automatizado. Tendência, precisão e avaliação de limites de concordância foram realizadas, utilizando a análise de Bland-

Altman. A precisão foi avaliada utilizando um intervalo de confiança (IC) de 95%, para a diferença média entre os métodos.

RESULTADOS

A avaliação da VHS de 139 pacientes foi procedida, utilizando-se os métodos de Westergren e o sistema automatizado MicroSed-System®. Paralelamente, foram realizadas determinações da PCR, empregando-se o aparelho Turbidimeter® (Dade Behring) nos soros dos pacientes participantes do estudo.

A média dos valores da VHS com o sistema automatizado foi de 15,54 mm/h (IC 95% com valores variando entre 12,18 a 18,90 mm/h), não havendo diferença significativa desta medida com o método de Westergren, cuja média foi de 16,81 mm/h (IC 95% com valores variando entre 13,17 a 20,44 mm/h). A diferença da média foi de -1,27 (IC 95% da média foram -1,9598 e -0,5870) ($P < 0.01$). O coeficiente de correlação, segundo Pearson, foi de 0,984 ($p < 0.001$) (Figura 1).

Os resultados da análise de regressão linear, de acordo com Passing-Bablok, mostrou boa correlação entre estes métodos, com equação de regressão linear $y = 0,1333 + 0,9333 x$ (Figura 1).

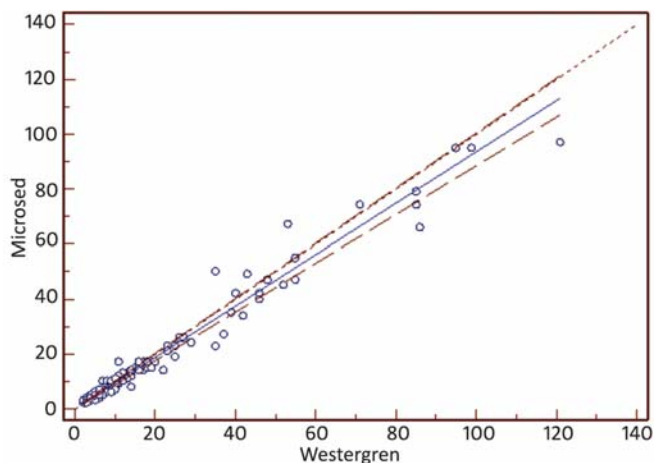


Figura 1. Comparação dos dois métodos de velocidade de hemossedimentação: método MicroSed-System® x método de Westergren. Figura mostrando a correlação ($r = 0,984$; $P < 0,001$). Equação de regressão linear de acordo com Passa-Bablok: $y = 0,1333 + 0,9333 x$.

A concordância entre os resultados obtidos pelos diversos métodos é demonstrada, de acordo com Bland-Altman, em diferentes faixas. Não houve tendência de erro sistemático (viés = 1,27) e os limites de concordância foram -6.8 a 9.3 mm/h (Figura 2).

Para a comparação dos resultados da PCR e VHS no MicroSed-System®, obteve-se um coeficiente de correlação, segundo Pearson, de 0,791 ($p < 0.0001$) e a análise de regressão linear, de acordo com Passing-Bablok, foi de $y = 4,6900 + 0,09333x$, mostrando uma pequena correla-

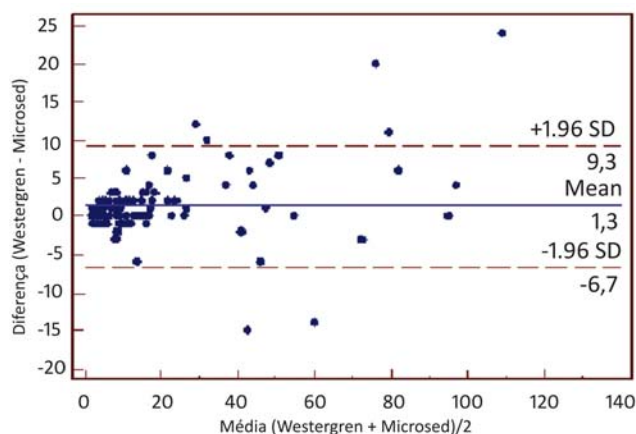


Figura 2. Parcela da diferença entre valores de VHS obtidos com o método de Westergren e aqueles dados pelo método do MicroSed-System® (eixo y) versus a média dos valores de VHS (Westergren + MicroSed-System®) (eixo x). As linhas pontilhadas indicam os limites de concordância: -6,8 a 9,3 mm/h., o viés é 1,27.

ção relativa (Figura 3). Considerando, de forma arbitrária, independentemente do sexo, o valor de referência de 20 mm/h, para a VHS, e o valor de referência de 6,0 mg/L, para a PCR, análises percentuais dos dados forneceram os seguintes resultados: dos 139 (100%) pacientes analisados, foram obtidas 78,4% (109/139) de amostras dentro dos valores de referência, para a VHS, e dos 21,6% (30/139) de amostras com valor acima da referência, foram encontradas 80,0% (24/30) de amostras com valores para a PCR também acima da referência. Em relação à análise dos valores da PCR, foram encontradas 61,9% (86/139) de amostras dentro dos valores de referência e 38,1% (53/139) das amostras apresentaram valores acima de 6,0 mg/L. Ao ser analisado esse conjunto, foram obtidas 38,1% (24/53) de amostras com valores para a VHS também acima da referência.

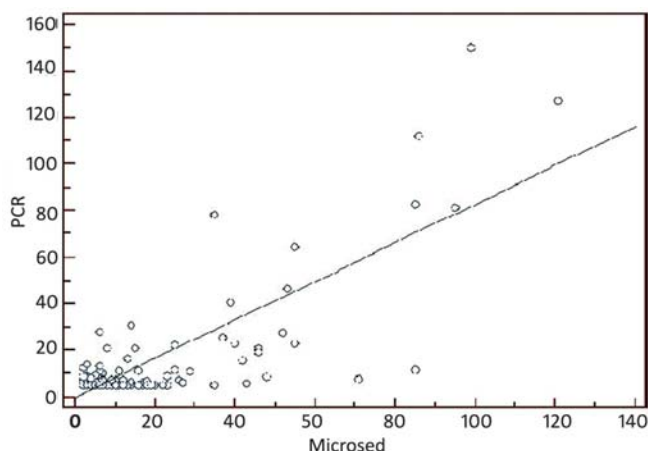


Figura 3. Correlação entre os valores da PCR (eixo y) e os valores da VHS no MicroSed-System® (eixo x). A figura mostra a correlação ($r = 0,791$; $P < 0,001$). Equação de regressão linear de acordo com Passing-Bablok: $y = 4,6900 + 0,09333x$.

DISCUSSÃO

A VHS não é a medida de um analito, mas a medida de um fenômeno físico em função de um grande número de variáveis (número e tamanho dos eritrócitos, densidade do plasma, a concentração de proteína e anticorpos, sexo, idade).^(9,10)

O método de Westergren e suas versões modificadas não medem nem a cinética nem a taxa de hemossedimentação, mas apenas o fenômeno final descrito por Fahraeus.⁽¹⁾ Por ser um método manual, requer transferência, diluição, mistura, enchimento das pipetas, posicionamento vertical, contagem de tempo e a interpretação visual dos resultados. Essas múltiplas etapas, e uma ampla faixa de variáveis, podem facilmente causar resultados imprecisos ou inaceitáveis.⁽²⁾ Entretanto, o método é amplamente difundido nos laboratórios, sendo baseado no protocolo H2-A4.⁽¹¹⁾

As provas de atividade inflamatória são exames frequentemente utilizados na prática médica para auxiliar o diagnóstico e o seguimento de afecções inflamatórias, infecciosas e neoplásicas. Diversas provas laboratoriais podem ser utilizadas com essa finalidade como velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C-reativa (PCR), alfa-1 glicoproteína ácida, mucoproteínas, fibrinogênio, haptoglobina e inúmeras outras proteínas, entretanto, na prática laboratorial, a VHS e a PCR têm sido mais utilizadas.⁽⁹⁾

A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína indicativa de fase aguda do processo inflamatório.⁽¹²⁾ É secretada em quantidades aumentadas dentro de um período de seis horas, devido a um estímulo inflamatório agudo. A concentração plasmática pode duplicar pelo menos a cada oito horas, atingindo o pico, aproximadamente, depois de 50 horas. Após um tratamento eficaz ou remoção do estímulo inflamatório, as concentrações podem cair muito rapidamente.⁽¹³⁾

Métodos modernos, quantitativos e rápidos têm aumentado, significativamente, o potencial de uso dos níveis da PCR.⁽¹²⁾ A dosagem da proteína C-reativa é também mais precisa e reprodutível, sendo um teste de rápida execução. No entanto, os testes de VHS permanecem úteis, em certas situações clínicas, tais como a detecção de paraproteinemias, que, muitas vezes, não desencadeiam uma resposta de fase aguda.⁽¹⁴⁾

Na avaliação da VHS de 139 pacientes, utilizando o método de Westergren e o sistema MicroSed-System®, foi observada uma boa correlação ($r = 0,984$), entre ambas. Em um estudo reportado por Wiwanitkit et al,⁽¹⁵⁾ foi relatada uma correlação similar entre esses dois métodos ($r = 0,904$). Também foi observado que as equações de regressão linear deste estudo, foram semelhantes, sendo determinada pelas fórmulas $y = 0,1333 + 0,9333 X$ e $Y = 0,842 + 0,1371 X$, respectivamente.

Em relação à concordância entre os resultados, de acordo com as análises de Bland-Altman, não foi observada tendência de erro sistemático, sendo o viés = 1,27 e os limites de concordância de -6,8 a 9,3 mm/h. Para cada amostra

de sangue, a média do resultado do MicroSed-System® e do resultado Westergren foram plotados contra a diferença entre os dois resultados. Este é um método mais sensível do que o coeficiente de correlação, para a determinação de concordância entre dois métodos.^(15,16) Como a diferença entre os resultados é determinada pelos resultados da VHS do método de Westergren menos o resultado da VHS do MicroSed-System®, um valor negativo para essa diferença indica um falso resultado alto para a VHS do MicroSed-System®, em comparação com a VHS de Westergren, assim como, um resultado positivo indica um falso resultado baixo para o MicroSed-System®. A inclusão do intervalo de + 2 DP (Desvio Padrão), com o valor correspondente em mm/h fornece uma indicação da comparabilidade dos dois métodos em termos clínicos.⁽⁴⁾

Nos estudos comparativos entre a VHS do MicroSed-System® e PCR foi verificado um coeficiente de correlação (Pearson $r = 0,791$, $p < 0,0001$). Recentemente, Crowson et al.⁽¹⁷⁾ reportaram uma correlação significativa (Pearson $r = 0,59$, $p < 0,001$) inferior à reportada, nesta pesquisa, para VHS e PCR. Existem poucos trabalhos na literatura que realizam esta correlação, entretanto, a maioria dos estudos tem correlacionado dados clínicos com valores de VHS e PCR.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Dos 139 pacientes analisados, foram obtidas 109 amostras dentro dos valores de referência, para a VHS. Das 30 amostras com valor acima da referência, foram obtidas 24 com valores para a PCR também acima da referência, perfazendo 80% das amostras.

Em relação à análise dos valores da PCR, foram observadas 86 amostras dentro dos valores de referência e 53 amostras apresentaram valores acima de 6,0 mg/L. Foram analisadas, dentro desse conjunto, 24 amostras com valores para a VHS também acima da referência, perfazendo um percentual de 38,1%. Já que a PCR é um indicador mais sensível de resposta de fase aguda, os dados aqui apresentados revelam a presença de uma resposta inflamatória, nos pacientes com um VHS normal, embora, em muitos casos, seja discreta.⁽²⁰⁾

Assim, pode-se observar que a VHS fornece uma melhor medida do quadro do paciente comparada à PCR. Quando se realizam os dois exames, tanto a especificidade quanto o valor preditivo positivo, em relação à atividade ou não de doença inflamatória crônica, aumentam muito, corroborando com a importância da realização simultânea desses dois exames.⁽²¹⁾

CONCLUSÃO

O analisador MicroSed-System® oferece uma rápida determinação da VHS com uma boa correlação com o método de Westergren. Contudo, entre os valores das dosagens da PCR e VHS do MicroSed-System®, observou-se uma menor correlação relativa. Assim, pode-se concluir que os tubos preparados no laboratório para VHS do

analisador MicroSed-System® podem ser utilizados como um método alternativo para a determinação de VHS, neste equipamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao diretor do Hospital de Guaranição de Santa Maria/RS e ao chefe do Laboratório de Análises Clínicas pela oportunidade para a realização do estudo.

Abstract

The MicroSed-System® (Vital Diagnostics, Italy) is an automatic analyzer for determination of erythrocyte sedimentation rate (ESR), which provides blood collection vacuum tubes of glass closed with automated reading of the end point after 30 minutes. The difficulty for the acquisition of the tubes to the standard equipment has caused many laboratories to make their own tubes during their routine laboratory. The objective of this study was to evaluate the use of tubes made in the laboratory for the equipment MicroSed-System® with the Westergren method recommended by the International Council for Standardization in Hematology-ICSH in 1988. In parallel, we performed a correlation between the ESR values of a patient group with quantified values of C-Reactive Protein (CRP). We collected 139 samples from inpatients and outpatients at the Hospital of Garrison of Santa Maria (HGuSM, Brazil/RS) of both sexes, aged between 18 and 78 years. Each sample was analyzed tested for ESR in MicroSed-System® device and the Westergren method, after dilution with a solution of sodium citrate 0.129 M. Results from the values obtained for the equipment MicroSed-System® for ESR and the Westergren method, showed good correlation between the methods with Pearson correlation coefficient equal to 0.984 seconds ($p < 0,001$). To compare the values of ESR and CRP, we observed a lower correlation coefficient being equal to 0.791 ($p < 0,0001$), Pearson said. Comparing the results of CRP and ESR was found a lower correlation.

Keywords

MicroSed-System®, Erythrocyte sedimentation rate (ESR), Westergren method, C-Reactive Protein (CRP).

REFERÊNCIAS

1. Fahraeus R. The suspension stability of the blood. *Acta Med Scand.* 1921;55:1-7.
2. Happe MR, Battafarano DF, Dooley DP, Rennie TA, Murphy FT, Casey TJ, Ward JA. Validation of the Diesse Mini-Ves erythrocyte sedimentation rate (ESR) analyzer using the Westergren ESR method in patients with systemic inflammatory. *Am J Clin Pathol.* 2002 Jul;118(1):14-7.
3. Westergren A. Studies on the suspension stability of the blood in pulmonary tuberculosis. *Acta Med Scand.* 1921;54:247-82.
4. International Committee for Standardization In Haematology. Reference method for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) test on human blood. *Br J Haematol.* 1973;24:671-3.
5. International Committee for Standardization In Haematology. Recommendation of measurement of erythrocyte sedimentation rate of human blood. *Am J Clin Pathol.* 1977 Oct;68(4):505-7.
6. International Committee for Standardization in Haematology (expert panel on blood rheology). Guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response. *J Clin Pathol.* 1988 Nov;41(11):1203-1.
7. Caswell M, Stuart J. Assessment of Diesse Ves-matic automated system for measuring erythrocyte sedimentation rate. *J Clin Pathol.* 1991 Nov;44(11):946-9.

8. Koepke JA. Welcome innovation in erythrocyte sedimentation testing. *Am J Clin Pathol*. 2002 Jul;118(1):11-2.
9. Filho JM. Velocidade de hemossedimentação de segunda hora: qual o seu valor? *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2004;50(2):109-26.
10. Soares AL, Santos EA. Velocidade de hemossedimentação: comparação entre o método Microtest X (microsedimentação) e o método de referência Westergren. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009;31(1):47-8.
11. National Committee for Laboratory Standards. Reference and Selected Procedures for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Test (H2-A4). Wayne, PA: NCCLS, 2000.
12. Aalto K, Osterman K, Peltola H, Räsänen JJ. Changes in erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein after total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1984 Apr;(184):118-20.
13. Marnell L1, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol*. 2005 Nov; 117(2): 104-11.
14. Reeves G. C-reactive protein. *Aust. Prescr*. 2007;30(3):74-6.
15. Wiwanitkit V1, Chotekiatikul C, Tanwuttikool R. MicroSed SR-system: new method for determination of ESR--efficacy and expected value. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2003 Jul;9(3):247-50.
16. Bland JM, Altman DG. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 Feb 8;1(8476):307-10.
17. Crowson CS, Rahman MU, Matteson EL. Which measure of inflammation to use? A comparison of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements from randomized clinical trials of golimumab in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2009 Aug;36(8):1606-10.
18. Cantini F, Salvarani C, Olivieri I, Macchioni L, Ranzi A, Niccoli L, et al. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in the evaluation of disease activity and severity in polymyalgia rheumatica: a prospective follow-up study. *Semin Arthritis Rheum*. 2000 Aug;30(1):17-24.
19. Korppi M, Heiskanen-Kosma T, Leinonen M. White blood cells, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in pneumococcal pneumonia in children. *Eur Respir J*. 1997 May; 10 (5):1125-9
20. Osei-Bimpong A1, Meek JH, Lewis SM. ESR or CRP? A comparison of their clinical utility. *Hematology*. 2007 Aug;12(4):353-7.
21. Nicácio AAMF, Damazio KC, Terreri MTSLR, Rassi IE, Hilário MOE. Avaliação de provas de fase aguda em crianças e adolescentes com artrite idiopática juvenil e sua correlação com atividade da doença. *Rev. Paul. Pediatr*. 2009;27(2):193-7.

Correspondência

Leandro Fernandes Vianna

Centro Universitário Franciscano - UNIFRA
Laboratório Escola - LEAC
Rua dos Andradas, 1614 - Prédio 4 Sala 213
97010.032 – Santa Maria, RS

Hemocultura: etiologia e suscetibilidade das amostras provenientes de pacientes internados em hospital público

Blood culture: etiology and susceptibility of samples from patients admitted in public hospital

Mariana Lima Prata Rocha¹

Nayara Cristina Teixeira Pereira²

Resumo

A verificação de bactérias em amostras de sangue simboliza relevante recurso diagnóstico em doenças infecciosas nosocomiais. Um enorme problema da saúde pública é representado pelas infecções hospitalares, pois o tempo de internação do paciente é aumentado, a morbidade e a mortalidade se elevam, os custos do tratamento são maiores e há uma relação direta desse fato com a proliferação de bactérias multirresistentes. O objetivo deste trabalho foi analisar o número total de hemoculturas realizadas por um laboratório, a quantidade de hemoculturas positivas, idade média e faixa etária dos pacientes acometidos por infecção, etiologia e perfil de sensibilidade das bactérias predominantes. Foram analisadas 387 hemoculturas de 253 pacientes. Os pacientes do gênero masculino foram mais acometidos, com média de idade equivalente a 55,7. As bactérias de maior prevalência foram *Staphylococcus coagulase* negativo e *Klebsiella* sp. Foi percebido que *Staphylococcus coagulase* negativo se apresentou menos resistente em comparação à *Klebsiella* sp. na totalidade de antimicrobianos testados. Destaca-se que *Staphylococcus coagulase* negativo se manteve resistente à penicilina e à oxacilina e *Klebsiella* sp. teve sensibilidade de 100% aos carbapenêmicos.

Palavras-chave

Staphylococcus; *Klebsiella*; Hemocultura; Suscetibilidade a antimicrobianos

INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Saúde,⁽¹⁾ infecção hospitalar (IH) ou nosocomial refere-se ao grupo de infecções adquiridas, principalmente, por pacientes hospitalizados. As manifestações clínicas podem ocorrer durante a permanência no hospital ou após a alta.⁽¹⁾ A sepse é a clínica mais frequente, sendo caracterizada por afetar vários órgãos e sistemas e ocorre quando uma infecção acomete o organismo de forma sistêmica.⁽²⁾

A sepse é uma condição relevante de hospitalização e é uma das mais importantes causas de óbito em unidades de terapia intensiva (UTI).^(3,4) Estudos sobre pacientes com sepse na Europa e nos EUA têm relatado uma taxa global de mortalidade de 13,5% a 53,6%.^(3,5,6) Pesquisas brasileiras, nessa área têm encontrado taxas globais de mortalidade em unidades de terapia intensiva entre 21,8% e 46,4%.^(7,8) A hemocultura é um procedimento laboratorial que comprova a existência ou não de infecção na corrente sanguínea, que

pode ser primária, normalmente originada por cateteres intravasculares,⁽⁹⁾ ou secundária, que é decorrente de infecções em diferentes sítios anatômicos que, ao atingirem o sistema vascular, se disseminam a outros órgãos. Os focos primários de maior importância são o trato urinário, o pulmão e a cirurgia abdominal.⁽¹⁰⁾ Para a realização do correto diagnóstico, o recomendado é que, pelo menos, duas amostras de sangue sejam colhidas, com um intervalo mínimo de quinze minutos entre elas, e que sejam pesquisados microrganismos aeróbios e anaeróbios. A bacterioscopia do material também deve ser feita.⁽¹¹⁾ Para evitar que resultados falso-negativos sejam liberados é necessário que a coleta das amostras seja feita antes da administração de antimicrobianos.⁽¹¹⁾ A distinção entre infecção e contaminação deve ser criteriosamente procedida.⁽¹²⁻¹⁴⁾

Desde o surgimento dos primeiros antimicrobianos até as modernas drogas atuais, observa-se o fenômeno de resistência. Isso é devido à administração indiscriminada de antimicrobianos e quimioterápicos.⁽¹⁵⁾ Uma quantidade

¹Doutora pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU – Uberlândia, MG. Coordenadora e Professora.

²Graduanda – Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, MG.

Instituição: Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, MG.

Suporte financeiro: Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, MG.

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse.

Artigo recebido em 03/09/2014

Artigo aprovado em 25/08/2015

relevante de microrganismos já se tornou resistente a muitas dessas substâncias.^(16,17) Juntamente com a cultura das amostras, deve-se realizar o teste de suscetibilidade, para que seja possível indicar a sensibilidade ou a resistência aos antimicrobianos de maneira que a correta terapia anti-infecciosa seja instituída.⁽¹¹⁾ Este estudo foi desenvolvido, então, com o intuito de se conhecer quais as bactérias são mais prevalentes nas hemoculturas, bem como determinar seus perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos testados.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizado um estudo retrospectivo a partir da análise dos resultados laboratoriais de hemoculturas provenientes de um hospital público, localizado em uma cidade mineira, no qual foram analisados 387 exames. Dados como gênero, idade, etiologia e perfil de sensibilidade das bactérias responsáveis pelas infecções foram coletados.

RESULTADOS

No período de estudo foram analisadas 387 hemoculturas de 253 pacientes, sendo 119 (47,0%) pertencentes ao gênero masculino e 108 (42,7%) ao gênero feminino. Para 26 (10,3%) dos pacientes, não foi possível a determinação do gênero, pois esses não foram encontrados no histórico para pesquisa (Figura 1).

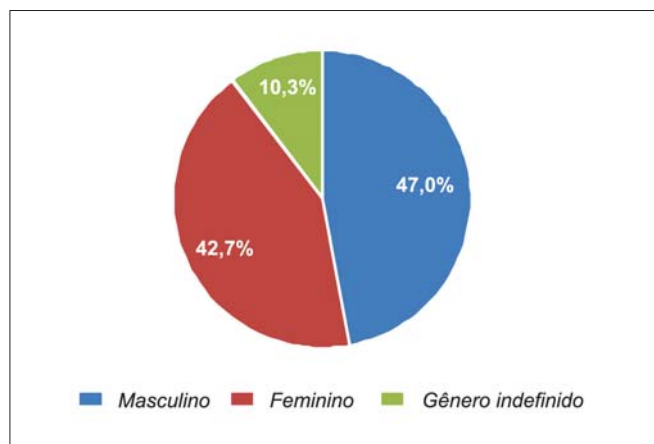


Figura 1. Determinação de gênero dos pacientes em relação à totalidade de hemoculturas.

Foram identificadas 58 (15,0%) hemoculturas positivas e 329 (85,0%) negativas para infecção bacteriana. Os microrganismos encontrados foram: *Staphylococcus coagulase-negativo* – 26 (44,8%); *Klebsiella* sp. – 10 (17,2%); *Enterobacter* sp. – 08 (13,8%); *Staphylococcus aureus* – 05 (8,6%); *Escherichia coli* – 05 (8,6%); *Pseudomonas* sp. – 03 (5,2%) e *Streptococcus* sp. – 01 (1,7%) (Figura 2).

O microrganismo de maior prevalência nesta pesquisa foi *Staphylococcus coagulase-negativo*, presente em 26 hemoculturas (44,8%), sendo que, dessas, 15 (57,7%) per-

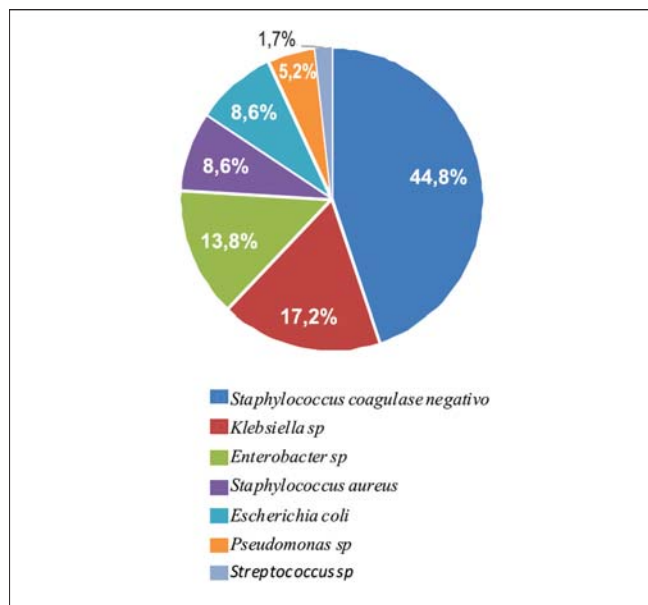


Figura 2. Incidência de bactérias encontradas na pesquisa.

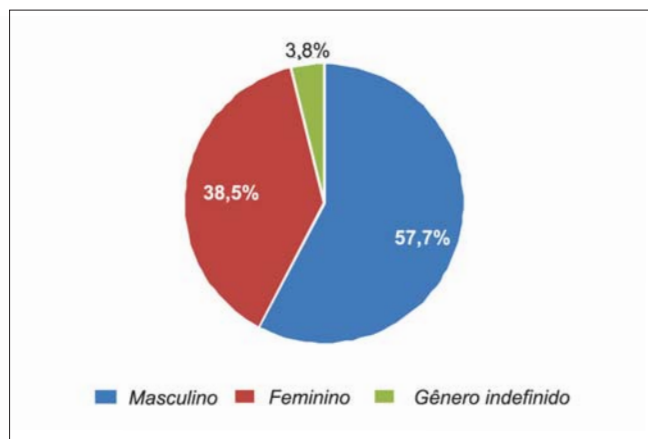


Figura 3. Prevalência de gênero dos pacientes com infecção por *Staphylococcus coagulase-negativo*.

tenciam a pacientes do gênero masculino, 10 (38,5%) ao gênero feminino e 01 (3,8%) permaneceu sem identificação do gênero (Figura 3).

O segundo organismo mais prevalente foi *Klebsiella* sp., encontrada em 10 infecções (17,2%), sendo 05 (50,0%) do gênero masculino e também 05 (50,0%) caracterizados como gênero feminino (Figura 4).

A idade média em relação ao total de hemoculturas estudadas foi de 41,9 anos, sendo que o gênero masculino apresentou idade média de 45,4 anos e o feminino idade média de 48,0 anos. De acordo com infecções causadas por *Staphylococcus coagulase-negativo*, a idade média foi de 53,5 anos, onde o gênero masculino apresentou média de 51,8 anos e o feminino média de 61,5 anos. A faixa etária que apresentou maior predominância de infecções foi aquela entre 63 e 83 anos (34,6%) (Figura 5).

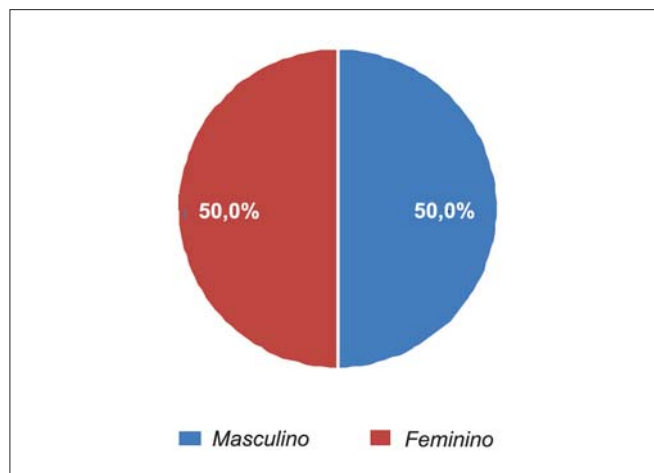


Figura 4. Prevalência de gênero dos pacientes com infecção por *Klebsiella* sp.

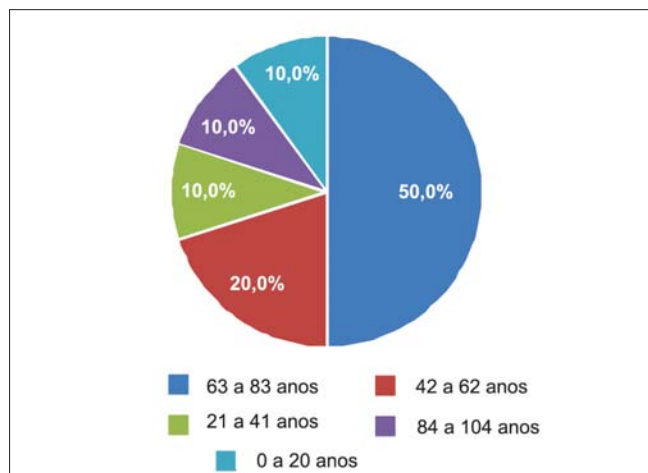


Figura 6. Identificação dos intervalos de idades nas infecções causadas por *Klebsiella* sp.

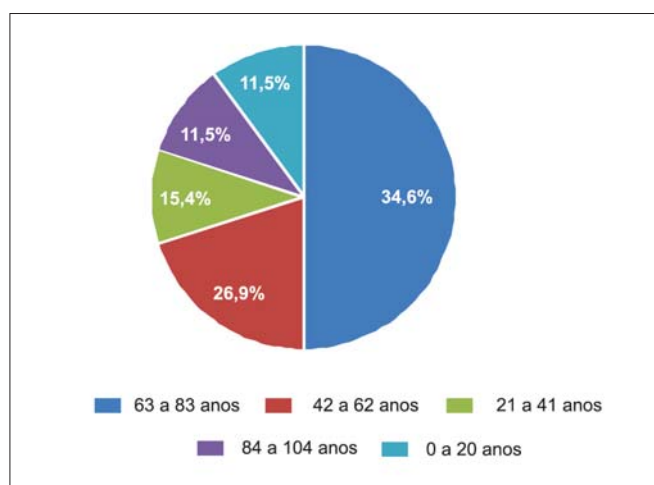


Figura 5. Identificação dos intervalos de idades nas infecções causadas por *Staphylococcus coagulase-negativo*.

Em relação a infecções causadas por *Klebsiella* sp., a idade média foi de 59,8 anos, sendo que o gênero masculino apresentou média de idades equivalente a 68,2 anos e o feminino igual a 51,4 anos. A faixa etária mais frequentemente acometida também ficou entre 63 e 83 anos (50,0%) (Figura 6).

De acordo com o perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus coagulase-negativo*, foi observada uma taxa de resistência à penicilina de 82,6% e à oxacilina (76,9%). Na presente pesquisa, esse microrganismo se mostrou sensível à vancomicina (92,0%) e à rifampicina (91,7%) (Tabela 1).

Em relação ao perfil de sensibilidade para *Klebsiella* sp., foi identificada resistência desse microrganismo à sulfazotrim (88,9%), à amoxicilina-ácido clavulânico (AMC) (85,7%) e à ceftriaxona (80,0%). O microrganismo se apresentou sensível aos carbapenêmicos (100%), à piracilina/tazobactam (87,5%) e à amicacina (80,0%) (Tabela 2).

Tabela 1. Taxa de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus coagulase-negativo*

Antibiótico	Resistente N°(%)	Sensível N°(%)	Intermediário N°(%)	Total N°(%)
Penicilina	19 (82,6%)	3 (13,0%)	1 (4,3%)	23 (100%)
Oxacilina	20 (76,9%)	5 (19,2%)	1 (3,8%)	26 (100%)
Ciprofloxacina	13 (56,5%)	11 (47,8%)	-	24 (100%)
Ceftriaxona	12 (54,5%)	10 (45,5%)	-	23 (100%)
Vancomicina	2 (8%)	23 (92%)	-	25 (100%)
Rifampicina	2 (8,3%)	22 (91,7%)	-	24 (100%)
Amicacina	3 (11,5%)	23 (88,5%)	-	26 (100%)
Teicoplanina	2 (10,5%)	16 (84,2%)	1 (5,2%)	19 (100%)
Sulfazotrim	9 (36%)	16 (64%)	-	25 (100%)

Tabela 2. Taxa de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella* sp.

Antibiótico	Resistente N°(%)	Sensível N°(%)	Intermediário N°(%)	Total N°(%)
Sulfazotrim	8 (88,9%)	1 (11,1%)	-	9 (100%)
AMC	6 (85,7%)	-	1 (14,3%)	7 (100%)
Ceftriaxona	8 (80,0%)	2 (20,0%)	-	10 (100%)
Cefepime	5 (62,5%)	1 (12,5%)	2 (25,0%)	8 (100%)
Cefoxitina	4 (57,1%)	3 (42,9%)	-	7 (100%)
Meropenem	-	10 (100%)	-	10 (100%)
Imipenem	-	10 (100%)	-	10 (100%)
Ertapenem	-	2 (100%)	-	2 (100%)
Piracilina-tazobactam	-	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (100%)
Amicacina	2 (20%)	8 (80%)	-	10 (100%)

*AMC = amoxicilina-ácido clavulânico.

DISCUSSÃO

As mais elevadas taxas de óbito em UTI são causadas por processos infecciosos, sendo a sepsé o de maior importância clínica.⁽¹⁸⁾ No presente trabalho, foram estudadas 387 hemoculturas de 253 pacientes, sendo 58 (15,0%) positivas e 329 (85,0%) negativas. Em outro estudo, 1.388 hemoculturas foram analisadas, sendo 98 (7%) positivas e 1.290 (93%) negativas.⁽¹⁹⁾ Alves e colaboradores⁽²⁰⁾ avaliaram 512 hemoculturas de 170 pacientes, encontrando 123 (24,0%) positivas e 389 (76,0%) negativas. Guilarde e colaboradores⁽²¹⁾ estudaram 258 pacientes com 295 hemoculturas positivas. Pereira e colaboradores⁽²²⁾ verificaram que, de um total de 93 hemoculturas, 27 (29,03%) foram positivas.

Em relação ao gênero, foram encontrados 119 (47,0%) pacientes do gênero masculino, 108 (42,7%) do gênero feminino e 26 (10,3%) sem identificação do gênero nos documentos analisados.⁽²⁰⁾ Alves também encontrou maior prevalência do sexo masculino, relatando que 60% dos indivíduos estudados eram desse gênero. Na pesquisa de Guilarde e colaboradores,⁽²¹⁾ pacientes masculinos representaram, também, o maior percentual (55,8%). Em outro trabalho, 56% dos pacientes, igualmente, pertenciam ao gênero masculino.⁽²³⁾ No presente estudo, o gênero masculino prevaleceu sobre o feminino quanto à positividade das hemoculturas (49,1%).

Em relação à média de idades, este trabalho obteve uma média total de 41,9 anos. O gênero masculino apresentou média de idade de 45,4 anos e o gênero feminino de 48,0 anos. De acordo com Guilarde e colaboradores,⁽²¹⁾ a média de idade foi de 47 anos, sendo um pouco superior ao presente estudo. Nesta avaliação, foi obtido um intervalo de idades de 63 a 83 anos, já outra pesquisa teve um resultado de 31 a 65 anos.⁽²¹⁾

Quanto às bactérias predominantes, na avaliação em tela, aquela de maior ocorrência foi *Staphylococcus coagulase-negativo* (44,8%), em sequência, *Klebsiella* sp. (17,2%) e outros microrganismos com taxas menores (38%). Segundo Alves e colaboradores,⁽²⁰⁾ *Staphylococcus epidermidis* (45,5%) foi o germe de maior prevalência, seguido por *Staphylococcus aureus* (13,0%) e *Pseudomonas aeruginosa* (12,2%). Porém, Guilarde e colaboradores,⁽²¹⁾ em sua pesquisa, relataram que *Staphylococcus coagulase-negativo* não foi o mais prevalente. Este organismo foi encontrado em 12 episódios (4,1%) e a bactéria predominante foi *Staphylococcus aureus*, ocorrendo em 118 episódios (40,0%). *Staphylococcus aureus* (43%), *Pseudomonas aeruginosa* (31%), *Acinetobacter* (22%), *Klebsiella* (17%) e *Escherichia coli* (15%) foram os microrganismos relatados nos estudos de Lisboa e colaboradores.⁽²³⁾ Outros trabalhos apresentaram *Staphylococcus epidermidis* como bactéria predominante.^(20,22) *Staphylococcus coagulase-negativo* são, em grande parte, resultado de contaminações, sendo responsáveis por menos de 10% dos casos de infecção.⁽²⁴⁾ Resultados opostos aos relatados aqui informaram que bacilos

Gram-negativos foram os predominantes.⁽¹²⁾ Nesse estudo, as espécies mais isoladas foram *Pseudomonas stutzeri* (18,2%) e *Klebsiella pneumoniae* (13,6%).⁽¹²⁾ Cabral e Poveda⁽²⁵⁾ também relataram maior prevalência de bactérias Gram-negativas em infecções da corrente sanguínea.

A identificação bacteriana e o estudo do perfil de suscetibilidade em hemoculturas ajudam na diminuição da mortalidade, pois permitem a instituição de uma terapêutica correta.⁽¹²⁾ Em relação ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, *Staphylococcus coagulase-negativo*, neste trabalho, apresentou maior resistência à penicilina (82,6%), à oxacilina (76,9%) e à ciprofloxacina (56,52%). Outro estudo também destacou a elevada taxa de resistência dos microrganismos isolados à oxacilina (66,7%).⁽¹²⁾ Alves e colaboradores⁽²⁰⁾ constataram que *Staphylococcus coagulase-negativo*, da mesma forma, foram resistentes à oxacilina (80,1%) e à ciprofloxacina (64,30%). Nesta avaliação, foi identificada maior sensibilidade desse microrganismo à vancomicina (92,0%), rifampicina (91,7%) e à amicacina (88,5%), o que foi corroborado por Leão et al.,⁽¹²⁾ que informaram que os cocos Gram-positivos isolados em seu estudo foram também sensíveis à vancomicina. De acordo com Alves e colaboradores,⁽²⁰⁾ os isolados de *Staphylococcus coagulase-negativo* apresentaram uma sensibilidade de 100% à teicoplanina, enquanto que, no presente trabalho, a mesma bactéria exibiu uma taxa de 84,2%. Nesta pesquisa, *Klebsiella* sp. foi mais resistente à sulfazotrim (88,9%), à amoxicilina-ácido clavulânico (85,7%) e à ceftriaxona (80,0%). De acordo com Leão e colaboradores,⁽¹²⁾ entre as enterobactérias, a maior taxa de resistência observada foi para ampicilina (100%), seguida por trimetoprim-sulfametoxazol (70%) e piperacilina (60%). Esse estudo concorda com o presente trabalho, pois *Klebsiella* sp. também aqui se apresentou sensível aos carbapenêmicos.

Importa mencionar que o aumento nas taxas de sepses e, conseqüentemente, de seu diagnóstico e nível de resistência aos antimicrobianos se deve aos procedimentos de natureza invasiva, à antibioticoterapia prolongada, corticoterapia e cistostáticos, a doenças neoplásicas e à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Sida).^(26,27)

CONCLUSÃO

Foram avaliadas 387 hemoculturas e, dessas, 58 foram positivas, sendo que 44,8% (26) foram causadas por *Staphylococcus coagulase-negativo* e 17,2% (10) por *Klebsiella* sp. Em relação ao gênero, 47,0% (119) foram do gênero masculino e 42,7% (108) do feminino. A idade média dos pacientes com infecção causada por *Staphylococcus coagulase-negativo* foi de 53,5 anos e por *Klebsiella* sp. foi de 59,8 anos. *Staphylococcus coagulase-negativo* apresentou resistência à penicilina (82,6%) e à oxacilina (76,9%), já *Klebsiella* sp. apresentou resistência à sulfazotrim (88,9%) e à amoxicilina-ácido clavulânico (85,7%). *Staphylococcus coagulase-negativo* apresentou sensibilidade à vancomicina

(92,0%) e à rifampicina (91,7%), enquanto que *Klebsiella* sp. apresentou sensibilidade aos carbapenêmicos (100%) e à piracilina/tazobactam (87,5%).

Agradecimentos

À Mariana Lima Prata Rocha pela orientação e ao responsável técnico pelo setor de microbiologia da UNIPAC pela cessão dos dados.

Abstract

Verification of bacteria in blood samples symbolizing important diagnostic tool in nosocomial infection. A huge public health problem is represented by hospital infections, since the time of admission of the patient is increased morbidity and mortality are elevated, treatment costs are higher and there is a direct relationship of this fact with the proliferation of multiresistant bacteria. This study aimed to analyze the total number of blood cultures performed by a laboratory, the amount of positive blood cultures, mean age and age range of patients affected by infection, etiology and sensitivity profile of the predominant bacteria. We analyzed 387 blood cultures from 253 patients. The male patients were more affected by infections, mean age equivalent of 55.7. The most prevalent bacteria found were coagulase-negative Staphylococcus and Klebsiella sp. We realize that coagulase-negative Staphylococcus presented less resistant Klebsiella sp compared to the totality of antimicrobials, we highlight that coagulase-negative Staphylococcus remained resistant to penicillin and oxacillin and Klebsiella sp had 100% sensitivity to carbapenems.

Keywords

Staphylococcus; Klebsiella; Blood Culture; Antimicrobial susceptibility

REFERÊNCIAS

- Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Principais síndromes infecciosas. Infecção sistêmica. 2007. Brasília, Módulo 1.
- Carvalho RH, Vieira JF, Gontijo Filho PP, Ribas RS. Sepsis, sepse grave e choque séptico: aspectos clínicos, epidemiológicos e prognóstico em pacientes de unidade de terapia intensiva de um hospital universitário. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Sept-Oct;43(5):591-3.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. Intensive Care Med. 2007 Apr;33(4):606-18.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Jul;168(1):77-84.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. Crit Care Med. 2006 Feb;34(2):344-53.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med. 2001 Nov;345(19):1368-77.
- Silva E, Pedro MA, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CLO, Janiszewski M, et al. Brazilian sepsis epidemiological study (Bases study). CritCare. 2004 Aug;8(4):251-60.
- Sales Junior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. Sepsis Brasil: Estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. Rev Bras Ter Intensiva. 2006 Jan/Mar;18(1):9-17.
- Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. The Lancet. 2003 Jun;361(9374):2068-77.
- Munford RS, Mendell GL, Bennett GE, Dloin R. Sepsis, severe sepsis and septic shock. Principles and practice of infectious diseases. New York: Elsevier. 2005: 906-26.
- Aguiar RE. História natural da sepse: artigo de revisão. Brasília Médica. 2010;47(1):69-76.
- Leão LSNO, Passos XS, Reis C, Valadão LMA, Silva MRD, Pimenta FC. Fenotipagem de bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes críticos. RevSocBrasMed Trop. 2007 Set-Out;40(5):537-40.
- Karchmer AW. Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors, and implications. Clin Infect Dis. 2000 Sep;4:139-43.
- Beekmann SE, Diekema DJ, DoernGV. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. InfectControlHospEpidemiol. 2005 Jun;26(6):559-66.
- Andrade D, Leopoldo VC, Haas VJ. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de terapia intensiva de hospital brasileiro de emergências. RevBras Ter Intensiva. 2008 Jan/Mar; 18(1).
- Peres-Bota D, Rodriguez H, Dimopoulos G, DaRos A, Mélot C, Struelens MJ, Vincent JL. Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? J Infect. 2003 Nov;47(4):307-16.
- Pittet D. Infection control and quality health care in the new millennium. Am J InfectControl. 2005 Jun;33(5):258-67.
- Martin Junior PO, Porto ER, Silva RN, Pinhati HMS. Prevalência do Staphylococcus aureus resistente à meticilina, isolado em hemoculturas de pacientes internados em alguns hospitais do Distrito Federal, Brasil. Brasília Méd. 2009;46(2):125-30.
- Fernandes AP, Silva CJ, Costa C, Schreiber AZ, Mello FA, Teixeira-Loyola ABA. Incidência bacteriana em hemoculturas no hospital das clínicas Samuel Libano de Pouso Alegre MG. Rev eletrônica Acervo Saúde. 2011;2:122-33.
- Alves LNS, Oliveira CR, Silva LAP, Gervásio SMD, Alves SR, Sgavioli GM. Hemoculturas: estudo da prevalência dos microrganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em unidade de terapia intensiva. J Health Sci Inst. 2012;30(1):44-7.
- Guilardie AO, Turchi MD, Martelli CMT, Primo MGB, Batista LJA. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. Rev Assoc Med Bras. 2007;53(1):34-8.
- Pereira CSB, Goulart ME, Tupinambá G, Moraes SR. Prevalência microbiana em diversas amostras clínicas obtidas de pacientes do CTI de um hospital militar. Rev de Saúde, Vassouras. 2012 Jul/Dec;3(2):49-58.
- Lisboa T, Faria M, Hoher JA, Borges LAA, Gómez J, Shifelbain L, et al. Prevalência de infecção nosocomial em unidades de terapia intensiva do Rio Grande do Sul. Rev bras ter intensiva. 2007 Oct/Dec;19(4):414-20.
- Bodonaik NC, Moonah S. Coagulase negative staphylococci from bloods cultures contaminants or pathogens? West Indianmed J. 2006 Jun;55(3):174-82.
- Cabral EV, Poveda VB. Perfil microbiológico e resistência bacteriana em unidade de tratamento intensivo. Journalofnursing UFPE. 2008;2(4).
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001 Jul;29(7):1303-10.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1970 through 2000. N Engl J Med. 2003 Apr;348(16):1546-54.

Correspondência

Mariana Lima Prata Rocha

Rua Barão de Camargos, 695 – Centro
Uberlândia - MG

Perfil de sensibilidade de *staphylococcus* sp. isolados de infecções hospitalares em um hospital de nível IV no Rio Grande do Sul, Brasil

Sensitivity profile of staphylococcus sp. isolated of hospital infections in a level IV hospital in Rio Grande do Sul, Brazil

Carina Talice Stübe Herman¹

Dieine Caroline de Melo Wirzbicki¹

Cíntia Cristina Oliveski²

Christiane de Fátima Colet¹

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de amostras do gênero *Staphylococcus* sp. isoladas de infecções hospitalares, em um hospital de nível IV do Rio Grande do Sul, e comparar com infecções comunitárias. Os dados foram obtidos através de documentos arquivados na instituição hospitalar pesquisada e no Laboratório de Análises Clínicas. Foram analisadas todas as cepas de *Staphylococcus* sp. no período de maio de 2011 a abril de 2012, obtendo-se 121 cepas de infecções comunitárias e 174 de infecções hospitalares. O estudo revelou que as cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de infecções hospitalares são mais resistentes aos antimicrobianos, quando comparadas às cepas isoladas em infecções comunitárias, podendo apresentar 24,62 vezes mais chance de serem resistentes. Nesse sentido, as infecções de origem comunitária apresentaram um grande percentual de sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados. Já as infecções de origem hospitalar apresentaram elevado grau de resistência ao antimicrobianos avaliados, particularmente com relação à oxacilina (59,19%). Dessa forma, um constante acompanhamento no perfil de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus* sp. é de fundamental importância para que se possa determinar a melhor terapia antimicrobiana a ser adotada, diminuindo o índice de cepas resistentes..

Palavras-chave

Sensibilidade; *Staphylococcus* sp.; Infecções comunitárias; Infecções hospitalares

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* sp. é um dos principais microrganismos causadores de infecções, tanto de origem hospitalar quanto comunitária. São cocos Gram-positivos que fazem parte da microbiota da pele e membranas mucosas.⁽¹⁾ Esse gênero pode provocar diferentes tipos de infecções, desde as mais simples, como as relacionadas à pele (inflamações do folículo piloso, celulites), até infecções com alto risco de morbidade e mortalidade, como pneumonias, infecções de corrente sanguínea e septicemias. Essa bactéria tem sido considerada um patógeno altamente infectante que apresenta elevada resistência aos antibacterianos.⁽²⁻⁴⁾

Atualmente, inúmeras classes de antibacterianos são empregadas no tratamento de infecções comunitárias e hospitalares causadas por *Staphylococcus* sp., podendo ser citados os macrolídeos (eritromicina), lincossamidas (clindamicina), penicilinas (oxacilina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), sulfonamidas (sulfametoxazol e trimetoprima), aminoglicosídeos (gentamicina) e glicopeptídeos (vancomicina).⁽⁵⁾ Todavia, o antibacteriano usado

em cada infecção será determinado pelo perfil de suscetibilidade da cepa de *Staphylococcus* sp. Esse teste deverá ser realizado para todos os pacientes com clínica, uma vez que o perfil de suscetibilidade difere de uma região geográfica para outra ou de um hospital para outro, o que impacta, diretamente, a forma como serão utilizados os antimicrobianos.⁽⁶⁾

Com dados relacionados ao perfil de sensibilidade, pode-se identificar as principais características das cepas, o que é fundamental para o estabelecimento de uma política de uso racional dos antimicrobianos, permitindo, com isso, a escolha do antimicrobiano mais adequado para cada tipo de infecção. Importa mencionar que o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, ao contrário, contribui para o surgimento de microrganismos resistentes, o que constitui um grave problema de saúde pública, pois acarretam, além de falhas terapêuticas, aumento de tempo e de custos hospitalares.^(1,5)

Nesse sentido, para minimizar a incidência de microrganismos resistentes na comunidade e na área hospitalar, cabe ao profissional farmacêutico realizar o controle da

¹Departamento de Ciências da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ – Ijuí, RS.

²Enfermeira do Serviço de Controle de Infecção do Hospital de Caridade de Ijuí – Ijuí, RS.

antibioticoterapia, zelando pelo seu uso racional e garantindo a eficácia do tratamento antimicrobiano.^(7,8)

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é realizar uma análise comparativa do perfil de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus* sp. recuperados de infecções de origem hospitalar e comunitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Para fins desta pesquisa, consideraram-se os seguintes conceitos:⁽⁹⁾

– *Infecção hospitalar*: É a infecção adquirida após a internação do paciente, que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.

– *Infecção comunitária*: Aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital ou infecção que está associada com complicação ou extensão da infecção já presente na admissão, a menos que haja troca de microrganismos com sinais ou sintomas fortemente sugestivos da aquisição de nova infecção.

– *CCIH*: Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, órgão de assessoria à autoridade máxima da instituição e de execução de controle de infecção hospitalar.

Foi realizado um estudo retrospectivo e quantitativo em um hospital de nível IV, no Rio Grande do Sul. Este hospital classifica-se dessa forma por apresentar mais que 200 leitos e possuir serviços de alta complexidade. Um laboratório de análises clínicas, sediado, igualmente, no Rio Grande do Sul, também participou da presente pesquisa. As informações referentes ao perfil de sensibilidade das infecções hospitalares foram obtidas junto ao banco de dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do hospital em estudo. As informações referentes às infecções comunitárias foram obtidas pelo acesso a laudos de exames de microbiologia e perfil de sensibilidade do laboratório de análises clínicas. Foram analisadas todas as cepas de *Staphylococcus* sp. no período de um ano, entre maio de 2011 e abril de 2012. As cepas foram isoladas de fontes distintas como swab, sangue, urina e aspirados.

As cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas nas infecções de origem comunitária e hospitalar foram testadas, previamente, para antimicrobianos padronizados pela CCIH e pelo laboratório de análises clínicas. Sete antimicrobianos foram utilizados, sendo eles: ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfametoxal e trimetoprima e vancomicina. Entretanto, nem todas as amostras bacterianas foram testadas frente aos antimicrobianos utilizados neste estudo. O perfil de suscetibilidade das cepas de *Staphylococcus* de origem comunitária e hospitalar foi realizado pelo teste de disco difusão em agar Mueller-Hinton, empregando-se os protocolos CLSI-M100-S20/ M2-A10 e M7-A8. Os resultados foram classificados em sensível (S) e resistente (R).

A análise comparativa entre o perfil de resistência a *Staphylococcus* sp. hospitalar e comunitário foi realizada por meio do teste de Razão de Chances (Odds Ratio -OR), com índice de confiança de 95%.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional do Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, parecer CEP nº50117.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período da coleta de dados, o número de casos de infecções de origem comunitária causadas por cepas de *Staphylococcus* sp. foi de 121, enquanto que o número de casos de infecções hospitalares ficou em 174.

Os dados demonstraram haver diferença significativa de resistência das cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de infecções hospitalares e comunitárias, sendo que as razões de chance foram superiores nos diferentes antimicrobianos testados, demonstrando que os *Staphylococcus* sp. apresentam de 7,83 a 24,62 vezes mais chances de serem resistentes em uma infecção hospitalar, quando comparada a uma infecção comunitária (Tabela 1). Trabulsi & Alterthum⁽¹⁰⁾ corroboram com esses resultados, salientando que as amostras de pacientes hospitalizados, de uma forma geral, possuem maior resistência quando comparadas a amostras de pacientes que apresentam infecções comunitárias.

O fato das cepas hospitalares de *Staphylococcus* sp. apresentarem maior resistência comparativamente às cepas comunitárias se deve, principalmente, aos inúmeros fatores de risco apresentados por pacientes hospitalizados como a constante exposição a procedimentos invasivos (catéteres venosos, urinários) e a intensa utilização de antimicrobianos. Essa resistência está entre as principais causas de morbidade e mortalidade e é responsável pelo aumento no tempo de hospitalização e, consequentemente, por custos adicionais para o tratamento.^(5,11)

O perfil de sensibilidade/resistência das infecções comunitárias e hospitalares encontra-se descrito na Tabela 1. A partir desses dados, é possível verificar que a gentamicina apresentou a maior razão de chances, portanto, para esse antimicrobiano, as cepas de *Staphylococcus* sp. têm 24,64 vezes mais chances de serem resistentes em uma infecção hospitalar. A gentamicina apresenta atividade contra o *Staphylococcus* sp., porém limita-se a associações sinérgicas com as penicilinas, não sendo utilizado como fármaco para uso isolado, frente a esse microrganismo. Além disso, não possui apresentação comercial para administração por via oral, o que também justifica o baixo índice de resistência apresentado nas infecções comunitárias (6,61%).^(12,13)

As cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas nas infecções hospitalares mostraram elevada resistência à oxacilina, sendo que essas cepas apresentaram 15,38 vezes mais chances de serem resistentes em uma infecção hospitalar do que em uma infecção comunitária (Tabela 1). Essa alta resistência apresentada para a oxacilina (59,19%) tem sido

Tabela 1 - Percentual de sensibilidade/resistência nas infecções comunitárias e hospitalares frente a antimicrobianos em um hospital de nível IV

Antimicrobiano	Infecções Comunitárias		Infecções Hospitalares		Razão de Chances (IC 95%)
	Sensíveis % (n)	Resistentes % (n)	Sensíveis % (n)	Resistentes % (n)	
Clindamicina	79,33% (96)	19,84% (24)	25,86% (45)	74,14% (129)	11,47 (6,54-20,10)
Ciprofloxacino	84,30% (102)	9,92% (12)	31,61% (55)	66,67% (116)	17,93 (9,09-35,34)
Eritromicina	67,77% (82)	32,23% (39)	20,69% (36)	77,01% (134)	7,83 (4,61-13,29)
Gentamicina	91,74% (111)	6,61% (8)	35,63% (62)	63,22% (110)	24,62 (11,26-53,81)
Oxacilina	87,60% (106)	8,26% (10)	40,80% (71)	59,20% (103)	15,38 (7,52-31,45)
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	87,60% (106)	11,57% (14)	44,83% (78)	54,60% (95)	9,22 (4,90-17,36)
Vancomicina	100,00% (121)	0,00% (0)	100,00% (174)	0,00% (0)	

também relatada na literatura (Almeida et.al.,⁽¹⁴⁾ Brasil⁽¹⁵⁾ e Catão et al.⁽¹⁶⁾) Esse índice mais elevado para a oxacilina reforça a importância da execução do teste de sensibilidade aos antimicrobianos antes de prescrição para pacientes hospitalizados.⁽¹⁴⁾

O uso de glicopeptídeos, cujo principal representante é a vancomicina, pode ser uma opção terapêutica para o tratamento de *Staphylococcus* sp. resistentes à oxacilina. No presente estudo, a sensibilidade dos *Staphylococcus* sp., tanto nos casos de infecções comunitárias quanto nos casos de infecções hospitalares, foi de 100% para a vancomicina. Taxas elevadas de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus* sp. para esse antimicrobiano também foram reportadas por Brown & Ngeno.⁽¹⁷⁾ No entanto, inúmeras cepas de *Staphylococcus* sp. com sensibilidade diminuída ou resistentes à vancomicina já foram identificadas em todo o mundo. No Brasil, em 2000, foram encontradas as primeiras cepas de *Staphylococcus* sp. com resistência à vancomicina, no município de Queimados, no Rio de Janeiro.⁽²⁾

Considerando o uso racional de antimicrobianos, a vancomicina deve ser empregada, especificamente, para infecções por bactérias Gram-positivas resistentes à oxacilina. De forma geral, contudo, os *Staphylococcus* sp. respondem muito melhor à oxacilina do que à vancomicina.⁽⁴⁾

O gênero *Staphylococcus* sp. é suscetível à ação de diferentes antimicrobianos, porém, devido à sua grande capacidade de desenvolver resistência, a escolha adequada da antibioticoterapia é mais bem definida com bases em testes de sensibilidade, uma vez que a escolha do antimicrobiano irá depender, dentre outros fatores clínicos, da característica da cepa causadora da infecção. Assim, o antimicrobiano de primeira escolha são as penicilinas G ou V, para as cepas de *Staphylococcus* sp. não produtoras de beta-lactamases. Já para as cepas produtoras de beta-lactamases, opta-se por uma penicilina resistente a elas, como a oxacilina, porém, nos casos de cepas resistentes à oxacilina, a vancomicina é utilizada em associação com aminoglicosídeos e rifampicina ou, ainda, de forma isolada.^(10,18)

Para Silva,⁽¹⁹⁾ as cefalosporinas também podem ser utilizadas no tratamento de cepas de *Staphylococcus* sp. quando essas não apresentarem resistência à oxacilina, todavia, essa classe de antimicrobianos não foi testada neste estudo.

Com base nos resultados de sensibilidade/resistência local do gênero *Staphylococcus* sp., nas infecções comunitária e hospitalar, podem-se realizar possíveis indicações de fármacos para o tratamento dessas infecções (Tabela 2). Dessa forma, como sugestão de primeira escolha, para a terapia das infecções comunitárias, foi selecionado o ciprofloxacino, considerando variáveis como menor custo, a alta sensibilidade das cepas a este fármaco nas infecções comunitárias (84,30%) e facilidade posológica. A associação de sulfametoxazol e trimetoprima constitui-se também numa boa opção de escolha para o tratamento das infecções de origem comunitária, devido a alta sensibilidade apresentada pelas cepas de *Staphylococcus* sp. (87,60%) e ao baixo custo do tratamento.^(13,20)

Tabela 2 - Sugestões de terapia antimicrobiana conforme origem das infecções em um hospital de nível IV

	Infecções Comunitárias	Infecções Hospitalares
1ª Escolha	Ciprofloxacino/sulfametoxazol e trimetoprima	Oxacilina
2ª Escolha	Clindamicina	Vancomicina

A clindamicina pode ser utilizada como segunda escolha por apresentar atividade específica contra os *Staphylococcus* sp., mesmo os produtores de penicilase e resistentes à oxacilina. Além disso, as reações alérgicas são pouco frequentes, proporcionando condições de segurança ao fármaco. A clindamicina é disponível para administração por via oral e endovenosa, o que facilita o tratamento medicamentoso em pacientes com infecções comunitárias.^(8,13,20)

A não indicação da eritromicina, como opção de primeira escolha, para o tratamento de infecções comunitárias,

justifica-se devido à alta taxa de resistência a esse fármaco (32,23%). A oxacilina e a gentamicina não possuem forma farmacêutica comercial disponível para o tratamento por via oral, dificultando seu uso em infecções comunitárias.⁽¹³⁾

Para as infecções hospitalares, embora os índices de resistência aos antimicrobianos, neste estudo, apresentem-se elevados, o uso da oxacilina é justificado, considerando sua especificidade sobre essa cepa, bem como pela possibilidade da vancomicina gerar, num futuro, cepas resistentes, se essa for utilizada como droga de primeira escolha, o que limitaria o tratamento à linezolida.⁽⁴⁾

Cabe salientar que devem ser observadas as especificidades de cada caso clínico, visto que, em infecções mais graves, causadas por *Staphylococcus* sp., é recomendado o início da terapia empírica com vancomicina, até haver o resultado do antibiograma. Após o resultado das culturas, sendo a cepa sensível à oxacilina ou outro antimicrobiano com menor espectro de ação, deve-se realizar o descalonamento ou descontinuação do antimicrobiano, retirando a vancomicina e introduzindo o antimicrobiano, ao qual a cepa apresentou sensibilidade.^(12,21)

A clindamicina, por apresentar atividade específica contra *Staphylococcus* sp., inclusive contra os resistentes à oxacilina, poderia ser uma opção para o tratamento de infecções hospitalares, entretanto, as cepas apresentaram aqui índices de resistência mais elevados (74,14%) do que à oxacilina (59,20%), não justificando seu uso como antimicrobiano de primeira escolha nas infecções hospitalares.⁽²⁰⁾

Pode-se observar que, nas infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus* sp., a terapia antimicrobiana é extremamente limitada, devido ao alto índice de resistência apresentado para os antimicrobianos, na presente pesquisa. Nesse sentido, cabe salientar que as infecções causadas por bactérias resistentes, ao aumentarem exponencialmente, dificultam ou impossibilitam a cura do indivíduo, elevando os custos do tratamento, devido ao maior tempo de internação, bem como produzindo custos indiretos para a família e a sociedade. Além disso, a produção de novos fármacos antimicrobianos encontra-se aquém do surgimento de cepas multirresistentes, pois o desenvolvimento e a comercialização de novos antimicrobianos têm sido progressivamente menores.⁽²²⁾

CONCLUSÕES

As cepas de *Staphylococcus* sp. de origem comunitária isoladas, neste estudo, apresentaram uma maior sensibilidade geral aos antimicrobianos, quando comparadas às cepas hospitalares. Verificou-se que as cepas de infecções hospitalares mostraram-se resistentes às diversas classes antimicrobianas avaliadas, limitando a terapia ao uso de glicopeptídeos, como a vancomicina.

Este estudo é de fundamental importância para a comunidade e para as instituições hospitalares, uma vez

que poderá trazer subsídios para otimizar a antibioticoterapia e buscar o uso racional de medicamentos.

Abstract

The aim of this study was to analyze the antimicrobial susceptibility of Staphylococcus sp. genus isolated from a nosocomial infection in a level IV hospital from Rio Grande do Sul State and compare it to community infections. The data were collected from documents archived in the researched Hospital and in the Clinical analysis laboratory as well. All the Staphylococcus sp. strains were collected and analyzed from May 2011 to April 2012 obtain 121 strains of community infections and 174 of nosocomial infections. The study evidenced the Staphylococcus sp. strains isolated from nosocomial infections are more resistant to the antimicrobials when compared to isolated community strains. It may reveal the probability of 24.62 times more likely of being resistant. In this means the community infections presented the higher level of susceptibility to the antimicrobials tested. By the other hand the nosocomial infections presented the higher level of resistance to the most part of the antimicrobial, particularly for oxacilin (59.19%). This way a constant monitoring of the Staphylococcus sp. strain susceptibility presents a fundamental matter to determinate the best antimicrobial therapy reducing the rate of resistant strains in the population.

Keywords

Sensitivity; Staphylococcus sp.; Nosocomial infections; Community infections

REFERÊNCIAS

1. Fernandes AT, Fernandes MOV, Filho NR. Infecção hospitalar e suas interfaces na área de saúde. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 336-338/1564.
2. Santos AL et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Med Lab. 2007; Rio de Janeiro, 43(6):413-423.
3. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. Rev Panam. 2005;7(3):34-36.
4. Rodrigues EAPC, Richmann R. IRAS - Infecção relacionada à assistência à saúde: orientações práticas. São Paulo: Sarvier; 2008. p. 96.
5. Corrêa L, Pereira CAP, Rodrigues EAC. Racionalização do uso de antimicrobianos em hospitais. In: Oliveira AC. Infecções hospitalares. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2005. p. 368-379.
6. Farias WVL et al. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de Staphylococcus aureus isoladas em 12 hospitais. Rev. Assoc. Med. Bras. 1997; São Paulo, 43(3):199-204.
7. Bisson, MP. Farmácia clínica e atenção farmacêutica. 2. ed. Ed. Manole Ltda; 2007.
8. Naber KG. Treatment options for acute uncomplicated cystitis in adults. J Antimicrob Chemother. 2000;46:23-27.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Diretriz e Normas para a Prevenção e Controle das Infecções Hospitalares: Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8c6cac8047457a6886d6d3fbc4c6735/PORTARIA+N%C2%B0+2.616,+DE+12+DE+MAIO+DE+1998.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 18/05/15.
10. Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 5a ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p. 182.
11. Couto CR, Pedrosa TMG, Nogueira JM. Infecção hospitalar: epidemiologia e controle. 2a ed. Rio de Janeiro: Médico e Científico Ltda; 1997.
12. Fuchs FD, Wanennmacher L, Ferreira MBC. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2006. p. 342-372.

13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta a banco de dados dos produtos registrados de empresas de medicamentos e hemoderivados. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp. Acesso em: 21/08/2012.
14. Almeida MI et al. Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares. Rev Elet de Enf [Internet] 2007;9(2):489-495.
15. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM 2009 jul. 10; ano III, edição n. 1. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm. Acesso em: 21/02/2012.
16. Catão RMR et al. Prevalência de infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Rev Enferm UFPE on line. 2013;7(8):5257-64.
17. Brown PD, Ngeno C. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and community sources in southern Jamaica. Int J Infect Dis. 2007 May;11(3):220-5.
18. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2002. p. 576-594.
19. Silva P. Farmacologia. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2002. p. 1066-1071.
20. Reis AMM, Castro MS. Principais antimicrobianos empregados no âmbito hospitalar. In: Oliveira AC. Infecções hospitalares. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2005. p. 380-429.
21. Salomão R et al. Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico: abordagem do agente infeccioso - controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano. Rev Bras Ter Intensiva. 2011;23(2):145-57.
22. WHO. Programmes and projects: antimicrobial resistance. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/antibiotic-resistance>. Acesso em: 24/07/2012.

Correspondência

Dieine Caroline de Melo Wirzbicki
Rua Paulo Klemann, 474, Centro
98700-000 - Ijuí, RS, Brasil
E-mail: dieinew@yahoo.com.br

Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre a estabilidade dos parâmetros do hemograma

Effects of time and storage temperature over the stability of hemogram parameters

Leonardo Sokolnik de Oliveira¹

Camila Caetano Batista²

Cassio Negro Coimbra³

Resumo

O objetivo deste trabalho é mensurar o efeito da temperatura e tempo de armazenamento na qualidade do hemograma, já que esse é um dos exames laboratoriais mais solicitados e também porque o modelo utilizado por muitos laboratórios, atualmente, consiste em postos de coleta distantes do local de realização dos exames. Foram coletadas amostras de sangue, utilizando sistema de coleta a vácuo, de 15 voluntários e que foram, em seguida, analisadas em 24 e 48 horas, após a coleta, sendo uma parte do material armazenada em temperatura ambiente e outra, refrigerada. As contagens hematológicas foram realizadas no equipamento Sysmex XE 2100. O principal parâmetro do hemograma alterado pela temperatura e tempo de armazenamento foi o VCM, que sofreu um aumento estatisticamente ($P < 0,001$) e clinicamente significativo quando as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por 24 horas (11,4%) e 48 horas (14,8%). As amostras armazenadas em temperatura refrigerada não mostraram alteração significativa em nenhum parâmetro do hemograma. A análise morfológica das células mostrou macrocitose nas hemácias armazenadas em temperatura ambiente e discreta poiquilocitose nas amostras mantidas sob refrigeração. Estes resultados indicam que as amostras de sangue podem ser consideradas estáveis para o hemograma por até 48 horas, desde que mantidas sob refrigeração.

Palavras-chave

Hemograma; Estabilidade; Interferentes pré-analíticos

INTRODUÇÃO

O hemograma é um dos exames laboratoriais mais solicitados na prática clínica, pois fornece resultados de parâmetros úteis no diagnóstico e acompanhamento terapêutico de doenças como anemias, leucemias, processos infecciosos e distúrbios de coagulação. Neste exame, são analisados parâmetros quantitativos e qualitativos das hemácias, leucócitos e plaquetas que estão sujeitos a interferências entre o momento da coleta do material e a realização do exame, os chamados interferentes pré-analíticos. Estes interferentes podem causar alterações na quantidade ou qualidade dos parâmetros analisados, podendo induzir a uma conclusão que não condiz com a real situação clínica do paciente.

O modelo de medicina laboratorial utilizado, atualmente, consiste, muitas vezes, em postos de coleta distribuídos por diversas regiões e uma central técnica que centraliza o processo analítico. Este modelo proporciona um melhor aproveitamento do parque de equipamentos e de recursos humanos disponíveis, além de uma maior padronização

técnica dos exames, entretanto, torna necessário o transporte do material coletado das diversas unidades de coleta para a central analítica. Surgem, então, dois interferentes pré-analíticos importantes sobre os parâmetros do hemograma: tempo e temperatura de armazenamento da amostra.

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do tempo e da temperatura de armazenamento sobre os parâmetros do hemograma, de maneira a identificar qual o período e a temperatura de estabilidade máxima de amostras de sangue periférico coletadas com anticoagulante EDTA, assim contribuindo para a garantia da qualidade deste importante exame laboratorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue periférico por coleta a vácuo, em tubos contendo EDTA tripotássico, de 15 voluntários não fumantes, sem sinal clínico de doença hematológica, com idades entre 19 e 31 anos, sendo 10 mulheres e 5 homens. O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo

¹Doutor. Professor. Universidade de Santo Amaro – São Paulo, SP.

²Acadêmica de Biomedicina. Universidade de Santo Amaro – São Paulo, SP.

³Doutor. Universidade de Santo Amaro – São Paulo, SP.

Amaro e todos os voluntários assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As amostras foram analisadas em equipamento automatizado Sysmex XE 2100, nas seguintes condições: a) basal: em até duas horas após a coleta; b) 24 horas após a coleta e c) 48 horas após a coleta. Em cada condição, as amostras foram mantidas sob refrigeração de 4°C ou à temperatura ambiente.

Além dos parâmetros quantitativos fornecidos pela análise automatizada também foram analisadas características morfológicas das células sanguíneas em cada condição.

Os valores de cada condição foram comparados pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pela análise de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni, na comparação entre cada grupo. Desta forma, foram consideradas estatisticamente significantes valores de P inferiores a 0,05, para o teste de Kruskal-Wallis e de 0,016, para o teste de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Série vermelha (Eritrograma)

A série vermelha foi a que sofreu maior interferência do tempo e, principalmente, da temperatura de armazenamento. A principal alteração encontrada foi referente ao VCM (Volume Corpuscular Médio), que sofreu um aumento estatística e clinicamente significativo quando as amostras foram armazenadas, em temperatura ambiente, por 24 horas (11,4%) e 48 horas (14,8%) ($P < 0,001$). Esta diferença se torna estatisticamente significativa após 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente ($P=0,002$) e se torna maior ainda após 48 horas ($P<0,001$), conforme demonstram a Figura 1 e a Figura 2. Houve também aumento no valor do hemató-

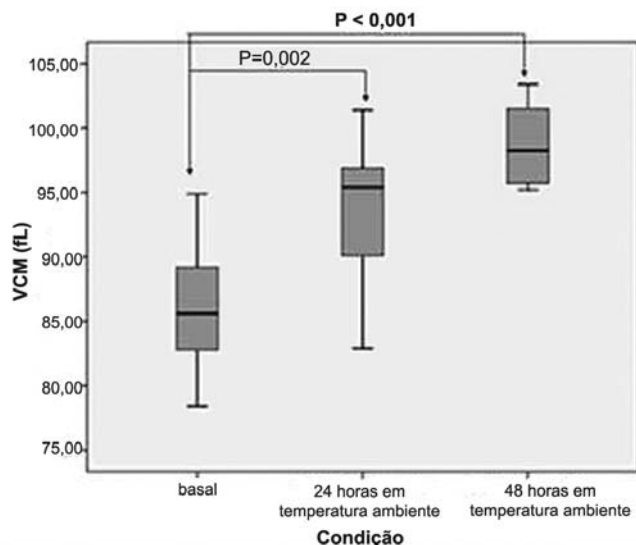


Figura 1. Variação do VCM em amostras mantidas em temperatura ambiente. Amostras mantidas em temperatura ambiente mostraram aumento do VCM quando comparadas ao basal, $P=0,002$ (basal x 24 horas) e $P<0,001$ (basal x 48 horas).

crito e diminuição no valor de CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), em amostras mantidas em temperatura ambiente, por 24 e 48 horas (Figuras 3 e 4). Estes resultados eram esperados uma vez que tanto o hematócrito como o CHCM são calculados em função do VCM, sendo o primeiro diretamente proporcional e o segundo inversamente proporcional. Estas alterações não ocorreram em amostras mantidas sob refrigeração.

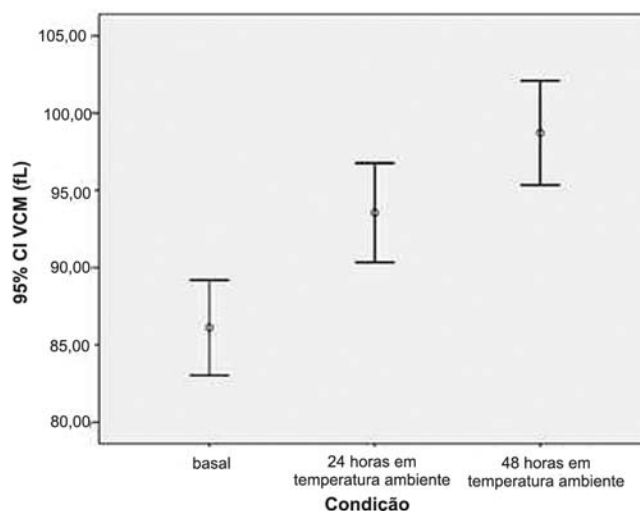


Figura 2. Intervalo de confiança de 95% para VCM - Intervalo de confiança de 95% para os valores de VCM nas amostras mantidas em temperatura ambiente.

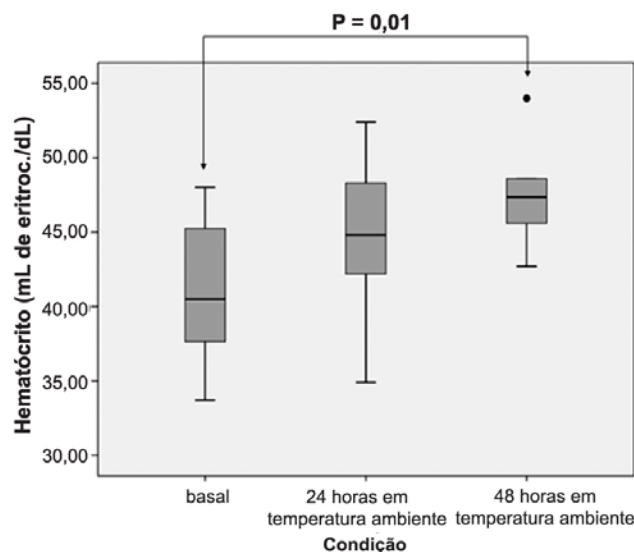


Figura 3. Elevação do hematócrito em amostras mantidas em temperatura ambiente. Amostras mantidas por 48 em temperatura ambiente mostraram aumento do valor de hematócrito quando comparadas ao valor basal ($P=0,01$).

Outro parâmetro que sofreu interferência significativa do ponto de vista estatístico e clínico, principalmente da temperatura de armazenamento, foi o RDW (Red Cell Distribution Width). Este sofreu um incremento de 11,5%, após 24 horas ($P<0,001$), e de 13,84%, após 48 horas ($P<0,001$).

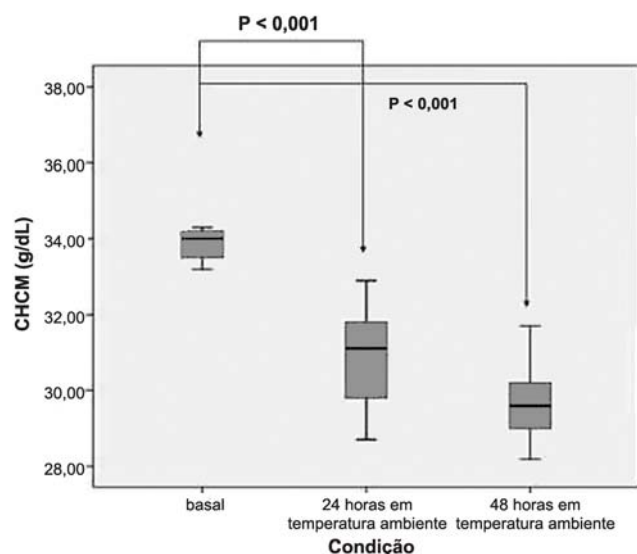


Figura 4. Diminuição dos valores de CHCM em amostras mantidas em temperatura ambiente. Amostras mantidas em temperatura ambiente mostraram redução dos valores de CHCM, $P < 0,01$ (basal x 24 horas) e (basal x 48 horas).

de armazenamento, em temperatura ambiente (Figura 5). Este resultado corrobora os achados de microscopia onde foi observada maior frequência de anisocitose e macrocitose nas amostras armazenadas em temperatura ambiente, embora, nas amostras armazenadas em temperatura refrigerada, também tenha sido observada uma discreta poiquilocitose com presença de hemácias crenadas.

Os valores da determinação de hemoglobina e da contagem de eritrócitos não mostraram interferências clínicas ou estatisticamente significativas em nenhuma das condições estudadas.

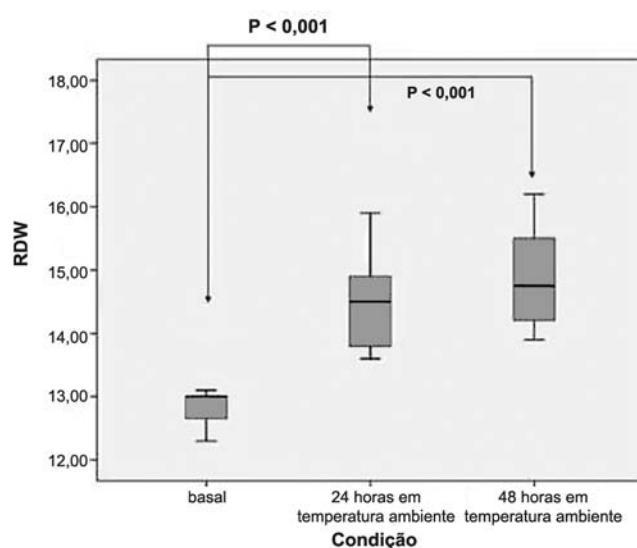


Figura 5. Elevação do RDW em amostras mantidas em temperatura ambiente. Amostras mantidas em temperatura ambiente mostram aumento do valor de RDW, $P < 0,001$ (basal x 24 horas) e (basal x 48 horas).

Série branca (Leucograma)

Houve uma ligeira diminuição na contagem global de leucócitos nas amostras mantidas sob refrigeração, mas que não foi significativa do ponto de vista estatístico ou clínico. A mediana da contagem de leucócitos, logo após a coleta, foi de 6.860 leucócitos/mm³, enquanto que, 48 horas após a coleta, a mediana para as amostras mantidas em temperatura refrigerada foi de 6.330 leucócitos/mm³. A análise morfológica mostrou picnose em neutrófilos, que foi mais evidente em amostras mantidas em temperatura ambiente, porém, também presente, mas em menor intensidade, em amostras mantidas sob refrigeração por 48 horas.

Plaquetas

A contagem de plaquetas mostrou uma pequena redução quando as amostras foram mantidas em temperatura refrigerada, embora sem significado estatístico ou clínico. A mediana das contagens, em número de plaquetas por mm³, passou de 268.500 para 248.500, após 48 horas de armazenamento, em temperatura refrigerada, enquanto que, após 48 horas de armazenamento, em temperatura ambiente, a mediana das contagens foi de 267.500.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os estudos que visam avaliar o grau de interferência do tempo e da temperatura de armazenamento sobre os parâmetros do hemograma são escassos. Alguns artigos já estudaram estes efeitos sobre os resultados da contagem de eritrócitos, hematócrito, VCM e dosagem de hemoglobina e verificaram que os níveis de hemoglobina e a contagem de eritrócitos permanecem estáveis por até 76 horas, independente da temperatura de armazenamento, mas o hematócrito e o VCM elevam-se de maneira importante, quando a amostra é mantida em temperatura ambiente, e que este aumento é inibido pela refrigeração da amostra, que mantém a estabilidade destes analitos por até 76 horas.⁽¹⁾

Em outro estudo envolvendo 27 voluntários, as amostras foram coletadas, mantidas em temperatura refrigerada de 4°C e analisadas em contador hematológico automatizado, imediatamente 24 horas, 48 horas e 72 horas após a coleta. Neste estudo, os parâmetros de hematócrito, VCM, HCM, CHCM e contagem de reticulócitos mantiveram-se estáveis por todo o período de 72 horas.⁽²⁾

Em trabalho realizado no Brasil, os autores avaliaram a estabilidade do hemograma em temperatura ambiente e refrigerada por até 72 horas, após a coleta, e chegaram à conclusão de que alterações significativas, especialmente, nos índices hematimétricos, ocorreram tanto quando as amostras foram estocadas em temperatura ambiente quanto em temperatura refrigerada e que os resultados foram satisfatórios quando analisados entre 12 e 24 horas após a coleta.⁽³⁾

Os resultados observados neste trabalho corroboram apenas em parte com os dados publicados por Delanhol et al. Nesse estudo, os índices hematimétricos mantiveram-se

estáveis por até 48 horas, após a coleta, estando o sangue sob armazenamento em temperatura refrigerada.

A série vermelha foi a que mais sofreu interferência pelo tempo e temperatura de armazenamento. O aumento de VCM e do hematócrito e diminuição de CHCM foram marcantes quando a amostra foi mantida em temperatura ambiente. Uma explicação para o aumento do volume das hemácias pode ser a depleção de ATP com consequente diminuição da atividade da bomba de sódio e potássio, com acúmulo de sódio no interior das hemácias, e, por fim, maior influxo de água e edema celular. A baixa temperatura diminui o metabolismo das hemácias, preservando o ATP e prevenindo o edema e aumento do VCM.

Importa ressaltar que o VCM é um parâmetro utilizado para esclarecer a causa da anemia, sendo que seu valor eleva-se em casos de anemia causada por deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico e diminui em casos de anemia por deficiência de ferro, ou seja, uma interpretação errônea deste parâmetro induzida por um interferente pré-analítico pode retardar a identificação da causa da anemia e, consequentemente, seu correto tratamento.

Neste estudo, foi avaliada a morfologia das hemácias nas duas condições de armazenamento e a única alteração que ocorreu nas hemácias mantidas em temperatura refrigerada, por até 48 horas, foi a presença de hemácias crenadas, enquanto que, nas hemácias mantidas em temperatura ambiente, houve desenvolvimento de macrocitose e intensa poiquilocitose com presença de hemácias crenadas.

Quando foram avaliados os leucócitos, os resultados observados são semelhantes ao estudo prévio de Dalanhol et al.,⁽³⁾ isto é, não houve alteração significativa na contagem global nem diferencial de leucócitos nas condições estudadas.

A análise morfológica dos leucócitos demonstrou a presença de picnose, especialmente em neutrófilos, em ambas as temperaturas de armazenamento. Este tipo de leucócito é justamente o que sobrevive menos tempo na circulação sanguínea *in vivo*⁽⁴⁾ e é de se esperar que *in vitro* esta célula sofra maior alteração morfológica com o passar do tempo.

A contagem de plaquetas sofreu uma pequena diminuição quando as amostras foram mantidas em temperatura refrigerada, por 48 horas, porém, sem significância estatística ou clínica.

Este estudo foi realizado em amostras de sangue de indivíduos saudáveis, porém, é possível que, em algumas situações clínicas, como a esferocitose hereditária e as anemias hemolíticas autoimunes, as alterações observadas nas hemácias possam, em tese, ser encontradas mesmo em amostras mantidas sob refrigeração.

A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que a interferência do tempo e da temperatura de armazenamento é maior sobre os parâmetros da série vermelha, especialmente quando o material é armazenado em temperatura ambiente e, praticamente, ausente sobre os leucócitos e plaquetas. É recomendável, entretanto, que as extensões sanguíneas sejam preparadas logo após a coleta, espe-

cialmente nos casos das amostras analisadas após algumas horas ou depois da coleta, para garantir a integridade morfológica, particularmente, dos neutrófilos. Estas interferências devem ser levadas em consideração, inclusive, quando for necessário repetir uma contagem hematológica automatizada, com a finalidade de se confirmar o primeiro resultado em uma amostra que foi estocada em temperatura ambiente por algumas horas.

Desse modo, pode-se inferir, por fim, que o transporte e a estocagem das amostras em temperatura ambiente, por 24 horas, já cause alterações importantes no eritograma, não devendo ser utilizada pelos laboratórios clínicos sob pena de resultados inexatos e imprecisos. Além disso, as amostras de sangue venoso coletadas com anticoagulante EDTA tripotássico mantêm a estabilidade do material, por 48 horas após a coleta, desde que mantidas em temperatura refrigerada.

Abstract

The objective of this study is to measure the effect of time and temperature of storage over the quality of complete blood count since this is one of the most required laboratory tests and because the model used by many laboratories nowadays consist in collecting the samples in places distant from where the samples will be analysed. Blood samples were collected from 15 subjects and analysed immediately, 24 and 48 hours after the collection. One aliquot of the material was kept at room temperature and another at refrigerated temperature. The complete blood count was performed in the Sysmex XE 2100 equipment. The main parameter altered by time and temperature of storage was MCV, which suffered statistically ($P<0,001$) and clinically significant increase when the sample were stored at room temperature for 24 hours (11,4%) and 48 hours (14,8%). The samples stored at refrigerated temperature did not show significant interference in none of the parameters of the blood count. Morphological analysis showed macrocytosis in the red cells stored at room temperature e discrete poikilocytosis in the samples stored at refrigerated temperature. These results suggests that the blood samples may be considered stable up to 48 hours, since stored under refrigerated temperature.

Keywords

Hemogram; Stability; Pre-analytical interfering

REFERÊNCIAS

1. Robinson, N.; Mangin, P.; Saugy, M. Time and temperature dependant changes in red blood cell analytes used for testing recombinant erythropoietin abuse in sports. Clin Lab. 2004;50(5-6):317-23.
2. Robinson, N. et al. Stability and robustness of blood variables in an antidoping context. Int J Lab Hematol. 2011;33(2):146-53, Apr.
3. Dalanhol, M. et al. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. Rev. Bras. Hematol. e Hemoter. 2010;32(1):16-22.
4. Azevedo M.R.A. Hematologia Básica: fisiopatologia e estudo laboratorial. 4. ed. São Paulo, Luana, 2008, 480p.

Correspondência

Leonardo Sokolnik de Oliveira

Universidade de Santo Amaro

Av. Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 Jardim das Imbuías,

São Paulo, SP

CNPQ - Bolsa de Iniciação Científica PIBIC

Erros pré-analíticos em medicina laboratorial: uma avaliação preliminar em diferentes laboratórios de análises clínicas

Pre-analytical errors in laboratory medicine: a preliminary evaluation in different clinical laboratories

Gabriel Moraes Faria¹

Renata Louzada Pereira²

Patrick Menezes Lourenço³

Resumo

Objetivo: Este trabalho teve como objetivo avaliar os conhecimentos sobre erros pré-analíticos em medicina laboratorial de profissionais que atuam nesta área. **Métodos:** O presente estudo foi realizado por meio de um questionário para avaliar a ocorrência de erros laboratoriais pré-analíticos em dez laboratórios de análises clínicas privados e de pequeno porte nas zonas norte, sul e oeste da cidade do Rio de Janeiro. **Resultados:** A média de idade dos entrevistados foi de 35-55 anos, que trabalham como flebotomistas, técnicos de laboratório e analistas com formação superior. Duas das nove perguntas do questionário de erros pré-analíticos apresentaram um elevado índice de respostas incorretas, a primeira relacionada ao tempo máximo de aplicação do torniquete/garrote e a segunda sobre as fases da etapa pré-analítica, ambas com 74% de respostas incorretas. A pergunta que apresentou um percentual de 100% de acertos estava relacionada à hemólise como causa de erros pré-analíticos. **Conclusão:** A melhoria da fase pré-analítica permanece um desafio para muitos laboratórios clínicos, visto que todos os laboratórios avaliados apresentaram elevada frequência de procedimentos incorretos. É provável que este fato ocorra pela dificuldade dos laboratórios em relatar e registrar os erros provenientes da fase pré-analítica, bem como pelo despreparo dos profissionais envolvidos. Portanto, é de extrema importância a implantação de um programa para capacitação dos profissionais, a fim de minimizar a ocorrência de tais erros.

Palavras-chave

Ciência de Laboratório Médico; Erros de diagnóstico; Técnicas de Laboratório Clínico

INTRODUÇÃO

O laboratório de análises clínicas tem como principal objetivo garantir resultados exatos, precisos e confiáveis,⁽¹⁾ a fim de contribuir para a correta tomada de decisões clínicas em relação à conduta terapêutica dos doentes.⁽²⁾

As etapas de execução de um exame são divididas, classicamente, em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica.^(3,4) A fase pré-analítica inclui a indicação do exame, redação da solicitação, transmissão de eventuais instruções de preparo do paciente, avaliação do atendimento às condições prévias, procedimentos de coleta, acondicionamento, preservação e transporte da amostra biológica até o momento em que o exame seja realizado, ou seja, a fase pré-analítica engloba todas as atividades que precedem o ensaio laboratorial, dentro ou fora do laboratório de análises clínicas.^(5,6)

As variáveis pré-analíticas são agrupadas em três categorias: variáveis fisiológicas, variáveis de coleta de espécime e fatores de interferência. Cada etapa contempla a possibilidade de erros que afetam a qualidade e a confiabilidade do resultado.⁽⁷⁾

Atualmente, tem-se utilizado os termos fase pré-pré-analítica e fase pós-pós-analítica para definir as etapas de execução de um exame que não dependem propriamente do laboratório. A pré-pré-analítica está relacionada à seleção, pelo clínico, de exames apropriados ao diagnóstico a que se pretende e a solicitação dos mesmos. Coleta, transporte e recepção das amostras adequadas ao exame, quando não são de responsabilidade do laboratório, também podem estar incluídos nessa fase. A pós-pós-analítica refere-se à interpretação do resultado pelo clínico.⁽⁸⁾

Vários autores consideram que a evolução tecnológica dos instrumentos e reagentes proporcionou maior

¹Especialista em Análises Clínicas. Professor convidado Curso Preparatório) – CAPBio, Centro de Aperfeiçoamento Profissional

²Especialista em Garantia da Qualidade. GlaxoSmithKline – GSK.

³Mestre em Medicina Laboratorial. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – Unirio – Rio de Janeiro, RJ

Instituição: Centro de Aperfeiçoamento Profissional Biomédico – CAPBIO.

Artigo recebido em 04/12/2014

Artigo aprovado em 25/08/2015

segurança à fase analítica e que a maioria dos erros laboratoriais são, de fato, originados na fase pré-analítica.⁽⁹⁻¹²⁾ Mesmo em laboratórios com avançado controle de qualidade, a fase pré-analítica é a mais vulnerável, contando com quase 90% dos erros.⁽⁷⁾ Lima-Oliveira et al.⁽⁶⁾ corroboram também com a ideia de que a fase pré-analítica é a principal responsável pelos erros atribuídos ao laboratório.

Estima-se que cerca de 60% a 70% das decisões médicas mais importantes são baseadas nos resultados laboratoriais.⁽¹³⁾ Dessa forma, os erros diagnósticos ameaçam a segurança dos pacientes, comprometendo o tratamento, o que pode causar um agravamento do quadro clínico. Além disso, problemas na esfera judiciária também podem ocorrer. Uma grande parte das reivindicações judiciais, por exemplo, é devida a erros da fase pré-analítica. Em função disso, a qualidade no laboratório é fundamental para minimizar esses erros, pois leva a uma maior eficácia tanto para o médico quanto para o paciente.⁽²⁾

A fase pré-analítica se desenvolve pela sequência de ações de um elevado número de pessoas com diferentes graus de formação profissional, interesses e responsabilidades. Ao médico solicitante do exame e seus auxiliares diretos interessa a obtenção de um resultado laboratorial correto e célere; ao flebotomista interessa o cumprimento dos requisitos técnicos da coleta, evitando os riscos biológicos potenciais envolvidos; às pessoas encarregadas pelo acondicionamento preservação e transporte da amostra, interessam os cuidados para com a segurança e integridade do material, ambiente e delas próprias e, ao paciente, interessa o possível desconforto do preparo e da coleta da amostra.^(14,15)

Os fatores pré-analíticos são difíceis de monitorar porque grande parte deles pode ocorrer fora do controle do laboratório, o que afeta, diretamente seus resultados. No caso de uma amostra de urina, por exemplo, é difícil prever e conscientizar o paciente quanto ao modo de coletar, armazenar e transportar as amostras de maneira adequada, bem como de seguir dietas e evitar esforços físicos.^(6,16) Um outro exemplo de erros potenciais no diagnóstico é a hemólise. Este é um problema gerado na fase pré-analítica e que interfere, de maneira importante, nos testes laboratoriais.⁽¹⁷⁾ Segundo Henry,⁽¹⁶⁾ a lise dos eritrócitos pode alterar os resultados de constituintes séricos como lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico-oxalacética, potássio, alanina aminotransferase, glicose, fosfato inorgânico, sódio e cálcio. A homogeneização vigorosa do sangue nos tubos, o álcool residual remanescente da limpeza da pele, a exposição prolongada dos tubos ao calor e frio extremos e a remoção inadequada dos eritrócitos durante a centrifugação podem causar hemólise e alterar as leituras espectrofotométricas.

Com a finalidade de diminuir o risco no processo de diagnóstico, a ANVISA,⁽¹⁸⁾ publicou a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 302, em 2005, onde foram estabelecidos os requisitos mínimos para o funcionamento de um laboratório clínico que visam implantar um sistema de gestão dos

serviços, para oferecer aos clientes um produto com qualidade analítica, cujos procedimentos e processos são validados e controlados.⁽¹⁹⁾

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar, preliminarmente, o conhecimento sobre erros pré-analíticos em medicina laboratorial de profissionais que atuam em laboratórios de análises clínicas da cidade do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODO

No desenvolvimento do presente trabalho foi realizada uma pesquisa com 23 profissionais de 10 laboratórios de análises clínicas de pequeno porte nas zonas norte, sul e oeste da cidade do Rio de Janeiro. Utilizou-se um questionário com três questões gerais (idade, formação acadêmica e atividade), uma questão objetiva e cinco questões assertivas sobre erros pré-analíticos, boas práticas de laboratório e controle de qualidade com as opções concordo, sem interferência e discordo.

Foi considerado critério de inclusão os laboratórios estritamente da rede privada com até sete funcionários e que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram definidas como critério de exclusão as instituições que não concordaram em assinar o TCLE.

Além das entrevistas, este estudo compreendeu uma pequena análise da literatura acerca de alterações de exames laboratoriais que ocorrem na fase pré-analítica.

Os resultados do questionário foram avaliados através do uso do programa Microsoft Office Excel®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 10 laboratórios de análises clínicas anonimizados, onde foi aplicado um questionário sobre erros pré-analíticos em 23 profissionais de diferentes níveis de formação. A Tabela 1 resume as características gerais sobre o perfil da população de estudo. Tratou-se de um grupo com faixa etária entre de 35 a 55 anos, sendo constituída por flebotomistas, técnicos e analistas com formação superior em biologia, biomedicina e farmácia.

De acordo com o Gráfico 1, que versa sobre processos pré-analíticos em laboratórios de análises clínicas, o

Tabela 1 - Perfil dos entrevistados

Características	Nº	%
Faixa etária		
18-30	6	26,1
31-45	9	39,1
46-60	8	34,8
Atividade profissional		
Flebotomista	4	17,4
Técnico	9	39,1
Analista superior*	10	43,5
Total	23	100

*Formação acadêmica: biólogo (6); biomédico (2); farmacêutico (2)

entrevistado deveria assinalar a alternativa não diretamente relacionadas a problemas de fase pré-analítica (controle externo da qualidade). Dezenove pessoas (86%) responderam de forma correta e 3 (14%) marcaram a segunda alternativa (solicitação médica não legível). Apenas um participante não respondeu a pergunta. Com base em outros estudos,⁽⁷⁾ as variáveis pré-analíticas são agrupadas em três categorias, qual sejam, variáveis fisiológicas, variáveis de coleta de espécime e fatores de interferência.

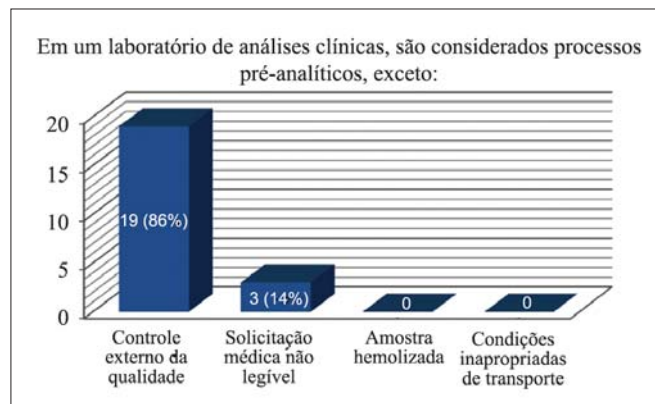


Gráfico 1. Conhecimento sobre processos pré-analíticos.

A Tabela 2, apresenta uma sequência de cinco perguntas sobre erros pré-analíticos. A primeira discorre sobre a ordem correta dos tubos de coleta sanguínea, segundo as recomendações técnicas. Os profissionais foram questionados se a ordem apresentada estava correta e 12 pessoas (52%) responderam acertadamente que sim, 10 (43%) discordaram da sequência e apenas uma pessoa (5%) respondeu que não havia interferência nos resultados laboratoriais. É consenso⁽²⁰⁾ que a sequência de utilização dos diferentes tipos de tubos de coleta em sistema a vácuo é uma potencial fonte de erro pré-analítico.

A segunda pergunta referia-se ao tempo de aplicação do torniquete/garrote. O questionamento abordado era se o tempo deveria ser de no máximo três minutos. A pergunta mostrou um índice elevado de respostas incorretas. Dezesete participantes (74%) concordaram com o tempo apre-

sentado erroneamente (este tempo deve ser de no máximo 60 segundos), 5 profissionais (21%) discordaram e apenas uma pessoa (5%) afirmou que o tempo de garrotamento não influi nos resultados analíticos. Segundo Ernst e Ernst,⁽²¹⁾ para que a aplicação do torniquete não interfira nas determinações analíticas, este deve ser retirado no momento em que à agulha é introduzida no acesso venoso.

A terceira questão da Tabela 2 estava relacionada à hemólise provocada pela fricção no braço do paciente, para se obter estase venosa. De acordo com o questionário, 10 entrevistados (43%) concordaram de forma correta com a pergunta, 8 profissionais (35%) discordaram e 5 pessoas (22%) responderam que a fricção no braço do paciente não influência nos resultados laboratoriais. Segundo vários estudos,^(20,22,23) esse procedimento altera a qualidade da amostra que será analisada.

A quarta pergunta descrevia o número de homogeneização dos tubos de sangue, conforme especificação técnica,⁽²²⁾ que preconiza 6 a 8 vezes. Segundo a presente pesquisa, 12 participantes (55%) concordaram corretamente com a pergunta, 9 pessoas (45%) discordaram e apenas uma pessoa não respondeu a pergunta, alegando que somente os tubos de hemograma, citrato de sódio e fluoreto devem ser homogeneizados, não incluindo o tubo de heparina, que, de fato, também deve ser homogeneizado. Em outro trabalho realizado,⁽⁹⁾ evidenciou-se que a forma de homogeneização dos tubos afeta a qualidade final da amostra, portanto, todos os tubos devem ser homogeneizados, inclusive os sem aditivos.

A quinta e última pergunta da Tabela 2 abordou um assunto pouco conhecido, que é a fase pré-pré-analítica. De acordo com Peblani,⁽⁸⁾ essa fase se dá no momento em que o clínico ainda está selecionando os exames a serem solicitados. De forma correta, 15 profissionais (65%) concordaram com a questão e 8 pessoas (35%) discordaram da pergunta.

O Gráfico 2 exemplifica de maneira objetiva que os 23 profissionais (100%) entrevistados sabem que a hemólise pode ser causada em decorrência de erros na fase pré-analítica. Segundo as recomendações técnicas,⁽²⁴⁾ a forma inadequada de coleta pode gerar erro no diagnóstico, como hemólise, que tanto pode elevar o nível de potássio quanto alterar a dosagem de cálcio, dentre outros parâmetros.

Tabela 2 - Questionário sobre erros pré-analíticos

	Concordo	Sem interferência	Discordo
Segundo as recomendações da SBPC, a ordem correta para a coleta de sangue em tubos de plásticos e frascos de hemocultura por sistema a vácuo é a seguinte: frasco de hemocultura, tubo citrato de sódio, tubo para soro com ou sem gel reparador, tubo EDTA	10 (43%)	1 (5%)	12 (52%)
O tempo de aplicação do torniquete/garrote deve ser de no máximo 3 minutos?	17 (74%)	1 (5%)	5 (21%)
Quando o flebotomista fricciona o braço do paciente para provocar estase venosa, pode ocorrer hemólise?	10 (43%)	5 (22%)	8 (35%)
Segundo a NCCLS deve-se homogeneizar de 6 a 8 vezes os tubos de sangue colhidos?	12 (55%)	-	10 (45%)
É correto afirmar que a fase pré-pré-analítica é o momento em que o clínico está selecionando os exames a serem feitos?	15 (65%)	-	8 (35%)

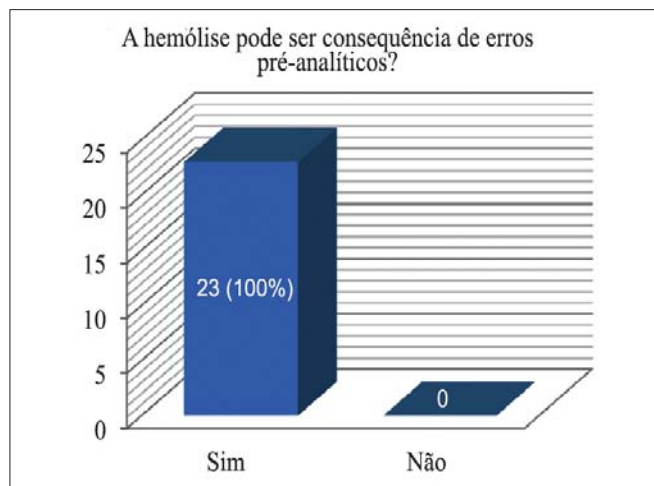


Gráfico 2. Relação da hemólise com erros pré-analíticos.

De acordo com o Gráfico 3, pode-se observar que 17 (74%) dos 23 entrevistados afirmaram que a coleta, o acondicionamento da amostra, transporte e a análise da amostra fazem parte da etapa pré-analítica e apenas 6 pessoas (26%) negaram corretamente a assertiva, pois a análise da amostra faz parte da etapa analítica. De fato, a fase pré-analítica inclui a indicação do exame, redação da solicitação, transmissão de eventuais instruções de preparo do paciente, avaliação do atendimento às condições prévias, procedimentos de coleta, acondicionamento, preservação e transporte da amostra biológica até o momento em que o exame seja, efetivamente, realizado.⁽⁵⁾

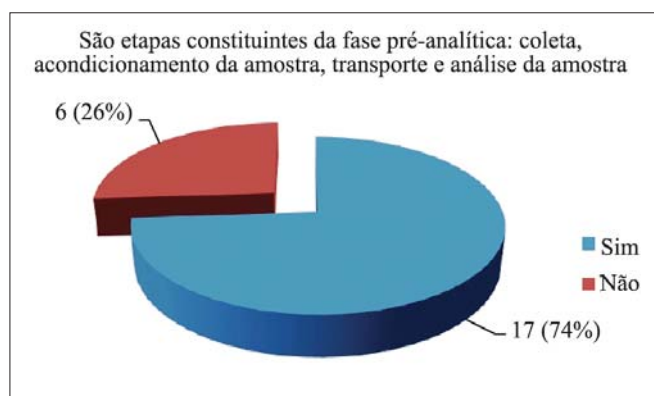


Gráfico 3. Sobre as etapas da fase pré-analítica.

O Gráfico 4 demonstra o índice de profissionais que foram submetidos a treinamento de coleta sanguínea, nos últimos 6 meses. Apenas 7 (30%) dos 23 entrevistados afirmaram que sofreram treinamento e 16 (70%) informaram que não fizeram nenhum tipo de capacitação recente. Para evitar erros e fontes de variação na fase pré-analítica, é necessário que o treinamento dos profissionais envolvidos na coleta de amostras seja constante.⁽²⁵⁾



Gráfico 4. Participação em treinamento de coleta sanguínea

Em consenso com outros estudos,^(12,26) a participação de médicos na correta orientação dos pacientes parece ser fator crítico para a diminuição dos erros pré-analíticos. Conforme Bonini P. et al.,⁽²⁷⁾ as avaliações clínicas devem ser utilizadas para a detecção de erros causados por problemas organizacionais externos ao laboratório clínico e que, muitas vezes, está ligado ao paciente que não é adequadamente orientado desde a consulta médica.

Atualmente, o objetivo mais importante da medicina diagnóstica é garantir a médicos e pacientes um atendimento eficiente e seguro, fornecendo laudos, sejam eles laboratoriais ou de imagem, com resultados rápidos e confiáveis para adequada tomada de decisão clínicas.^(26,27)

CONCLUSÃO

Pelo presente estudo, é possível concluir, preliminarmente, que é fundamental a implantação de programas de capacitação e treinamento profissional e de uma metodologia mais eficaz de detecção, classificação e controle de erros pré-analíticos nos laboratórios clínicos, para a melhoria dos serviços que oferecem. Importa reiterar, ainda, que o laboratório deve ter instruções por escrito para cada teste e que descrevam o tipo de amostra, o procedimento de coleta de amostra e o dispositivo apropriado para a coleta.

Agradecimentos

A todos os laboratórios e profissionais pela colaboração na realização da pesquisa e ao Setor de Hematologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro pelo suporte na realização do trabalho.

Abstract

Objective: This paper has aimed to evaluate the knowledge about pre-analytical errors in Laboratory Medicine of professionals working in this area. **Methods:** This study has been performed throughout a questionnaire to evaluate the occurrence of pre-analytical laboratory errors from ten private and small clinical laboratories located in the northern, southern and western city of Rio de Janeiro. **Results:** The mean age of interviewees was between 35-55 years of age who have been working as phlebotomists, laboratory technicians

and analysts with higher university degree. Two from the nine pre-analytical errors questions from the questionnaire showed a high rate of incorrect answers, the first related to the maximum time of application of tourniquet/withers and the second one about the stages of pre-analytical phase, both with 74% of the professionals answering incorrectly. The question which got 100% of correct answers was about hemolysis as a cause of pre-analytical errors.

Conclusion: The improvement of pre-analytical phase remains a challenge for many clinical laboratories, as all the laboratories which have been scrutinized showed high frequency of incorrect procedures. It is likely that this fact occurs due to the difficulty of laboratories to report, record errors from the pre-analytical phase and also the lack of knowledge of the professionals involved. Therefore, it is extremely important the implement of a program for training those professionals in order to minimize the occurrence of such errors of the process.

Keywords

Diagnostic errors; Clinical Laboratory Techniques; Medical Laboratory Science

REFERÊNCIAS

- Colombeli ASS. Avaliação do potencial de interferência analítica de fármacos na análise química do exame de urina. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Florianópolis 2006; Universidade Federal de Santa Catarina.
- Guimarães AC, Wolfart M, Brisolara MLL, Dani C. O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. Rev HCPA 2011;31(1):66-72.
- Mendes ME, Gartner MT, Sumita NM, Sánchez PB. Gestão por processos no laboratório clínico: Uma abordagem prática. São Paulo 2006; EPR.
- Westgarg JO, Darcy T. The truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory tests. Clin Chim Acta 2004; 346(1):3-11.
- Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. Samples: From the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 2.ed. Darmstadt 2001; GIT Verlag GmbH.
- Lima-Oliveira G, Barcelos LF, Correia JA, Guimaraes JC, Neufeld PM, Grinberg I. Quality management in pre analytical phase part I: critical analyze of CLSI H3-A6. RBAC 2011;43(2):83-6.
- Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. Clin Chem. 2007;53(7):1338-42.
- Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. Clin Chim Acta. 2009;404(1):16-23.
- Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. Clin Chem Lab Med 2006;44(4):358-65.
- Wallin O, Soderberg J, Van Guelpen B, Stenlund H, Grankvist K, Brulin C. Pré analytical venous blood sampling practices demand improvement: a survey of test-request management, test tube labeling and information search procedures. Clin Chim Acta. 2008;391(1-2):91-7.
- Plebani M. Closing the brain-to-brain loop in laboratory testing. Clin Chem Lab Med. 2011;49(7):1131-3.
- Shcolnik W, Carvalho SMN. Erros laboratoriais e segurança dos pacientes: Revisão sistemática. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Rio de Janeiro 2012; Fundação Oswaldo Cruz.
- Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, Ottomano C, Pansini N, Bonini P. Laboratory network of excellence: Enhancing patient safety and service effectiveness. Clin Chem Lab Med. 2006;44(2): 150-6.
- Hollensead SC, Lockwood WB, Elin RJ. Errors in pathology and laboratory medicine: consequences and prevention. J Surg Oncol 2004;88(3):161-81.
- Gabriel Jr, AG, Silva AAB, De Martino MC, Razvickas WJ, Silva RC, Viana AM, Maurício RC, Santos SAL, Tufik S. Validação do sistema de transporte e das dosagens de amostras biológicas enviadas para a central de um laboratório de grande porte. J Bras Patol Med Lab 2007;43(4):235-40.
- Henry JB. Diagnósticos clínicos por métodos laboratoriais. 20. ed. São Paulo 2008; Manole.
- Roth E. Como implantar a qualidade em laboratório clínico: o caminho das pedras. Rio de Janeiro 1998; Hunsdale Consultorias e Treinamento Ltda.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 302, de 13 de outubro de 2005 (RDC 302:2005). Brasília 2005; Anvisa.
- Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Manual do laboratório participante - PNCQ. Rio de Janeiro: SBAC, 2000.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS - H03-A5 - Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved standard. 5. ed., 2003.
- Ernst, D.J.; Ernst, T. Phebotomy tools of the trade Home Health Nurse, v.20, p.151-153, 2002.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS - H1-A5 - Tubes and additives for venous blood specimen collection. Approved standard. 5. ed., 2003
- Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2009.
- Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Manual do laboratório participante - PNCQ. Rio de Janeiro: SBAC, 2012.
- Young, DS. Conveying the importance of the preanalytical phase. Clin Chem Lab Med. 2003;41:884-7.
- Menezes PL. Erros Pré-Analíticos em Medicina Laboratorial: uma revisão sistemática- Dissertação (Mestrado profissional em Saúde.Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense);Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ,2013.
- Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. Clin Chem 2002;48(5):691-8.

Correspondência

Gabriel Moraes Faria

Av. Santa Cruz, 1678, sala 204 – Realengo
21715-321 – Rio de Janeiro, RJ

Avaliação do desempenho do plasma humano em relação ao plasma de coelho no teste da coagulase livre

Performance evaluation of the human plasma in relation to the rabbit plasma in the test of free coagulase

Milena Carla Espósito¹

Danielle Aparecida Ferreira de Oliveira²

Duílio Santos Quinteiro³

Joice Vieira Romão⁴

Resumo

Objetivo: Esse estudo visa comparar o desempenho do plasma humano com o plasma de coelho padronizado na técnica da coagulase livre para diagnóstico de *Staphylococcus aureus*, verificando a viabilidade da substituição. **Métodos:** Foi realizada a comparação do desempenho de ambos os plasmas colhidos com EDTA, através da prova da coagulase livre em tubo, utilizando 34 isolados de *Staphylococcus aureus*. **Resultados:** Dos 34 isolados de *Staphylococcus aureus* de amostras clínicas, todos (100%) coagularam o plasma de coelho e o plasma humano com heparina e 15 (44%) coagularam o plasma humano com EDTA. **Conclusão:** Visto que o uso do plasma de coelho é o reagente padronizado para realização da prova da coagulase livre em tubo, na identificação de *Staphylococcus aureus*, os resultados obtidos indicam a possibilidade de substituição do plasma de coelho comercialmente disponível por plasma humano colhido com heparina, diminuindo os custos com esse procedimento laboratorial.

Palavras-chave

Staphylococcus aureus; Coagulase; Plasma

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de infecções estafilocócicas é feito pelo isolamento e caracterização do microrganismo. O isolamento é realizado em meios de cultura de uso comum, como, por exemplo, o agar-sangue, e por meios seletivos, como o agar manitol salgado. A caracterização da espécie pode ser feita através de testes bioquímicos, como o da catalase e coagulase livre, entre outros, que, em regiões com recursos limitados, pode ser inviável.⁽¹⁻³⁾

Na rotina do exame microbiológico para identificação bacteriana, o teste de produção de coagulase livre em tubo é empregado para classificar os *Staphylococcus* sp. em dois grupos: os coagulase-positivos e os coagulase-negativos. Historicamente, tem sido considerada como *Staphylococcus aureus* a bactéria que apresenta hemólise incompleta em agar sangue e resultado positivo no teste da coagulase em tubo, após quatro horas de incubação, em banho-maria a 37° C. O teste é considerado positivo também com 18 a 24 horas de incubação, nas mesmas condições.^(4,5)

A coagulase é uma proteína com atividade enzimática similar à protrombina, capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de um coágulo visível, em sistemas adequados.⁽⁴⁾

A coagulase está presente nos *S. aureus* em duas formas: coagulase ligada ou "clumping factor" e coagulase livre. Enquanto a coagulase livre coagula amostras de plasma tendo como substrato o fibrinogênio ou os monômeros de fibrina, a coagulase ligada causa acúmulo dos próprios microrganismos, semelhante a uma aglutinação.^(1,5)

A prova da coagulase em tubo ainda é o procedimento de referência para a identificação de *S. aureus*, que é, sem dúvida, o patógeno mais importante entre os estafilococos. O meio recomendado para o procedimento do teste da coagulase é o plasma de coelho, entretanto, esse é um reagente com custo relativamente alto e cuja obtenção tem apresentado certas dificuldades, tanto pela técnica como pelo grande número de animais necessários em biotério.⁽⁴⁾ A utilização de plasma de outros animais já foi relatada como alternativa à utilização de plasma de coelho.^(6,7)

¹Farmacêutica. Mestre em Ciências Biológicas. UNIFAL, MG.

²Farmacêutica. Especialista em Farmacologia. UNIFAL, MG.

³Biomédico graduado pela UNIFENAS, MG.

⁴Médica graduada pela Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – SUPREMA – Juiz de Fora, MG

Instituição: Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, MG.

Artigo recebido em 19/06/2013

Artigo aprovado em 23/03/2015

Estudos anteriores têm demonstrado variações na coagulabilidade de diferentes plasmas para *S. aureus* isolados de diversos hospedeiros. Esta variabilidade pode ser intrínseca ao plasma ou devido à presença de biótipos de *S. aureus* que, preferencialmente, coagulam determinados plasmas.⁽¹⁾

Não há padronização da técnica do teste da coagulase livre utilizando plasma humano, provavelmente pela utilização de anticoagulantes que podem interferir no crescimento bacteriano.⁽⁸⁾

Os anticoagulantes utilizados rotineiramente para obtenção de plasma humano em laboratório clínico são o citrato de sódio, EDTA, fluoreto de sódio e heparina.⁽⁹⁾

O plasma citratado não deve ser utilizado, pois os microrganismos capazes de metabolizar o citrato (por exemplo, espécies de enterococos) poderão originar resultados falso-positivos, se forem confundidos, inadvertidamente, com estafilococos. Esse erro pode ser evitado se for realizada, primeiramente, a prova da catalase.⁽⁴⁾

Tendo em vista os inconvenientes, como obtenção e custo do uso do plasma de coelho, para diagnóstico laboratorial, esse estudo visa comparar o desempenho do plasma humano com o plasma de coelho padronizado na técnica da coagulase livre, para diagnóstico de *S. aureus*, verificando a viabilidade da substituição.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do teste da coagulase, foram utilizados 34 isolados de amostras clínicas de *S. aureus*, previamente identificados em laboratórios de análises clínicas, plasma de coelho comercialmente disponível e pool de plasma humano colhido com heparina e com EDTA, de voluntários que estivessem em jejum de no mínimo 8 horas, obedecendo às normas e técnicas de biossegurança.

Foram utilizados 0,5 mg de heparina e de EDTA por mL de sangue colhido. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1500 rpm, durante 15 minutos. Retirou-se o plasma em seguida e armazenou-se sob refrigeração, por no máximo 48 horas.

Todas as cepas de *S. aureus* utilizadas foram inoculadas em agar tríptico-soja e incubadas em estufa a 35-37°C, por 24 horas. Colônias isoladas no agar tríptico-soja foram colhidas e inoculadas em caldo BHI (*Brain and Heart Infusion*) e incubadas, por 24 horas, em estufa a 35-37°C. Após o período de incubação, todas as amostras produziram turvação no meio de cultura. De cada amostra em caldo BHI, foi retirado 0,5 mL e inoculado em tubos de Kahn estéreis, contendo, separadamente, 0,5 mL de plasma de coelho, 0,5 mL de plasma humano colhido com heparina e 0,5 mL de plasma humano colhido com EDTA. Incubou-se em banho-maria a 35°C, durante 4 horas, observando-se a presença ou ausência de coágulo de 30 em 30 minutos. Não sendo observado coágulo, em 4 horas, incubou-se por mais 20 horas, efetuando-se nova leitura ao final desse período.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste G no software Bioestat.

RESULTADOS

Conforme mostra a Figura 1, dos 34 isolados de *S. aureus* analisados, todos (100%) coagularam o plasma de coelho comercialmente disponível e o plasma humano heparinizado. Apenas 15 (44%) amostras coagularam o plasma humano com EDTA.

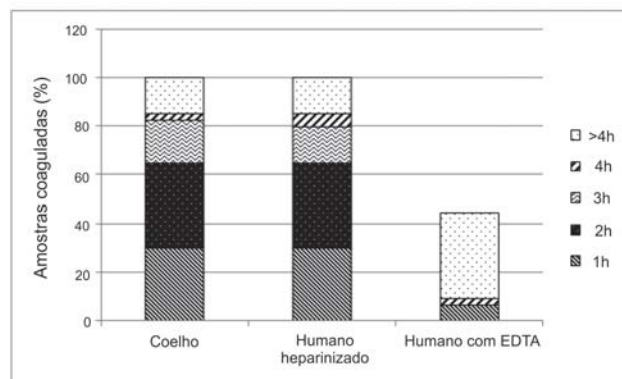


Figura 1. Prova de coagulase livre: comparação dos resultados positivos para este teste com diferentes tipos de plasma, mostrando o tempo (h) necessário para ocorrer a coagulação

O tempo de incubação para obtenção da coagulação, em plasma de coelho, foi: para 10 (29,5%) amostras de *S. aureus*, de 1 hora, para 12 (35%) amostras, de 2 horas, para 6 (17,5%) amostras, de 3 horas, para 1 (3%) amostra, de 4 horas, e para 5 (15%) amostras, de mais de 4 horas.

Nas amostras inoculadas em plasma humano heparinizado, 10 (29,5%) amostras coagularam em 1 hora de incubação, 12 (35%) coagularam em 2 horas, 5 (15%) coagularam em 3 horas, 2 (5,5%) em 4 horas e 5 (15%) após 4 horas.

Nas amostras de plasma humano com EDTA, 2 (5,9%) das amostras coagularam em 1 hora de incubação, 1 (2,9%) coagulou em 4 horas, 12 (35,3%) após 4 horas e 19 (55,9%) não coagularam.

DISCUSSÃO

A análise dos 34 isolados clínicos de *S. aureus* mostrou que 100% das cepas foram positivas no teste da coagulase livre, usando plasma de coelho e plasma humano heparinizado, sendo considerados, portanto, igualmente eficazes e confiáveis para a execução desse teste.

Esses resultados estão de acordo com Silva et al.,⁽⁷⁾ que compararam o desempenho do plasma de coelho com plasma humano e plasma de cavalo, na prova da coagulase, utilizando uma solução de citrato de sódio a 10% como anticoagulante, na proporção de 25%, obtendo como

resultado 100% das amostras coaguladas apenas com o plasma de coelho e humano.

Diferentemente do presente trabalho, Martinez et al.⁽⁵⁾ avaliaram a capacidade de amostras de *S. aureus* coagular plasmas de algumas espécies de animais, coletados em frascos contendo citrato de sódio a 2%, na proporção de 1:5, encontrando que, das 53 amostras coagulase-positivas, 39 (73,58%) foram positivas em plasma humano e apenas 24 (45,28%) em plasma comercial de coelho, cães, caprinos e bovinos.

Rubin et al.⁽³⁾ compararam o desempenho do plasma de coelho e de cães para o teste da coagulase, aplicado em amostras de *S. aureus* isolados de diferentes espécies de animais, relatando que a eficiência dos dois plasmas era a mesma, porém, o tempo para obter a coagulação foi significativamente maior para o plasma de cão, em amostras de *S. aureus* isolados de bovinos.

Kateete et al.⁽¹⁾ compararam o desempenho do plasma de ovelha com o plasma humano, verificando que este último era mais sensível (91%) que o plasma de ovelha (81%) no teste da coagulase em tubo.

Na presente avaliação, 44% das amostras de *S. aureus* coagularam com plasma humano colhido com EDTA, sendo 34% delas com mais de 4 horas de incubação.

O resultado obtido neste estudo permite falar, preliminarmente, a favor da substituição do reagente plasma de coelho comercialmente disponível por plasma humano heparinizado, diminuindo, consideravelmente, os custos com a identificação microbiológica dos *S. aureus*. Além disso, a obtenção do plasma humano é muito mais fácil e prática, eliminando todos os custos dos procedimentos de manutenção de animais em biotério, assim como da própria obtenção do plasma de coelho.

CONCLUSÕES

O desempenho do plasma humano colhido com heparina foi considerado equivalente ao do plasma de coelho no teste da coagulase livre em tubo, para identificação de *S. aureus*, podendo, portanto, ser indicada, a princípio, a substituição do plasma de coelho por plasma humano heparinizado, na realização desse teste, nas condições testadas.

O plasma humano colhido com EDTA não se mostrou confiável para utilização na prova da coagulase livre em tubo em substituição ao plasma de coelho, pois, segundo os resultados obtidos, mostrou-se um reagente que pode produzir resultados falso-negativos, não sendo, portanto, indicado para substituição do plasma de coelho.

Ficou evidente, também, a interferência no tempo de incubação para obtenção da coagulação do plasma pela coagulase, porém, não foram observados resultados falsos-negativos com o plasma humano heparinizado, confirmando a possível substituição; já o plasma humano com EDTA apresentou resultados negativos, justificando a sua não indicação como potencial substituto.

Abstract

Objective: This study aimed to compare the performance of human plasma with standard rabbit plasma free coagulase in the art for diagnosing *Staphylococcus aureus*, checking the viability of the replacement. **Methods:** Was performed to compare the performance of both plasmas with heparin and EDTA by the free coagulase test tube, using 34 isolates of *Staphylococcus aureus*. **Results:** Of the 34 *Staphylococcus aureus* isolates of clinical samples, all of them (100%) coagulated the rabbit plasma and the heparinized human plasma, and 15 (44%) coagulated the human plasma with EDTA. **Conclusion:** Since the use of rabbit plasma is the standard reagent for performing free coagulase test tube in the identification of *Staphylococcus aureus*, the results indicate the possibility of substitution of commercially available rabbit plasma for human plasma collected with heparin, reducing the cost of this laboratory procedure.

Keywords

Staphylococcus aureus; Coagulase; Plasma

REFERÊNCIAS

- Kateete DP, Kimani CN, Katabase FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. In: Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials: 2010 ago.9:23; Reino Unido.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller M. Microbiologia Médica. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
- Rubin JE, Bayly MK, Chirini-Trejo M. Comparison of Dog and Rabbit Plasmas in the Tube Coagulase Test for *Staphylococcus aureus*. J Vet Diagn Invest. 2010; sep.22(5):770-771.
- Junior WW, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Diagnóstico Microbiológico - Texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Martinez TCN, Laborda SS, Anunciação AVM, Almeida MGAA, Rocha CCM, Pinheiro DPM, Figueiredo A. Caracterização de *Staphylococcus* sp isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. Rev Bras Saúde Prod Anim. 2001;1(2):48-53.
- Fundação Calouste Gulbenkian. Manual de inspeção sanitária de carnes: 2000. Lisboa.
- Silva LHC, Monteiro AA, Belot V, Barros MAF, Nero LA, Santana EHW, Moraes LB. Utilização de plasma de cavalo no teste da coagulase em estafilococos isolados de leite cru. Semina: Ciências Agrárias. 2005 Jul/Set;26(3):381-386.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Módulo IV. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
- Burts CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Fundamentos de Química Clínica. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Correspondência

Milena Carla Espósito

Rua Antônio Carlos, 551

37130-000 – Alfenas-MG

E-mail: milena_esposito@hotmail.com

Salmonella sp. em ovos e cloacas de galinhas e seu risco para a saúde pública

Salmonella sp. on eggs and chickens sewers and your risk for public health

Larissa Kluwe dos Santos¹

Juliana Guedes Silveira²

Laura Vicedo Jacociunas³

Resumo

Objetivo: Avaliar a presença de *Salmonella* sp. em ovos e cloacas de galinhas, provenientes de dois sítios no Rio Grande do Sul, sendo um para consumo próprio e o outro para comércio. **Métodos:** A amostra deste estudo foi constituída por 30 galinhas e 17 ovos, sendo 22 galinhas e 10 ovos provenientes de um sítio que as utiliza para consumo próprio, localizado na cidade de Águas Claras, RS e 8 galinhas e 7 ovos oriundos de um sítio que as comercializa, localizado na cidade de Torres, RS. O isolamento da *Salmonella* foi feito em meios agar MacConkey e agar *Salmonella/Shigella* e sua identificação e confirmação foi feita por série bioquímica. **Resultados:** Observou-se a presença de *Salmonella* sp. no sítio para consumo próprio em 13,6% das aves e 80% dos ovos, já no sítio que as comercializa, não houve contaminação tanto nas galinhas quanto nos ovos analisados. **Conclusão:** a *Salmonella* sp. é um agente frequentemente encontrado no ambiente e essas aves são portadoras naturais da bactéria, justificando sua presença no que as utiliza para próprio consumo, e, devido ao uso de antibiótico nas galinhas do sítio comercial, a ausência dela.

Palavras-chave

Galinhas; *Salmonella*; Ovos; Cloaca

INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma infecção alimentar causada por microrganismos do gênero *Salmonella* pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.^(1,2) Estes microrganismos possuem a capacidade de infectar diversas espécies, inclusive o homem, sendo considerada uma das causas mais importantes de toxinfecções alimentares em todo o mundo.^(3,4) Este gênero apresenta mais de 2.500 sorotipos e pertence a duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, que podem ser diferenciadas com base em séries bioquímicas e sorológicas.⁽⁵⁻⁸⁾

As salmonelas são isoladas mundialmente, podendo infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo animais selvagens, domésticos e humanos.^(2,9) No setor avícola, a *Salmonella* está entre as principais bactérias patogênicas de interesse no que se refere à segurança alimentar, seja no tocante ao alimento (ovos *in natura*), seja em relação aos alimentos elaborados para consumo humano, a partir de animais infectados.⁽⁴⁾

Entre os vários sorotipos isolados de aves, *Salmonella Enteritidis* é encontrado constantemente em carcaça de frangos, no Brasil, seguido de *Salmonella Typhimurium*,

Salmonella Heidelberg, *Salmonella Mbandaka*.^(10,11) Cepas de *S. Enteritidis* apresentam a capacidade de colonizar o canal ovopositor de galinhas, podendo gerar contaminação da membrana que envolve a gema, durante a formação do ovo, provocando, assim, casos de infecções relacionadas ao consumo de frangos e alimentos preparados com ovos crus ou insuficientemente cozidos.⁽¹²⁾ Esses sorotipos, comumente, colonizam o trato gastrointestinal de aves, sem causar sintomas, contaminando carcaças e ovos e ocasionando infecções alimentares.⁽²⁾

O ambiente onde são criados os animais, como cama e ninhos, também são fontes de contaminações para aves e ovos.^(13,14) A contaminação direta, igualmente, favorece a transmissão dos microrganismos.⁽¹⁵⁾

A contaminação pela *Salmonella* sp., normalmente, acontece por via oral. Existem também suspeitas de infecção via conjuntivas e pelo trato respiratório superior e membranas mucosas. A doença entérica pode acontecer com a propagação pelo intestino delgado distal e o início do cólon. Um dos fatores que contribuem para a colonização pela *Salmonella* é o desequilíbrio do peristaltismo e da microbiota intestinal.^(16,17)

Quando a bactéria invade o hospedeiro, ela pode se ligar à matriz celular ou diretamente à célula. Depois que o

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Biomedicina, do IPA – Porto Alegre, RS.

²Biomédica, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

³Doutora. Professora Centro Universitário Metodista IPA – Porto Alegre, RS.

Instituição: Centro Universitário Metodista, do IPA – Porto Alegre, RS.

Artigo recebido em 06/07/2013; Artigo aprovado em 17/06/2015

tecido é lesado, a matriz extracelular subjacente é exposta. Posteriormente ao consumo de água e alimento contaminado, a *Salmonella* começa seu ciclo de infecção, disseminando-se pelo hospedeiro, através do tecido linfóide, incluindo, nas aves, placas de Peyer e tonsilas cecais e aderindo, apicalmente, às células M e às células epiteliais do íleo, que, devido à carência de bordas, representam uma porta de entrada ideal para enterobactérias.⁽¹⁷⁻²¹⁾

Segundo Molbak e colaboradores,⁽²²⁾ para cada caso relatado de salmonelose, de 3,8 a 38 pessoas na população adoecem. Nos Estados Unidos, avalia-se que a *Salmonella* sp. seja responsável por 1 milhão de casos de doenças transmitidas por alimento (DTA).⁽²³⁾ De acordo com Aimeya et al.,⁽²⁴⁾ de Janeiro a Março de 2009, houve um surto de *Salmonella* sp., em granjas de postura, em Barbados (Caribe), pois, das 26 fazendas analisadas, 19 foram classificadas como positivas para *Salmonella* sp., indicando uma alta prevalência de *Salmonella*. No Brasil, a *Salmonella* sp. é o principal agente etiológico responsável por doenças transmitidas por alimento, com taxas de mais de 19%.⁽²⁵⁾

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Salmonella* sp. em ovos e cloacas de galinhas provenientes de dois sítios produtores no Rio Grande do Sul, sendo um para consumo próprio e o outro para comércio. Para a prevenção de doenças, este último fazia uso de antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em dois sítios localizados no Rio Grande do Sul (RS), um não comercial da cidade de Águas Claras e outro comercial da cidade de Torres. As análises das amostras foram feitas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Metodista, IPA, após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Metodista (Protocolo CEUA nº 23/2012).

A amostragem foi constituída por 30 galinhas e 17 ovos. O critério de inclusão, no sítio que criava para consumo próprio, foi aves que não faziam uso de antibióticos e, no sítio comercial, animais que faziam uso de antibióticos. No sítio não comercial, foram analisadas 22 aves e 10 ovos e, no sítio com criação para a venda, foram estudadas 8 aves e 7 ovos. Cada um dos estabelecimentos fornecia diferentes dietas. Enquanto o primeiro sítio tratava os animais com verduras, cereais e ração, o segundo ofertava ração comercial e antibióticos. Foram excluídas as aves que não realizavam postura.

A colheita dessas amostras ocorreu no mês de abril de 2013. Cada ave foi contida com a parte posterior para cima a fim de permitir a coleta do material da cloaca, com swab umedecido com água peptonada, em movimentos circulares. Posteriormente, o swab foi submerso em 9 mL de água peptonada tamponada, em tubos de ensaio individualizados e identificados. Em outro momento, foi coletado o material dos ovos com swab umedecido com água peptonada, em movimentos circulares, de maneira a abranger toda a casca do ovo. Em seguida, o swab foi também submerso em 9 mL

de água peptonada tamponada, em tubos de ensaio individualizados e identificados.

O material foi transportado para o laboratório em temperatura de 2° a 6°C. Os tubos de ensaio foram colocados, na estufa, a 37°C, por 24 horas. Após este período de incubação, foram transferidos 100 µL de cada amostra para tubos de ensaio contendo 4 mL de meio selenito. Estes foram incubados, por 24 horas, em estufa, a 37°C. Consecutivamente, foi realizada a semeadura, por esgotamento, em meios agar MacConkey e agar *Salmonella/Shigella* (SS), incubando-se a 37°C, por 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram analisadas. As que não apresentaram crescimento foram consideradas negativas. Naquelas em que houve crescimento, procedeu-se a série bioquímica para identificação do microrganismo. Neste contexto, as provas bioquímicas realizadas para a identificação de *Salmonella* foram TSI, SIM, Citrato, Ureia, LIA. Após a semeadura, as amostras foram, novamente, incubadas a 37°C, por 24 horas, quando, então, foi procedida a identificação através da leitura dos resultados das provas bioquímicas.

RESULTADOS

Das 22 amostras de cloacas obtidas das aves do sítio não comercial, 3 foram positivas para *Salmonella* sp. Desse mesmo sítio, das 10 amostras de ovos, 8 foram também positivas para a mesma bactéria (Figura 1A). Das 8 amostras

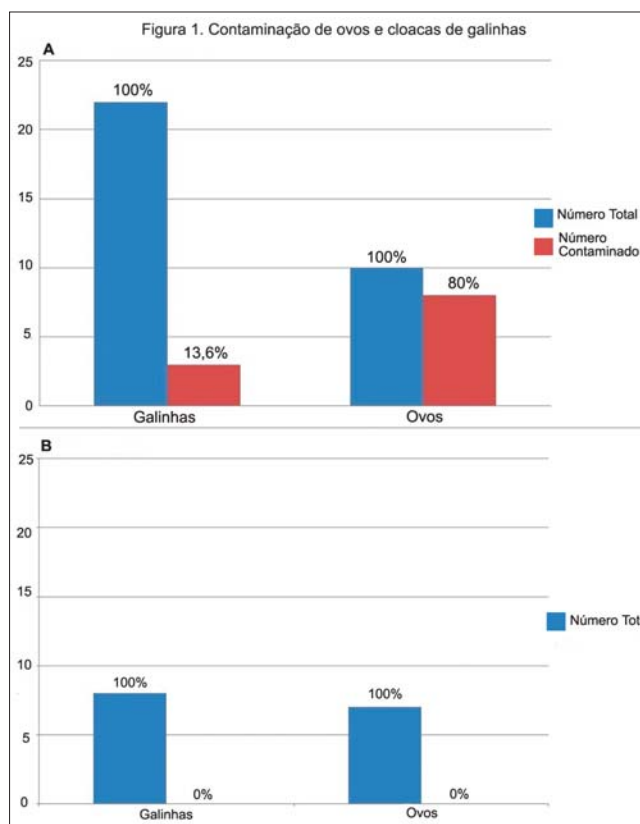


Figura 1 A. Sítio para Consumo Próprio; Figura 1 B. Sítio Comercial

de cloacas de aves do sítio comercial, nenhuma apresentou *Salmonella* sp. Desse sítio, também não se obteve isolamento bacteriano das 7 amostras de ovos avaliadas (Figura 1B).

DISCUSSÃO

A *Salmonella* sp. é uma bactéria que tem um reservatório animal específico. Por fazer parte da microbiota comum de galináceos, poderá haver uma colonização do canal ovopositor, ocorrendo a contaminação na formação da gema do ovo. Desse modo, compreende-se que, se o animal estiver contaminado, os produtos derivados dele também estarão.⁽¹²⁾ Os resultados deste estudo mostram que, em 22 aves, apenas 3 apresentavam *Salmonella* nas cloacas. Entretanto, em 10 ovos, 8 estavam contaminados. A casca do ovo pode se tornar contaminada ao atravessar a porção final do oviduto, cloaca e após a postura, nas instalações ou durante o processamento de lavagem e classificação dos ovos.⁽²⁶⁾ Grande parte da contaminação dos ovos por *Salmonella* sp. ocorre através da casca. No presente estudo, o alto índice de *Salmonella* sp., nos ovos, justifica-se pelo contato entre eles. A transmissão de *Salmonella* sp. em galinhas poedeiras pode ocorrer durante a incubação de ovos férteis. Neste contexto, quando ovos livres da contaminação por *Salmonella* sp. são incubados junto com ovos contaminados, a bactéria se espalha rapidamente, elevando a taxa de contaminação.^(27,28) Os fatores que influenciam a passagem dessa bactéria para a parte interna do ovo (gema e clara) são temperatura e tempo de armazenagem.⁽²⁹⁻³¹⁾ No ano de 2010, autoridades sanitárias dos EUA fizeram um *recall* de milhões de ovos dispostos no mercado após a confirmação de surtos causados por *S. Enteritidis*.⁽¹⁵⁾ Otomo et al.⁽³²⁾ observaram a associação de aves e ovos contaminados com *Salmonella* sp. em surtos de infecção alimentar em humanos, no Japão.

A persistência de *Salmonella* na casca de ovos experimentalmente contaminados pode chegar a 21 dias, tanto para os mantidos em temperatura ambiente quanto para aqueles sob refrigeração.⁽³⁰⁾ Sabe-se que a contaminação de ovos pode ocorrer pela contaminação vertical e/ou horizontal. De acordo com Gantois et al.,⁽³³⁾ as salmoneloses ligadas ao consumo de ovos são atribuídas, principalmente, a ovos contaminados de forma vertical, de casca limpa e aparência normal.

A presença de *Salmonella* sp. é relatada em estudos que envolvem ambiente e aves com um dia de vida. Zancan et al.,⁽³⁴⁾ ao pesquisarem *Salmonella* sp. em caixas de transporte de pintos de um dia, para a produção de ovos, encontraram 77% de lotes positivos para *Salmonella* sp., demonstrando a possibilidade de transmissão através do transporte e o caracterizando como um fator importante de introdução de *Salmonella* sp. nas granjas de produção. Lotes de pintos positivos no início da vida podem tornar-se portadores desse agente até a fase adulta, resultando na contaminação de carcaça e ovos. Além de aves positivas para esse agente, a contaminação dos ovos através do

ambiente contaminado permite a sobrevivência da *Salmonella* sp., por longos períodos.⁽³⁵⁻³⁸⁾

A transmissão horizontal de *Salmonella* sp. ocorre através do contato direto entre aves, ingestão de água ou alimento contaminado, pessoas e equipamentos e pela penetração da bactéria através da casca nos ambientes, ainda que a estrutura do ovo apresente barreiras físicas e químicas contra a contaminação por patógenos.^(2,31,39)

O uso de antibióticos na alimentação de animais, para o tratamento ou para a prevenção de doenças, permite que bactérias resistentes se propaguem aos seres humano, através da cadeia alimentar.⁽⁴⁰⁾

CONCLUSÃO

Visto que a *Salmonella* sp. é um agente frequentemente encontrado no ambiente e que a galinha é portadora natural dessa bactéria, justifica-se a presença deste microrganismo no sítio não comercial, bem como a ausência deste, devido ao uso de antibiótico, nas aves do sítio que as comercializa.

Ressalta-se, ainda, a importância de se assegurar o controle de *Salmonella* em alimentos, uma vez que esse é um importante patógeno associado à toxinfecções alimentares.

Abstract

Objective: Evaluate the presence of *Salmonella* sp. on eggs and cloacae of chickens from two sites in the Rio Grande do Sul, one for their own use and the other for trade. **Methods:** The sample consisted of 30 chickens and 17 eggs. Being 22 chickens and 10 eggs coming from a site that uses for its own consumption, located in Águas Claras/RS, and 8 chickens and 7 eggs proceeded from a site that commercialize them, located in Torres/RS. The *Salmonella* isolation was done on MacConkey agar and *Salmonella* / *Shigella* agar, then the identification and confirmation was made by biochemical tests. **Results:** It was observed the presence of *Salmonella* sp. in the own use site on 13.6% and 80% in eggs. In the site that use for trade there's absence of *Salmonella*, as in the cloacae as in eggs. **Conclusion:** *Salmonella* sp. is an agent commonly found in the environment and the chicken is a natural carrier of this bacteria, justifying her presence at the site used for own consumed and because of the use of antibiotics in chickens, her absence in the site that trade them.

Keywords

Chickens; *Salmonella*; Eggs; Cloacae

REFERÊNCIAS

1. Quinn PJ, Marey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre; Artmed, 512p. 2005.
2. Gast RK. Paratyphoid Infection, In: Saif YM, et al. Diseases of Poultry, Ed 12, p.636-665, 2008.
3. Best P. Vectores objetivo en la transferencia de salmonera. Las medidas para prevenir las recontaminaciones son una parte importante del plan de control. Ind. Avic. p.26-28, 2007.
4. Wales AD, Allen VM, Davies RH. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. Foodborne Pathog Dis. 2010 Jan;7(1):3-15.

5. Popoff MY, Bockemühl J, Brenner FW, Gheesling LL. Supplement 2000 (nº44) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* 2001 Dec;152(10):907-9.
6. Back A. Manual de doenças das aves. Cascavel: Coluna do Sber, p.219, 2004.
7. Berchieri JA, Freitas NOC. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior A, Nepomuceno SE, Di Fábio J, Sesti L, Zuanaze MAF. Doenças das Aves. Caminas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Cap.4.,p.435-454. 2009.
8. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA, Weill FX. Supplement 2003-2007 (Nº47) to the White-kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 2010 Jan-Feb;161(1): 26-9.
9. WHO - World Organization for Animal Health. Salmonelosis,2010. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online> Acesso em: 24 de Abril de 2012.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Normativa Nº 64, de 18 de Dezembro de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, , Seção 1, Página 21. 19, fev. 2008.
11. Medeiros MAN. Prevalência de Salmonella sp. e resistência antimicrobiana dos isolados em carcaça de frangos congelados no varejo. In: Internacional Seminar Of Avian Salmonellosis, 2011, Rio de Janeiro. ANAIS. Rio de Janeiro: União Brasileira de Avicultura, Associação Latino-americana de Avicultura,p.5. 2011.
12. Humphrey TJ. Contamination of egg shell and contents with Salmonella enteritidis: a review. *Int J Food Microbiol.* 1994 Jan;21(1-2):31-40.
13. Morris GK. Salmonella Enteritidis and eggs: assessment of risk. *Dairy, Food and Environ Sanit.* 1990;10,p.279-81.
14. Davies RH, Wray C. Persistence of Salmonella Enteritidis in poultry units and poultry foog. *Br Poult Sci.* 1996 Jul;37(3):589-96.
15. CDC - Center for Disease Control and Prevention. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human Salmonella Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. CDC, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/typh1209/> Acesso em 24 de Março de 2013.
16. Quinn NE. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe. 1994.
17. Tortora Gerard J, Funke Berdell R, Case Christine L. Microbiologia, Editora: ARTMED, 10a edição, 964p, 2011.
18. Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, Thompson TL, Lee KW, Nickerson KW, Kokjohn TA. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophage of Sphaerotilus natans, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Feb;64(2):575-80.
19. Jepson MA, Clark MA. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol.* 1998 Sep;6(9):359-65.
20. Clark RC, Gyles CL. Salmonella. In: Gyles CL, Charles OT. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University: Ames, p.133-153. 1996.
21. Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. Vaccination for control of Salmonella in poultry. *Vaccine.* 1999 Jun 4;17(20-21):2538-45.
22. Molbak K, Olsen JE, Wegener HC. Salmonella infections. In: Foodborne Infections and Intoxications. Cap. 3, p. 57-114, 3a ed., 2006.
23. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jan;17(1):7-15.
24. Aimey V, Hunte K, Whitehall P, Sanford B, Trotman M, Delgado A, et al. Prevalence of and examination of exposure factors for Salmonella on commercial egg-laying farms in Barbados. *Prev Vet Med.* 2013 Jul 1;110(3-4):489-96.
25. SVS. Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Disponível em: www.saude.gov.br/svs.2011 Acesso em: 15 de Junho de 2012.
26. Gama NMSQ. Salmonella sp. em aves de postura comercial. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal - UNESP. São Paulo, 2001.
27. Kttwitz LBM, Back A, Leão JA, Alcocer I, Karan M, Oliveira TCRM. Contaminação por Salmonella sp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008;60:496-8.
28. Barreto NSE, Vieira RHSF. Salmonella versus manipuladores de amilentos: um fator de risco para os consumidores. *Hig Aliment.* 16(101):15-9, 2002.
29. Stadelman WJ. The preservation of quality in shell eggs In: Stadelman WJ. Egg science and technology. 3a ed. Westport: AVI., p.63-96. 1986.
30. Silva EN. Salmonella enteritidis em aves e saúde pública. *Hig. Alimentar.* 1995;9:7-13.
31. Barancelli GV, Martin JGP, Porto E. Salmonella em ovos: relação entre produção e consumo seguro. *Segurança Alimentar e Nutricional.* 2012;19:73-82.
32. Otomo Y1, Abe K, Odagiri K, Shiroto A, Takatori K, Hara-Kudo Y. Detection of Salmonella in spent hens and eggs associated with foodborne infections. *Avian Dis.* 2007 Jun;51(2):578-83.
33. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Jul;33(4):718-38.
34. Zancan FT, Berchieri Junior A, Fernandes SA, Gama NMSQ. Salmonella sp. investigation in transport boxes of Day-old birds. *Braz J Microbiol.* 2000;31:230-2.
35. Davies RH, Breslin M. Persistence of Salmonella enteritidis phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ Microbiol.* 2003 Feb;5(2):79-84.
36. Harbaugh E, Trampel D, Wesley I, Hoff S, Griffith R, Hurd HS. Rapid aerosol transmission of Salmonella among turkeys in a simulated holding-shed environment. *Poult Sci.* 2006 Oct;85(10): 1693-9.
37. Carrique-Mas JJ, Davies RH. Salmonella Enteritidis in commercial layer flocks in Europe: legislative background, on-farm sampling and main challenges. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2008;10(1):1-9.
38. Gast RK, Guard-Bouldin J, Holt PS. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of Salmonella Heidelberg. *Avian Dis.* 2005 Sep;49(3):382-6.
39. Cox NA, Berrang ME, Cason JA. Salmonella penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs - a review. *Poult Sci.* 2000 Nov;79(11):1571-4.
40. WHO - World Health Organization. 10 Facts on Antimicrobial resistance. 2011. Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.html Acesso em: 17 de Março de 2012.

Correspondência

Larissa Kluwe dos Santos

Rua Aneron Correa de Oliveira, 294

Bairro Jardim do Salso

91410-070 – Porto Alegre, RS



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Brazilian Journal of Clinical Analysis

ISSN 0370-369-X – Versão Impressa

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC), criada em 1969, é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS). No Qualis-Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a RBAC se encontra nos seguintes estratos por área de avaliação: B4: interdisciplinar, saúde coletiva e biotecnologia; B5: farmácia, medicina I, II e III, medicina veterinária e odontologia.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC) é publicada em português e inglês e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária.

Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a **Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais**, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em ".pdf". As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de conflito de interesse é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 196/96) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em ".pdf" da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA) deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado, explicitamente, no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em ".pdf" da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A Revista Brasileira de Análises Clínicas apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde (OMS), do International Committee of Medical Journal Editor (ICMJE) e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR), International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN), Netherlands Trial Register (NTR), UMIN Clinical Trials Registry (UMIN-CTR), WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (<http://www.ensaios-clinicos.gov.br>) do Ministério da

Saúde (DECIT/MS), Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) é igualmente aceito pela RBAC. O número de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção **Material e Métodos**.

Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por, pelo menos, dois pareceristas/revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados serão informados e devolvidos aos autores.

A Revista Brasileira de Análises Clínicas está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunoematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categoriais de comunicação científica designadas abaixo:

ARTIGOS ORIGINAIS: trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chave/keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5.000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

ARTIGOS DE REVISÃO: trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chave/keywords (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

COMUNICAÇÃO BREVE: trabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chave/keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RELATO DE CASO: trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou

apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3.000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

NOTA TÉCNICA: Descrição/ validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5.000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RESENHA: Revisão crítica de obra recém-publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/ abstract.

IMAGENS EM ANÁLISES CLÍNICAS: máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em ".jpg" ou ".tiff" e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

CARTA AO EDITOR: correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na *Revista Brasileira de Análises Clínicas* ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnico-científicos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

EDITORIAIS: escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Deverão conter um máximo de 2.000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é **enfaticamente** estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, esteja familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos.

A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a normalização técnica conforme o quadro abaixo:

ESTRUTURA DOS ARTIGOS	
Português	Inglês
Título Completo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Complete Title <i>Incluir versão em Português</i>
Título Corrido <i>Incluir versão em Inglês</i>	Running Title <i>Incluir versão em Português</i>
Autores	Authors
Resumo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Abstract <i>Incluir versão em Português</i>
Palavras-Chave <i>Incluir versão em Inglês</i>	Keywords <i>Incluir versão em Português</i>
Introdução	Introduction
Material e Métodos	Material and Methods
Ética	Ethics
Resultados	Results
Discussão	Discussion
Conclusão	Conclusion
Conflito de interesse	Conflicts of Interests
Suporte Financeiro	Funding Sources
Agradecimentos	Acknowledgements
Referências	References

TÍTULO COMPLETO: Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (excetuando-se, quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico.

TÍTULO CORRIDO: Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.

AUTORES: Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

RESUMO: Deverá ser redigido de forma impessoal, ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

PALAVRAS-CHAVE: Deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chave deverão ser extraídas do vocabulário DeCS (Descritores em Ciências da Saúde), elaborado pela Bireme, e/ou MeSH (*Medical Subject Headings*), elaborado pelo NLM (*National Library of Medicine*). Os vocabulários DeCS (<http://decs.bvs.br/>) e MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

INTRODUÇÃO: Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

MATERIAL E MÉTODOS: Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também, claramente, indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

ÉTICA: Nesta seção, deverá ser declarada, textualmente, o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionada também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição à qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando, claramente, o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

RESULTADOS: Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

DISCUSSÃO: Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

CONCLUSÕES: Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

CONFLITOS DE INTERESSE: Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito "Não há conflitos de interesse".

SUPORTE FINANCEIRO: Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS: Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

TABELAS: O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto [ou amostra] a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra "Tabela", seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas de rodapé [legendas], indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para notas

de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excel e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

FIGURAS: Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: **quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias.** Deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução (mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato ".jpg" ou ".tiff" e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excel em formato ".doc", ".docx" ou ".xls" e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excel, caso não seja possível converter para formato ".tiff". Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações serão colocadas deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverá ser enviado um número excessivo de figuras.

REFERÊNCIAS: As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédicas) pelo *International Committee of Medical Journal Editors* [ICMJE] (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em www.scielo.br/pdf/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf (Versão em Português) ou em www.icmje.org/urm_full.pdf (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em *List of Journals Indexed in Index Medicus* [National Library For Medicine] (<http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt>). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. **A lista das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética.** Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de "resumo", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores.

As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

TEXTO: Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o **Sistema de Chamada Numérico**. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parênteses. Os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

Observações Gerais:

- Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula "e" entre os sobrenomes;
- Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina "et al.";
- Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento deverão ser indicados/ tratados como autores;
- Nomes contendo mais de um sobrenome deverão ser indicado o último sobrenome, sem partículas de ligação como "de" ou "da";
- Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofes ou que formem uma expressão deverão ser indicados em seu conjunto;
- Termos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.

Alguns exemplos de citações:

- **Um/duos autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyaji⁽²⁶⁾ mudaram a denominação do fungo para *Hortaea werneckii*, em homenagem a Parreiras Horta.
- **Mais de dois autores:** Giannopoulos *et al.*⁽³²⁾ também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.

• **Autores corporativos:** De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes,⁽¹⁷⁾ os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).

• **Editores/ Projetos editoriais:** Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,⁽⁵⁾ a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias.

• **Sem indicação de nome de autor:** O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.⁽¹⁴⁾

AUTORES: Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. **Todos os autores** deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

Observações Gerais:

- Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;
- Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;
- Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;
- Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livre-docência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;
- Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/ emissão recomendados pela NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.
- Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência como suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS: Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra deverá ser iniciada por letra maiúscula. Não deverão ser escritos em negrito ou itálico e devem ser finalizados por ponto.

TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO: Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita utilizando-se ponto e vírgula.

MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS: O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec. No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais [445-449, utilizar: 445-9].

EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO: As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra "edição" no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição.

PARÁGRAFOS: Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

Alguns exemplos de referências:

Periódicos:

- **Um Autor:** Marques SA. Paracoccidioidomycosis. Clin Dermatol. 2012 Nov;30(6):610-5.
- **Mais de um autor:** Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. Singapore Med J. 2012 Sep;53(9):604-7.
- **Até seis autores:** Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. Intern Med. 2012;51(20):2967-71.
- **Mais de seis autores:** Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. Cryptococcus neoformans-

Cryptococcus gattii Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov;56(11):5898-906.

• **Autores pessoais e corporativos:** Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*. 2012;16(3):205-42.

• **Volume com suplemento:** Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

• **Número com suplemento:** Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. *Cancer Control*. 2012; 19(4 Suppl):4-15.

• **Editorial com indicação de autoria:** Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int*. 2012;61(3):351-2.

• **Editorial sem indicação de título:** Bartels PD. Editorial. *Ugeskr Laeger*. 2012;174(42):2518.

• **Artigo/ Editorial sem indicação de autoria:** Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. *Proteomics*. 2012;12(19-20):2902-3.

• **Carta ao editor:** Dettlenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(8):139.

• **Artigo com DOI:** Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. *Pediatrics*. 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.

• **Autor corporativo:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012 Oct 19;61:839-42.

Livros:

• **Um autor/ mais de um autor:** Stockham SL, Scott MA. Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

• **Autor de obra e de capítulo:** Rey L. Bases da parasitologia médica. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

• **Capítulo:** Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Penteado MV. Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

• **Responsabilidade intelectual destacada:** Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F, organizadores. Ética em pesquisa: temas globais. Brasília: Editora UNB; 2008.

Teses, Dissertações e Monografias:

• **Autor e indicação de grau:** Maranhão FCA. Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

Eventos Científicos:

• **Anais com indicação de título:** Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.

• **Anais com indicação de autoria, trabalho e título:** Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH, Dornelas-Ribeiro M, Maia S, et al. Espécies de *Candida* isoladas de pacientes leucêmicos. In: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007. p. 314.

Órgãos/ Instituições:

• **Um autor corporativo:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

• **Mais de um autor corporativo:** Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Relatório de atividades: 2006. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.

Referências Legislativas:

• **Leis:** Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial da União 20 set 1990; seção 1.

• **Decretos:** Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. Diário Oficial da União 29 jun 2011; seção 1.

• **Portarias:** Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. Diário Oficial da União 13 mai 1998; seção 1.

• **Resoluções:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União 14 out 2005; seção 1.

Meios Eletrônicos:

• **Periódicos:** Mondelli AL, Niéro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf>.

• **Referências legislativas:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. Diário Oficial da União 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.unesp.br/pgp/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.

• **Eventos Científicos:** Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 40. Congreso Virtual de Micología de Hongos Patógenos en América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: <http://congresomicologia.ucv.ve>.

A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo **Sistema de Gestão de Publicações (SGP)**, no endereço: www.sgponline.com.br/rbac/sgp. Outras formas de submissão, não serão aceitas.

Observações Gerais:

• A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo SGP, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status;

• Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de login e senha;

• A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;

• O SGP atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;

• Pedidos de *fast-track* poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pós-graduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores. Os pedidos de *fast-track* deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.

MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC. Declaramos também que o artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores. Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____/____/____.