

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

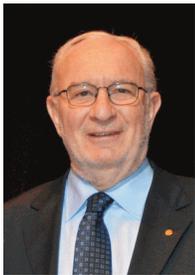
Sumário

Perfil dos pacientes diabéticos tipo 2 atendidos no Laboratório do Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso - Minas Gerais	169
<i>Aparecida Souza Almeida, Maria Ruth Gonçalves Gaede Carilho, Núncio Antonio de Araújo Sól, Maria Claudia Feres Monteiro de Castro, Angélica Alves Lima</i> Profile of diabetics patients type 2 attended in the Laboratory of Asilo de Caridade (Santa Casa) in Bom Sucesso - Minas Gerais	
Isolamento de <i>Cryptococcus neoformans</i> de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas	176
<i>Maurício Cichon, Flávio de Queiroz-Telles, Marisol Domingues Muro, Vânia Aparecida Vicente, Gisele Pesquero Fernandes Bordignon</i> Isolation of <i>Cryptococcus neoformans</i> from environmental samples of Curitiba and metropolitan region (Paraná, Brazil), and susceptibility antifungal testing	
Neoplasias intraepiteliais cervicais: faixa etária no momento do diagnóstico citológico	180
<i>Narriman Kennia da Silva Barros, Megmar Aparecida Santos Carneiro, Suelene Brito do Nascimento Tavares, Nadja Lindany Alves de Souza, Maria de Lourdes Siqueira, Daniel Fernandes de Oliveira, Mara Cristina Nolasco Sampaio, Sílvia Helena Rabelo-dos Santos</i> Cervical intraepithelial neoplasia: age group in the moment of the cytological diagnosis	
Vantagens do diagnóstico molecular para malária em comparação à microscopia	183
<i>Janayna Roriz Hipólito, Pedro Paulo Vieira, Cláudio Fernández Araujo, Maria das Graças Costa Alecrim</i> Advantages of malaria molecular diagnosis in comparison to microscopy	
Buccal <i>Candida albicans</i> in children with Down's syndrome: prevalence and <i>in vitro</i> susceptibility to antifungal drugs by E-test® ribbons method	189
<i>Evandro Leão Ribeiro, Cerise de Castro Campos, Mara Sílvia Carvalhaes, Clever Gomes Cardoso, Wesley Magno Ferreira, Meire Maria de Lima, Ana Carolina Bussaco Maranhão, Sueli Meira da Silva Dias, Fabiana Cristina Pimenta, Orlando Ayrton de Toledo</i> <i>Candida albicans</i> de cavidade oral de crianças com Síndrome de Down: prevalência e suscetibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas pelo método de fitas de E-test®	
Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de ralos e pias de enfermarias hospitalares em Santa Catarina, Brasil	192
<i>Clédina de Oliveira, Patrícia da Silva Malheiros, Marília Montagner, Eliandra Mirlei Rossi, Adriano Brandelli</i> Antimicrobial resistance profile of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains isolated from sinks and drains in hospital wards in Santa Catarina, Brazil	
Atividade <i>in vitro</i> da tigeciclina frente aos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> no Hospital Júlia Kubitschek da Fundação Hospitalar de Minas Gerais	197
<i>Valéria Martins Soares, Giselle Cristina Dominguetto Carvalho</i> <i>In vitro</i> activity of tigecycline against <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates in Hospital Júlia Kubitschek of Minas Gerais Hospital Foundation	
Rastreabilidade das causas de não conformidade em meios de cultura	201
<i>Elizabeth El Hajjar Droppa, Thail Leal Sampaio, Marcelo Pilonetto, Rosiane Nickel</i> Traceability of the causes of non-compliance in culture media	
Aumento dos níveis de LDLox induzem maior formação de células espumosas <i>in vitro</i>	213
<i>Mariene Silva Bardi Gonçalves, Décio Sabbatini Barbosa, Francis Fregonesi Brinholi, Bruno Alberto Fabris, Maria Emília Fávero</i> Increased levels of oxLDL induce higher foam cells formation <i>in vitro</i>	
Quantificação e identificação de <i>Candida</i> na cavidade oral de crianças	217
<i>Ellen D. Dal Vesco, Bruna Ricci, Géssica A. Costa, Iliane R. D. Lamonato, Nádia M. R. Oliveira & Sidney Becker Onofre</i> Quantification and identification of <i>Candida</i> in the oral cavity children	
Atividade antifúngica das folhas de <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis subsp. <i>verticillata</i> frente a <i>Candida albicans</i>, <i>Candida krusei</i>, <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i>	222
<i>Tatiane Vieira Braga, Juliana Tensol Pinto, Maria Elisabete da Silva Barros, Tânia Toledo de Oliveira, Rosaria Gonçalves Rodrigues das Dores, Tanus Jorge Nagem</i> Antifungal activity of the leaves of <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. <i>verticillata</i> against <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> and <i>Candida tropicalis</i>	
Uso de pool de soros em Programa Piloto de Comparação Interlaboratorial	226
<i>Rejane Giacomelli Tavares, Rafael Schutz, Carlo Isaia Neto, Vladimir Vicente Cantarelli</i> Use of pool of blood serum in Pilot Program Interlaboratory Comparison	
Aspectos fenotípicos e do potencial patogênico de amostra de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> isolada de processo de osteomielite em paciente com neoplasia	230
<i>Renata Stavracakis Peixoto, Glenda CO Siqueira, Felipe M. Luca, Lincoln O Sant'Anna, Louise S Santos, Débora LR Gomes, Monica C Souza, Priscila S Sabbadini, Raphael Hirata Jr, Carlos Alberto S Martins, Ana Luiza Mattos Guaraldi</i> Phenotypic aspects and pathogenic potential of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> strains isolated from cancer patient with osteomyelitis	
Avaliação do desempenho analítico do coagulômetro automatizado sysmex ca-1500: experiência do Hospital de Clínica da UFPR	237
<i>Samuel Ricardo Comar, Juliana Baldissarelli Locatelli, Lilian Odelli, Lismara Kafka do Bornfim</i> Performance evaluation of the Automated Coagulation Analyzer Sysmex® Ca-1500: experience of the Hospital de Clínicas of UFPR	
Estudo do líquido pleural: uma revisão	245
<i>Luiz Fernando de Almeida Fonseca</i> Pleural effusion study: a review	
O uso dos biomarcadores p16 e Ki-67 em citologia cérvico-vaginal: revisão de estudos	251
<i>Patrícia Borges da Silveira de Mello</i> The use of biomarkers p16 and Ki-67 in cervix-vaginal cytology: studies review	
Diagnósticos molecular - passado, presente e futuro	254
<i>Gustavo Barcelos Barra, Maria Cecília Sant Anna Soares Borges Caixeta, Patrícia Godoy Garcia Costa, Claudia Ferreira de Souza, Lara Franciele Ribeiro Velasco</i> Molecular diagnosis - past, present and future	

RBAC é uma publicação da

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Volume 43 Número 3 Ano 2011



Dr. Irineu Grinberg
Presidente da SBAC

Prezado colega,

Estamos lhe entregando neste momento mais um número da *Revista Brasileira de Análises Clínicas* (RBAC). Como havíamos nos expressado anteriormente, a RBAC vem passando por um processo de renovação, e, em breves tempos, tornar-se-á uma das mais importantes publicações científicas do nosso país. Este compromisso foi assumido pela atual diretoria da SBAC e está muito perto de alcançar a plenitude.

Temos a mais absoluta certeza que o presente volume será um marco na história da nossa revista, entretanto, dentro da nossa vontade de crescer e projetar o nome da SBAC aos mais variados horizontes, muita coisa ainda está por vir.

Nos próximos números apresentaremos uma forma inédita de interação com o leitor, tornando a RBAC ainda muito mais atrativa.

Como a revista é apenas um dos pontos fundamentais da SBAC, cumpre ainda informar que os preparativos para o 39º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas estão decorrendo da forma mais esplendorosa possível. Já temos uma programação científica definida, com a participação de "players" da mais alta qualificação, o que nos dá a certeza da unanimidade em relação à apreciação deste evento. A programação social, como sempre em nossos eventos, será de nível intransponível e, em muito breve, será divulgada.

Nossas atividades em ensino continuam crescendo, e tanto o Centro de Pós-Graduação como o ensino à distância SBAC *e-learning* estão com programações que podem levar a seus frequentadores o que há de melhor e mais atual no conhecimento laboratorial.

O compromisso da SBAC com os colegas que exercem a militância nos Laboratórios Clínicos é inalienável e dele nunca nos afastaremos.

Boa leitura

Irineu Grinberg

Presidente

Aspectos fenotípicos e do potencial patogênico de amostra de *Corynebacterium diphtheriae* isolada de processo de osteomielite em paciente com neoplasia

Phenotypic aspects and pathogenic potential of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from cancer patient with osteomyelitis

Renata Stavracakis Peixoto¹, Glenda CO Siqueira¹, Felipe M Luca¹, Lincoln O Sant'Anna¹, Louise S Santos¹, Débora LR Gomes^{1,3}, Monica C Souza¹, Priscila S Sabbadini¹, Raphael Hirata Jr¹, Carlos Alberto S Martins^{1,2}, Ana Luiza de Mattos-Guaraldi^{1*}

Resumo: Além da difteria permanecer endêmica em diversos países, os clínicos e microbiologistas também devem permanecer atentos ao fato de amostras atoxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* causarem infecções invasivas, inclusive em pacientes imunocomprometidos e/ou hospitalizados. Um grupo de microrganismos, incluindo *C. diphtheriae*, tem sido relacionado com quadros de osteomielite. Em casos de câncer, pode ser favorecido o aparecimento de quadros de osteomielite em decorrência de contaminação por via hematogênica, foco infeccioso ou lesão contígua ao osso. Entretanto, ainda são poucas as investigações relativas ao potencial patogênico de cepas atoxinogênicas de *C. diphtheriae*. No presente estudo, foi descrito o primeiro caso de isolamento de *C. diphtheriae* subsp. *mitis* atoxinogênico e do biotipo não fermentador de sacarose (BR5015) de osteomielite em paciente com câncer. O microrganismo foi capaz de expressar os seguintes fatores de virulência: expressão de perfil de aderência misto dos tipos agregativo e difuso (AA-AD) e elevada (11,13%) capacidade de sobrevivência intracitoplasmática em células epiteliais humanas (HEp-2) além da produção de porfirina e de enzimas catalase, nitrato redutase e DNase. *C. diphtheriae* atoxinogênico não deve ser considerado como mero contaminante, uma vez que pode estar direta ou indiretamente relacionado com o estabelecimento e/ou manutenção de processos infecciosos de origens diversas, incluindo osteomielite

Palavras-chave: *Corynebacterium diphtheriae*; Neoplasia; Osteomielite

Abstract: As well diphtheria remaining endemic in several countries, clinicians and microbiologists must also remain alert to the fact that nontoxigenic samples of *Corynebacterium diphtheriae* are capable of causing invasive infections, especially in hospitalized and/or immunocompromised patients. Patients with cancer are more susceptible to the appearance of cases of osteomyelitis obtained by hematogenic contamination, an infectious focus or by lesions adjacent to bone. Many microorganisms may be related to cases of osteomyelitis, including *C. diphtheriae*. However, there are still only a low number of investigations into the pathogenic potential of nontoxigenic strains of *C. diphtheriae*. The present study is the first documented case of isolation of a nontoxigenic *C. diphtheriae* subsp. *mitis* of the non sucrose-fermenting biotype (BR5015 strain) from osteomyelitis in the frontal bone of a patient with adenoid cystic carcinoma. The virulence factors tests were as follows: expression of a mixed adherence patterns of aggregative-diffuse (AA-DA) types; high (11.13%) ability to survive within HEp-2 cells; DNase, catalase, nitrate-reductase activities. Therefore, nontoxigenic *C. diphtheriae* should not be merely regarded as a contaminant, since it can be directly or indirectly related to the establishment and/or maintenance of infectious processes, including osteomyelitis.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*; Cancer; Osteomyelitis

INTRODUÇÃO

A difteria é uma doença infecto-contagiosa de evolução aguda, que, em sua forma clássica, se caracteriza essencialmente pelo desenvolvimento de quadro de faringite acompanhada de manifestações toxêmicas sistêmicas. O bacilo diftérico é capaz de produzir a toxina diftérica (TD) de natureza proteica capaz de atuar em diversos tipos celulares, em especial no miocárdio, sistema nervoso, rins e suprarenais.⁽¹⁻³⁾ O principal agente etiológico da doença, *Corynebacterium diphtheriae*, pode ser transmitido pelo contato direto entre um

indivíduo doente ou um assintomático e outro suscetível por meio das gotículas de secreções eliminadas na tosse, espirro ou na fala.⁽⁴⁾ Os primeiros sinais/sintomas da doença são relativamente inespecíficos, caracterizados, sobretudo, por mal-estar geral, febre relativamente baixa, dor de garganta (odinofagia) e perda do apetite. Com a evolução da doença, observa-se a formação de pseudomembrana branco-acinzentada, principalmente nas regiões de tonsila, oro e nasofaringe. Nos casos de maior gravidade, a pseudomembrana pode estender-se até o trato respiratório inferior, ocasionando quadro de insuficiência respiratória aguda por obstrução.^(23,29,31,50)

*Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC, Centro Colaborador para Difteria da CGLAB/SVS/MS, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

²Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia - Campus Realengo

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses

A circulação do bacilo diftérico ainda representa grande risco para populações de países em desenvolvimento. Outros fatores, além da vacinação antitoxina, influenciam a vulnerabilidade para a difteria, como, por exemplo, a condição imunológica do indivíduo e a virulência da amostra de *C. diphtheriae* envolvida.⁽⁸⁾

O perfil dos quadros de infecção causados pelo *C. diphtheriae* vem sofrendo modificações, tendo sido observado um aumento de casos de infecções invasivas predominantemente relacionados com amostras fracamente toxinogênicas ou atoxinogênicas.^(9,10) Independente da capacidade de produção de TD, o *C. diphtheriae* tem sido considerado o agente etiológico de infecções invasivas diversas em indivíduos previamente imunizados.⁽¹⁰⁻¹³⁾

A possibilidade de *C. diphtheriae* estar relacionado a quadros de infecção no ambiente hospitalar também foi demonstrada particularmente entre indivíduos com câncer.⁽¹⁴⁾ Entretanto, o potencial patogênico do microrganismo para este grupo de indivíduos ainda é frequentemente desconhecido ou subestimado pelos profissionais de saúde.⁽¹⁴⁾ Estudo recente demonstrou uma prevalência de casos de infecções pelo *C. diphtheriae* em pacientes com câncer 400 vezes maior do que o observado na totalidade da população brasileira.⁽¹⁵⁾

Em pacientes com câncer pode ser favorecido o aparecimento de quadros de osteomielite adquirida por contaminação por via hematogênica ou em decorrência de foco infeccioso ou de lesão contígua ao osso (ex. cirurgia).⁽¹⁶⁾ No diagnóstico de osteomielite, a biópsia óssea é considerada como procedimento padrão-ouro para esse tipo de identificação, e estudos microbiológicos como crescimento em meios de cultura específicos e teste de sensibilidade a antimicrobianos também são realizados.⁽¹⁷⁾

Diversos microrganismos, além de *Staphylococcus aureus*, podem estar relacionados com quadros de osteomielite, inclusive o *C. diphtheriae*. Entretanto, ainda são poucas as investigações relativas ao potencial patogênico de cepas atoxinogênicas de *C. diphtheriae* nesses processos infecciosos que envolvem o tecido ósseo.⁽¹⁸⁾

No presente estudo foi descrito o primeiro caso de isolamento de *C. diphtheriae* subsp. *mitis* de osteomielite em paciente com câncer e alguns dos possíveis fatores de virulência expressos pela amostra atoxinogênica BR5015 envolvida neste processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos clínicos: Em 25 de outubro de 2006, MNSS, do sexo feminino, parda, 41 anos de idade, residente em área carente da cidade do Rio de Janeiro (Morro do Fogueteiro), co-habitante com marido e três filhos, sendo o menor com 9 anos de idade, e com história vacinal de difteria desconhecida foi diagnosticada como portadora de tumor de narina direita – carcinoma adenoide cístico variante tubular com extensão para células etmoidais. Em 15 de maio de 2007 foi submetida a cirurgia craniofacial com exanteração de órbita direita (cirurgia combinada: cirurgia de cabeça e pescoço (CEP) e

neurocirurgia (NEU). Fez uso de Clavulin terapêutico. Reoperada em 01 de junho de 2008 para correção de deiscência cirúrgica. Estadiamento na ocasião: T4a Nx Mx - IV-A. Iniciou radioterapia (RXT) complementar em 11 de junho de 2007 com dosagem total de 6.600 Gy, apresentando seqüela da cirurgia e da RXT com exposição óssea na região nasal e cranial, com ampla comunicação da cavidade orbitária com a nasofaringe. Em 29 de janeiro de 2009 foi submetida a reconstrução microcirúrgica com retirada de osso frontal devido à osteomielite e enxertia em tempo único. Exame microbiológico de fragmento do osso frontal detectou cultura positiva de *S. aureus* metilicina-sensível em associação com *C. diphtheriae*. Em 05 de fevereiro de 2009 foi reinternada em decorrência de estado pós-comicial por crise convulsiva ocorrida na residência e submetida a tratamento com anticonvulsivo e tomografia computadorizada, que revelou ausência de lesão parenquimatosa cerebral. O exame clínico de revisão indicou ausência de infecção na ferida operatória e da área doadora. As culturas microbiológicas de rastreamento da ferida cirúrgica, área doadora (coxa), swab nasal e de orofaringe foram negativos para *C. diphtheriae*.

Microrganismo e caracterização fenotípica: Os espécimes clínicos obtidos a partir do osso frontal com osteomielite foram cultivados em meio Columbia ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro e caldo tioglicolato incubados a 37°C por 24 horas. No Setor de Bacteriologia do Instituto Nacional do Câncer – INCA, Rio de Janeiro, RJ, os bacilos gram-positivos foram inicialmente identificados como *C. diphtheriae* subsp. *mitis* pertencente ao biotipo não fermentador de sacarose pelo sistema miniaturizado API-Coryne API (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile 69280, França) - código 1010324 (95,9% ID).

Além da bacterioscopia pela técnica de coloração de Gram (Figura 1) os seguintes testes fenotípicos utilizando metodologias previamente descritas foram realizadas no LDCIC: pesquisa de produção de porfirina fluorescente sob luz ultravioleta ($\lambda = 366 \text{ nm}$) em cultivo no meio King B, hidrólise da esculina e atividades enzimáticas catalase, dnase, urease, nitrato-redutase e pirazinamidase (PYZ) em adição aos demais testes convencionais utilizados na caracterização fenotípica de *C. diphtheriae*.⁽¹⁹⁻²²⁾

A cepa tipo atoxinogênica *C. diphtheriae* subsp. *mitis* ATCC 27010 e a homóloga toxinogênica ATCC 27012 foram utilizadas como controles dos experimentos.

Ensaio de sensibilidade aos agentes antimicrobianos: A análise dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos foi feita pelo método de disco difusão em meio Mueller-Hinton agar suplementado com sangue de carneiro a 5% de acordo com as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os pontos críticos para *S. aureus* foram considerados para a penicilina e ampicilina. Para os outros agentes antimicrobianos foram usados o ponto de corte sugerido para outros microrganismos exceto *Haemophilus sp.* e *Neisseria gonorrhoeae*.^(21,23,24) Os antibióticos (Oxoid SA, Espanha) incluídos no teste foram penicilina G, ampicilina, ceftazidima, eritromicina, clindamicina, linezolida, ciprofloxa-

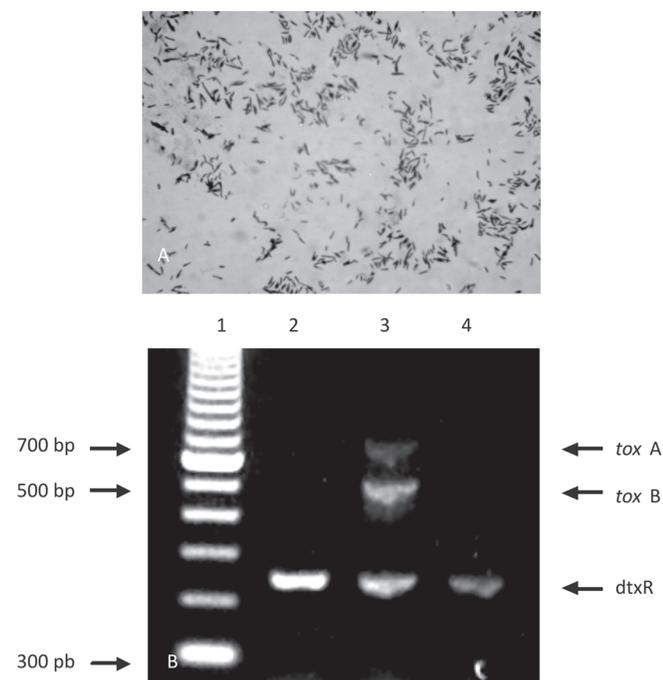


Figura 1 – Micrografias ilustrando os dados dos ensaios de (A) bacterioscopia pela coloração de Gram (Aumento 1000 x) e (B) mPCR obtidos com a amostra atoxinogênica *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis* INCA5015 isolada de osteomielite. Eletroforese em gel de agarose a 2% do perfil de amplificação das amostras por m-PCR empregando pares de oligonucleotídeos iniciadores para os genes das frações A (*toxA*) e B (*toxB*) da toxina diftérica e para o gene repressor da toxina diftérica, (*dtxR*), espécie-específico - Linha 1: PM – padrão de peso molecular; Linha 2: amostra *C. diphtheriae* INCA5015; Linha 2: ATCC 27012 (*tox+*) e Linha 3: ATCC 27010 (*tox-*)

cina, gentamicina, cloranfenicol, nitrofurantoína, rifampicina e vancomicina.

Ensaio de mPCR para a confirmação da espécie e do potencial toxinogênico da amostra: Ensaio de PCR multiplex utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos para o gene espécie-específico *dtxR* e dois outros pares de oligonucleotídeos que têm como alvo as regiões do gene *tox* relativas aos domínios A e B da TD foram realizados conforme previamente descrito.⁽²⁵⁾

Ensaio de interação bacteriana com células epiteliais humanas - linhagem HEp-2: Cultivo das amostras bacterianas e preparação das monocamadas – Em todos os experimentos relacionados à interação celular foi usado o meio Trypticase Soy Broth (Difco Lab., Detroit, MI, USA) para crescimento dos microrganismos por 48 horas a 37°C, e lavada duas vezes com 10 mM solução salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,2. O estoque bacteriano foi mantido em 10% de "Skim Milk" contendo 25% de glicerol a -80°C. As células de linhagem HEp-2 foram cultivadas em meio essencial de Eagle (MEM, Sigma) suplementado com glutamina (Sigma), antimicrobianos (50 μ L/mL⁻¹ de gentamicina e 2,5 μ L/mL⁻¹ de fungizona) e 5% de soro fetal bovino em 37°C e 5% de CO₂. A tripsinização dos tapetes celulares (solução de 0,2% tripsina e 0,02% EDTA em PBS, pH 7,4) foi realizada a cada 5-7 dias.⁽²⁶⁾

Determinação do padrão de aderência: Para a avaliação da aderência através de microscopia óptica, os tapetes subconfluentes cultivados sobre lamínulas de vidro, foram infectados com suspensão bacteriana (10⁶ UFC mL⁻¹) durante três horas e seis horas, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e corados durante 16 horas com corante Giemsa (Reagen) diluído 1:10 em PBS 0,01M pH 6,5. O padrão de aderência localizado (LA) foi definido pela presença de pequenos agregados bacterianos dispostos em alguns pontos da célula hospedeira, o padrão difuso (DA) por bactérias distribuídas aleatoriamente na superfície celular e o padrão agregativo (AA) por formação de agregados de bactérias organizados a semelhança de tijolos empilhados.⁽²⁷⁾

Ensaio de associação e viabilidade intracelular em HEp-2: Para análise da interação celular através da contagem de bactérias viáveis (UFC mL⁻¹), foram cultivadas monocamadas celulares com 95% de confluência diretamente sobre o fundo dos poços das microplacas com 24 orifícios. Nos ensaios de interação bacteriana com células HEp-2, as monocamadas celulares foram infectadas com as suspensões microbianas preparadas em meio MEM sem antibióticos (10⁶ UFC mL⁻¹) e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante três horas. Após o período de infecção, os tapetes foram lavados e parte deles foi exposta a gentamicina (150 μ g mL⁻¹) durante uma hora, com a finalidade de eliminar bactérias extracelulares aderidas às monocamadas (exclusão pela gentamicina). Em seguida, os tapetes foram lavados e tratados com PBS contendo 0,1% de Triton x 100 por cinco minutos para determinação do número de bactérias viáveis no compartimento intracelular. O percentual de aderência foi calculado a partir da contagem de bactérias viáveis no sobrenadante somado ao número de células viáveis associadas às monocamadas. Cada amostra bacteriana foi submetida a pelo menos três experimentos realizados em duplicata.⁽²⁶⁾

RESULTADOS

Perfil fenotípico da amostra BR5015 isolada de osteomielite: A amostra de bastonete Gram-positivo isolada de tecido ósseo com osteomielite apresentada na Figura 1A foi identificada como *C. diphtheriae* subsp. *mitis* do biotipo não fermentador de sacarose pelo sistema API Coryne (BR5015).

A amostra relacionada com quadro de osteomielite expressou a capacidade de produzir porfirina além das atividades enzimáticas de catalase, nitrato redutase e dnase.

Potencial toxinogênico: Além da confirmação molecular da amostra como *C. diphtheriae* pela da amplificação do gen *dtxR*, os ensaios de mPCR demonstraram que o microrganismo era desprovido de gene *tox*, sendo, portanto, incapaz de produzir TD (Figura 1B).

Sensibilidade aos agentes antimicrobianos: A amostra BR5015 mostrou sensibilidade para a maioria dos antimicro-

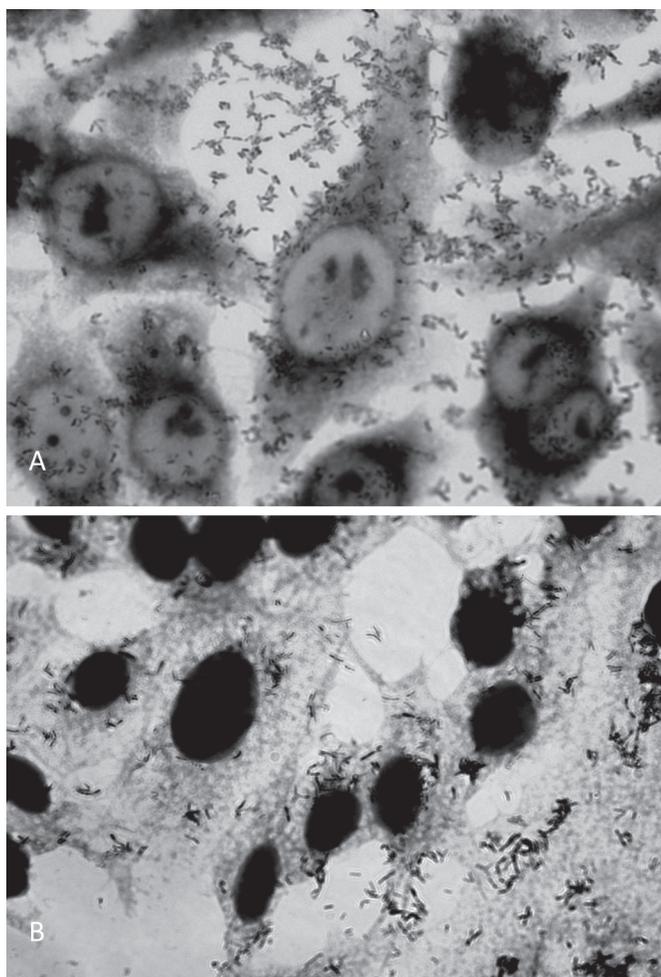


Figura 2 – Micrografias ilustrando a interação de células epiteliais da linhagem HEp-2 com a amostra atoxinogênica *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis* INCA5015 isolada de osteomielite: (A) Padrão misto de aderência dos tipos agregativo e difuso (AA/AD) (3h de incubação); (B) Presença de vacuolização e de inúmeras bactérias no compartimento intracitoplasmático (6h de incubação). Aumento 1000 x

bianos testados, apresentando resistência apenas à tetraciclina e a nitrofurantoína.

Padrão de aderência: Conforme ilustrado na Figura 2A, a amostra BR5015 foi capaz de interagir com a superfície de células HEp-2. Três horas após a infecção foram observadas bactérias distribuídas aleatoriamente na superfície celular e/ou agregadas à semelhança de tijolos empilhados, representando, portanto, um padrão misto de aderência dos tipos difuso (AD) e agregativo (AA), além de inúmeras bactérias aparentemente internalizadas. Na Figura 2B foram demonstradas alterações na morfologia das células hospedeiras e a presença de agregados bacterianos no interior de vacúolos frouxos (setas). Conforme o esperado para as amostras sacarose-negativas, *C. diphtheriae* subsp. *mitis* ATCC 27010 e 27012 utilizadas como controles apresentaram perfil de aderência do tipo difuso (AD) (dados não mostrados).

Tabela 1. Percentual (%) de associação (aderência e internalização) e de viabilidade intracelular em células HEp-2 da amostra atoxinogênica *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis* INCA5015 isolada de osteomielite (3 horas de incubação)

N° amostras <i>C. diphtheriae</i> / Biotipo	Gene tox	Perfil de aderência	% Associação	% Viabilidade intracelular
INCA5015/ Sacarose negativa	Ausente	AA-like	77,43 ± 12,25	11,13 ± 0,29
ATCC27010/ Sacarose negativa	Ausente	Difusa	82,41 ± 2,66	3,11 ± 2,66
ATCC27012/ Sacarose negativa	Presente	Difusa	79,74 ± 3,10	4,68 ± 0,31

Análise quantitativa da aderência, internalização e viabilidade intracelular: Os percentuais de bactérias viáveis associadas às monocamadas (extracelular + intracelular) e de bactérias presentes no compartimento intracelular estão apresentados na Tabela 1. A amostra BR5015 (77,43 ± 12,25) apresentou um percentual menor de bactérias viáveis em associação com as monocamadas de células HEp-2 do que as amostras controles atoxinogênica ATCC 27010 (82,41 ± 2,66) e toxinogênica ATCC 27012 (79,74 ± 3,10), provavelmente em decorrência de uma maior capacidade de internalização e de sobrevivência intracelular em células epiteliais humanas. O percentual de invasão foi aproximadamente 4 vezes maior para a amostra atoxinogênica BR5015 (11,13 ± 0,29) em relação à amostra controle atoxinogênica ATCC 27010 (3,11 ± 2,66).

DISCUSSÃO

Clones diversos de amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae* permanecem distribuídos mundialmente.⁽²⁸⁾ Entretanto, pouco é conhecido sobre a circulação nos diferentes continentes,^(12,29,30) e o potencial patogênico desses microrganismos.⁽⁸⁾ Ainda hoje podem ser observadas dificuldades de obtenção do diagnóstico clínico-laboratorial, até mesmo em casos de difteria, particularmente quando os pacientes estão parcialmente protegidos contra a ação da TD. O relato de casos desses quadros de infecção pelo *C. diphtheriae* com características diferentes das observadas nos casos de difteria clássica podem contribuir para que os clínicos e microbiologistas permaneçam atentos para o potencial patogênico do microrganismo de modo a não considerarem prontamente o isolamento desses bastonetes Gram-positivos a partir de sítios anatômicos como colonização dos tecidos ou contaminação dos espécimes clínicos.

Além de causar o quadro clínico de difteria clássica, *C. diphtheriae* tem sido considerado como o agente etiológico de infecções invasivas, como endocardite, bacteremia, osteomielite, artrite e infecções relacionadas ao uso de catéteres.^(24,27,31-34) Alguns autores concluíram que infecções invasivas causadas pelo *C. diphtheriae* possam ser mais frequentes do que o esperado.⁽³⁵⁾ Geralmente, os clones isolados

destas infecções são atoxinogênicos, o que tem despertado interesse acerca dos fatores de virulência apresentados por esta espécie além da TD.^(24,26,36-38) A pele é um importante reservatório desses microrganismos, principalmente nas regiões tropicais e/ou em populações que residem em condições de higiene e socioeconômicas desfavoráveis. Lesões cutâneas diversas parecem funcionar como a principal via de contaminação e penetração sistêmica do patógeno (38% to 50%).⁽³⁹⁾

Microrganismos corineformes foram isolados de culturas de osteomielite e considerados patogênicos nesses casos.⁽⁴⁰⁻⁴⁵⁾ Morrey e colaboradores enfatizaram a importância do estado de imunocomprometimento dos indivíduos na patogênese de infecções ósseas e articulares causadas pelas corinebactérias.⁽⁴²⁾ Na literatura disponível, foi observado um caso de osteomielite multifocal recorrente em paciente imunodeficiente relacionado com *Corynebacterium jeikeium*.^(43,46) Em uma caso de osteomielite vertebral em paciente imunocompetente, a disseminação de *Corynebacterium xerosis* pareceu ter sido um resultado direto de procedimento cirúrgico.⁽⁴⁷⁾

Independente da capacidade de produção de DT, foram descritos diversos casos de artrite relacionados com *C. diphtheriae*,^(32,37,48-50) porém apenas um caso de osteomielite foi encontrado na literatura disponível.⁽²⁵⁾ Naquela oportunidade, uma amostra fracamente produtora de TD foi isolada de aspirado ósseo oriundo de artrite séptica no quadril de criança imunocompetente que teve completo restabelecimento após ter sido submetida a procedimentos de drenagem cirúrgica e antibioticoterapia com pristinamicina.

No presente trabalho observou-se que o quadro de osteomielite ocorreu em paciente adulto com imunodeficiência em decorrência de câncer e dos respectivos tratamentos, residente em região de baixas condições de higiene e socioeconômicas. Além destes fatores que favorecem a transmissão do microrganismo e o desenvolvimento de quadros de osteomielite, conforme discutido acima, a paciente ainda havia sido submetida a cirurgia e a antibioticoterapia.

Além dos fatores ambientais e inerentes ao hospedeiro, gostaríamos de ressaltar alguns fatores microbianos que favorecem a patogenicidade de amostras atoxinogênicas *C. diphtheriae* nas doenças invasivas. Estudos anteriores sugeriram que apenas alguns clones de *C. diphtheriae* seriam capazes de expressar propriedades invasivas de modo a alcançarem a corrente sanguínea e causarem quadros fatais de endocardite.⁽¹²⁾ Posteriormente foi demonstrado que tanto as amostras pertencentes à subespécie *gravis*⁽⁵¹⁾ quanto à subespécie *mitis* poderiam causar infecções invasivas, assim como as amostras pertencentes ao biotipo fermentador de sacarose e ao biotipo não fermentador de sacarose.⁽³⁷⁾ Todo um grupo estudado de amostras invasoras expressou o padrão de aderência a células HEp-2 do tipo do tipo AA, diferente das amostras isoladas de difteria clássica sacarose-negativas e sacarose-positivas que exibiram predominantemente os padrões de aderência do tipo AD e do tipo AL, respectivamente.⁽³⁷⁾ Da mesma forma do que o observado no presente estudo, uma amostra recentemente isolada de sítio de inserção de catéter de nefrostomia de paciente com câncer apresentou perfil misto de aderência que incluía o tipo AA

e capacidade de formar biofilme em superfícies inertes sólidas.⁽²⁴⁾ A habilidade de produzir biofilme em superfícies inertes sólidas pode ter contribuído para a persistência de *C. diphtheriae* no ponto de infecção e obstrução do catéter ou na osteomielite.

A prevalência de *S. aureus* nas osteomielites está relacionada com a variedade de fatores de virulência, incluindo produtos secretados que causam danos ao hospedeiro e evasão do sistema imune além de fatores de adesão. Provavelmente, o fator mais importante no desenvolvimento da forma crônica da doença é sua capacidade de formar um biofilme. A formação de biofilme permite a evasão do sistema imune, bem como a resistência dos agentes antimicrobianos, de modo que a única maneira de tratar com êxito tais infecções é remover o tecido doente.⁽¹⁶⁾ Deste modo, estudos adicionais serão realizados no sentido de investigar a produção de biofilme pela amostra BR5015.

À semelhança de *S. aureus*, amostras de *C. diphtheriae* desprovidas de gene *tox* além de sobreviverem no citoplasma de células epiteliais e de macrófagos,^(26,52) também foram capazes de replicar no interior de macrófagos e induzir a morte celular por necrose e/ou apoptose,⁽⁵³⁾ de modo a favorecer disseminação sistêmica da infecção, através de lesões nos tecidos adjacentes ou rompimento da barreira hematogênica. A amostra BR5015 apresentou capacidade de internalização e sobrevivência no citoplasma de células epiteliais bastante elevada quando comparada com outras amostras testadas, sugerindo que apresenta uma maior capacidade de disseminar pelos tecidos e de se proteger mais eficientemente contra a ação de agentes antimicrobianos e do sistema imunológico.

A amostra BR5015 também foi capaz de expressar atividades enzimáticas tais como catalase, nitrato redutase e dnase. Enquanto a catalase é uma enzima que está relacionada à dissipação de radicais livres no ambiente e dentro das células, a possibilidade de reduzir nitrato a nitrito e a resistência das amostras ao nitrito tem sido apontada como fator importante quanto à sensibilidade microbiana às espécies reativas do nitrogênio. Os polimorfonucleares neutrófilos são capazes de produzir redes de DNA de células eucarióticas capazes tanto de limitar a viabilidade bacteriana, quanto reter os microrganismos em determinados sítios inflamatórios.⁽⁵⁴⁾ Uma vez que as redes de DNA produzidas por neutrófilos são sensíveis à atividade de dnase microbiana, os microrganismos dnase-positivos podem apresentar um mecanismo de escape da atividade antimicrobiana relacionada às redes de DNA.⁽⁵⁵⁾ Embora porfirinas possam exercer danos no sistema nervoso central, além de poderem acumular excessivamente, quer no fígado quer nos eritrócitos, dentre as bactérias⁽⁵⁶⁾ ainda não foram claramente definidos os efeitos de produção de porfirina no hospedeiro pelo *C. diphtheriae*.

Mecanismos diversos de aderência estão envolvidos no processo infeccioso de estafilococos. A habilidade dos estafilococos aderirem aos componentes de matriz extracelular (ECM) é reconhecida como uma etapa importante nas etapas iniciais do processo infeccioso. Enquanto as adesinas capa-

zes de interagir com fibronectina são importantes no estabelecimento de endocardites, as adesinas capazes de interagir com colágeno favorecem o desenvolvimento de artrite séptica.⁽⁵⁷⁾ Adesinas capazes de interagir com fibrinogênio são importantes na patogênicidade da osteomielite.

Estudos anteriores demonstraram a capacidade de amostras de *C. diphtheriae* interagirem com fibronectina e fibrinogênio.⁽³⁸⁾ A habilidade de amostras atoxinogênicas de interagir com o fibrinogênio e também de formar rede de fibrina pode contribuir para a persistência de *C. diphtheriae* não só no ponto de infecção e obstrução de catéter,⁽²⁴⁾ mas também nas osteomielites.

À semelhança dos estafilococos, amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae* exibem mecanismos diversos de aderência que parecem estar envolvidos no desenvolvimento de processos infecciosos diversos.

Deste modo, clínicos e microbiologistas devem permanecer atentos ao potencial patogênico de amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae*, mesmo quando em associação com outros patógenos como *S. aureus*, e a possibilidade de causarem infecções invasivas de origens diversas, inclusive quadros de osteomielite em pacientes imunocomprometidos.

AGRADECIMENTOS

*Apoio financeiro da Capes, Faperj, CNPq, SR-2/Uerj, INCa-RJ e Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD (Capes/MEC) e PAPD (Faperj/Capes).

REFERÊNCIAS

- Baseman JB, Pappenheimer AM Jr, Gill DM, Harper AA. Action of diphtheria toxin in the guinea pig. *J Exp Med*. 1970;132(6):1138-52.
- Macambira RP, Formiga LB, Formiga LCD. Difteria: o grave prognóstico brasileiro. *J Brás Med*. 1994;66: 69-81.
- Beavis KG, Weymouth LA. Cellular and molecular pathology of infectious diseases. In: Alfonse E. *Sirica Ed.: Cellular and molecular pathogenesis*, 219-244. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA, 1996.
- Cerdeño-Tárraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M, Bentley SD, et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(22):6516-23.
- Salyers AA, Whitt DD. Diphtheria. In: *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. American Society for Microbiology. Washington, DC. 113-121, 1994.
- Hadfield TL, Mcevoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA, Yakovlev AA. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis*. 2000;181(Suppl 1):S116-20.
- Kadirova R, Kartoglu HÜ, Strelbel PM. Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, 1995. *J Infect Dis*. 2000;181 Suppl 1:S110-5.
- Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Júnior R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world - an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(8):987-93.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC, Andrade AF. Trans-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1998;168(2):167-72.
- Riegel P. Bacteriological and clinical aspects of corynebacterium. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1998 May-Jun;56(3):285-96. [Article in French].
- Buzzi S, Sala G. Immunity to diphtheria in advanced cancer patients. *Ateneo Parmense Acta Biomed*. 1980;51(2):113-6. Italian.
- Patey O, Bimet F, Riegel P, Halioua B, Emond JP, Estrangin E, Dellion S, Alonso JM, Kiredjian M, Dublanquet A, Lafaix C. Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. *Coryne Study Group*. *J Clin Microbiol*. 1997;35(2):441-5.
- Patey O, Dellion S. Diphtheria and infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* in 1997. *Rev Med Interne*. 1999;20(1):39-49. French.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC, Camello TC, Pereira GA, Hirata R Jr, Halpern M. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev Argent Microbiol*. 2001;33(2):96-100.
- Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Santos LS, Gomes DLR, Santos CS, et al. *Corynebacterium diphtheriae* um patógeno negligenciado: Elevada incidência de infecções por amostras toxigenicas em hospital especializado em tratamento de câncer. *Microbiologia in foco*. 2009;9: 102.
- Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52(1):13-22.
- Weiner RD, Viselli SJ, Fulkert KA, Accetta P. Histology versus microbiology for accuracy in identification of osteomyelitis in the diabetic foot. *J Foot Ankle Surg*. 2011;50(2):197-200.
- Batalla AS, de La Blanchardière A, Vergnaud M, Dargère S, Verdon R. Recurrent *Corynebacterium striatum* endocarditis, secondary to osteomyelitis. *Med Mal Infect*. 2011;41(3):160-3.
- Formiga LC, Mattos-Guaraldi AL. Diphtheria: current status and laboratory procedures for diagnosis. *Rev Bras Patol Clin*. 1993; 29:93-6.
- Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, Glushkevich T, Vuoppio-Varkila J, Popovic T. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. *J Infect Dis*. 2000;181(Suppl 1):S138-45.
- Camello TC, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC, Marques EA. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2003; 34:39-44.
- Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata R Jr, Camello TC, Mattos-Guaraldi AL. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(3):307-11.
- Martínez-Martínez L, Ortega MC, Suárez AI. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1318-21.
- Gomes DL, Martins CA, Faria LM, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol*. 2009;58 (Pt 11):1419-2.
- Pimenta FP, Hirata R Jr, Rosa AC, Milagres LG, Mattos-Guaraldi AL. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxicogenic and toxicogenic isolates. *J Med Microbiol*. 2008 Nov;57(Pt 11):1438-9.
- Hirata R, Napoleão F, Monteiro-Leal LH, Andrade AF, Nagao PE, Formiga LC, et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEP-2 cell. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;215(1):115-9.
- Hirata R Jr, Souza SM, Rocha-de-Souza CM, Andrade AF, Monteiro-Leal LH, Formiga LC, et al. Patterns of adherence to HEP-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microb Pathog*. 2004;36(3):125-30.
- Wilson AP. The return of *Corynebacterium diphtheriae*: the rise of non-toxicogenic strains. *J Hosp Infect*. 1995;30 Suppl:306-12
- Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. An outbreak of nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. *Clin Infect Dis*. 1998;27(5):1295-8.
- Viguetti SZ, Pacheco LG, Santos LS, Soares SC, Bolt F, Baldwin A, et al. Multilocus sequence typing of invasive *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Brazil. *Epidemiol Infect*. 2012;140(4):617-20.
- Poilane I, Fawaz F, Nathanson M, Cruaud P, Martin T, Collignon A, et al. *Corynebacterium diphtheriae* osteomyelitis in an immunocompetent child: a case report. *Eur J Pediatr*. 1995;154(5):381-3.
- Faraj S, French JG, McAuslan A. Septic arthritis due to a toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* gravis. *N Z Med J*. 2003;116(1172):U404.
- Zasada AA, Zaleska M, Podlasin RB, Seferynska I. The first case of septicemia due to nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005;4:8.
- Belmares J, Dettlerline S, Pak JB, Parada JP. *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infect Dis*. 2007;7:4.
- Mishra B, Dignan RJ, Hughes CF, Hendel N. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis - surgery for some but not all! *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2005;13(2):119-26.
- Mattos-Guaraldi AL, Duarte Formiga LC, Pereira GA. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes Infect*. 2000 Oct;2(12):1507-12.
- Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DL, Damasco PV, Rosa AC, et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(11):986-91.

38. Sabbadini PS, Genovez MR, Silva CF, Adelino TL, Santos CS, Pereira GA, et al. Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(5):706-11.
39. Halioua B, Patey O, Casciani D, Emond JP, Dublanquet A, Malkin JE, et al. Cutaneous diphtheria in a patient with HIV infection. *Ann Dermatol Venereol*. 1992;119(11):874-7. [Article in French].
40. Newman JH, Mitchell RG. Diphtheroid infection of the cervical spine. *Acta Orthop Scand*. 1975;46(1):67-70.
41. Ceilley RI. Foot ulceration and vertebral osteomyelitis with *Corynebacterium haemolyticum*. *Arch Dermatol*. 1977;113(5):646-7.
42. Morrey BF, Fitzgerald RH, Kelly PJ, Dobyns JH, Washington JA 2nd. - Diphtheroid osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am*. 1977;59(4):527-30.
43. Farnam J, Griffin JE, Schow CE, Mader JT, Grant JA. Recurrent diffuse osteomyelitis involving the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984;57(4):374-8.
44. Noble RC, Overman SB. *Propionibacterium acnes* osteomyelitis: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol*. 1987;25(2):251-4.
45. Wilson IF, Candia GJ, Worthington MG, Sullivan JG. Chronic osteomyelitis due to corynebacteria in a postcraniotomy bone flap. *Clin Infect Dis*. 1999;28(6):1323-4.
46. Ordóñez-Palau S, Boquet D, Gil-García M, Pardina-Solano M. Chronic osteomyelitis of the metatarsal sesamoid due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2007;74(5):516-7.
47. Krish G, Beaver W, Sarubbi F, Verghese A. *Corynebacterium xerosis* as a cause of vertebral osteomyelitis. *J Clin Microbiol*. 1989;27(12):2869-70.
48. Guran P, Mollaret HH, Chatelain R, Gropman M, Prigent F, Béal G. Septic arthritis due to a nontoxigenic diphtheria bacillus. *Arch Fr Pediatr*. 1979;36(9):926-9. [Article in French].
49. Barakett V, Morel G, Lesage D, Petit JC. Septic arthritis due to a nontoxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* subspecies *mitis*. *Clin Infect Dis*. 1993;17(3):520-1.
50. Damade R, Pouchot J, Delacroix I, Boussougant Y, Vinceneux P. Septic arthritis due to *Corynebacterium diphtheriae*. *Clin Infect Dis*. 1993;16(3):446-7.
51. Hogg GG, Strachan JE, Huayi L, Beaton SA, Robinson PM, Taylor K. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biovar *gravis*: evidence for an invasive clone in a south-eastern Australian community. *Med J Aust*. 1996;164(2):72-5.
52. Bertuccini L, Baldassarri L, von Hunolstein C. Internalization of non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microb Pathog*. 2004;37(3):111-8.
53. dos Santos CS, dos Santos LS, de Souza MC, dos Santos Dourado F, de Souza de Oliveira Dias AA, Sabbadini PS, et al. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiol Immunol*. 2010;54(1):1-10.
54. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
55. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21.
56. Doss M, Philipp-Dormston WK. Excretion of porphyrins by bacteria. *Experientia*. 1971;27(4):376-7.
57. Tung H, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Rydén C. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J*. 2000;345 Pt 3:611-9.

Autor correspondente

Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Centro Colaborador para Difteria da CGLAB/SVS/MS

Disciplina de Microbiologia e Imunologia,

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Av 28 de Setembro, 87 fundos, 3º andar - Vila Isabel

20551-030 – Rio de Janeiro, RJ

Tel: +55 21 2868-8376 Fax:+55 21 2868-8280

Atividade antifúngica das folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* frente a *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*

Antifungal activity of the leaves of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*

Tatiane Vieira Braga¹, Juliana Tensol Pinto², Maria Elisabete da Silva Barros³, Tânia Toledo de Oliveira⁴, Rosana Gonçalves Rodrigues das Dores⁵, Tanus Jorge Nagem⁵

Resumo: A espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* é conhecida como "Insulina vegetal" e utilizada na medicina popular no tratamento da *diabetes mellitus*. O paciente diabético tem maior risco de infecções urinárias e *Candida* spp. é o principal gênero envolvido. Avaliou-se a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico e de suas frações frente a *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750. Os resultados obtidos indicaram que folhas de *C. verticillata verticillata* têm potencial antifúngico promissor nas frações diclorometano e clorofórmio, com concentração inibitória mínima de 125 µg/mL em *C. krusei* e em *C. tropicalis* respectivamente. São necessários novos testes com constituintes químicos isolados dessas frações, buscando atividade superior na inibição do crescimento de *Candida* spp.

Palavras-chave: *Candida* spp; *Cissus verticillata*; Atividade antifúngica

Abstract: The specie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* is known as "Vegetable insulin" and is used in popular medicine for the treatment of *diabetes mellitus*. The diabetic patient has a greater risk of urinary infections, and *Candida* spp. is the main gender involved. Was evaluated, the antifungal activity of the hydroalcoholic extract and its fractions against *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida tropicalis* ATCC 750. The results indicated that leaves of *C. verticillata verticillata* has promising potential antifungal in fractions diclorometano and chloroform, with minimum inhibitory concentration of 125 µg/mL in *C. krusei* and *C. tropicalis* respectively. We need new tests with chemical constituents of these fractions isolated, seeking higher activity in inhibiting the growth of *Candida* spp.

Keywords: *Candida* spp; *Cissus verticillata*; Antifungal activity

INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* é conhecida popularmente como insulina vegetal⁽¹⁾ cortina japonesa, cipó-pucá⁽²⁾ e anil trepador,⁽³⁻⁵⁾ O chá das folhas é utilizado na medicina popular no tratamento da *diabetes mellitus*.⁽²⁾ A *diabetes mellitus* atinge cerca de 177 milhões de pessoas no mundo e estima-se que este número deverá dobrar até 2030. Aproximadamente 4 milhões de mortes ao ano são atribuíveis às complicações da diabetes e os custos em atenção ao paciente diabético variam de 2,5% a 15% dos orçamentos anuais de saúde. O Brasil está entre os dez países com maior número de pacientes diabéticos segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, 2003.⁽⁶⁾

O paciente com *diabetes mellitus* tem maior risco de infecções urinárias e *Candida* spp. é o principal gênero envol-

vido. Dentre as espécies desse gênero, *Candida albicans* é a principal responsável pelas infecções fúngicas.⁽⁷⁾ Existem outras espécies inseridas no gênero *Candida* como *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, que também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase.⁽⁸⁾

As infecções oportunistas em Dermatologia, nos países desenvolvidos (tropicais e subtropicais) têm como patógenos mais frequentes fungos dermatófitos e a levedura *Candida* spp.⁽⁹⁾

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento e, considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados,⁽⁸⁾ torna-se importante a busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal que possam auxiliar a terapêutica.

¹Mestre em Ciências Farmacêuticas, CiPharma, Universidade Federal de Ouro Preto

²Graduanda em Farmácia, bolsista de Iniciação Científica, Universidade Federal de Ouro Preto

³Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa

⁵Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, identificação do material vegetal, preparação e fracionamento do extrato

As folhas de *C. verticillata verticillata* utilizadas no estudo foram coletadas no bairro Antônio Dias, Ouro Preto, Minas Gerais, no mês de julho de 2007, no período da manhã. Confeccionou-se exsiccata, que foi identificada pelo especialista Dr. Julio Antônio Lombardi, da Unesp, Rio Claro, e depositada no Herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (Oupr 20570).

As folhas coletadas foram selecionadas, passadas em água corrente, dispostas em papel absorvente a fim de retirar o excesso de água e posteriormente colocadas em estufa com ventilação forçada, Fabbe modelo 171, a 45°C, até peso constante.

O extrato vegetal hidroalcoólico das folhas (EHA) foi preparado por meio do método de remaceração.⁽¹⁰⁾ As folhas secas de *C. verticillata verticillata* foram deixadas em repouso direto em solvente água/etanol 1:1 por 72 horas. Após esse período filtrou-se o extrato em gaze. O procedimento foi realizado repetidas vezes até a extração do material vegetal.

O EHA foi seco em evaporador rotatório (Buchi, R114, Suíça) à pressão reduzida, até consistência resinosa. Posteriormente foi seco em liofilizador (Metal-Lux, Divisão de vácuo, Brasil), até a obtenção do liofilizado.

O EHA foi fracionado através de partição líquido-líquido (Figura 1). Dessa forma, dissolveu-se o EHA em água destilada, uma parte do extrato foi insolúvel em água, formando o precipitado 1 (P1). Com fase aquosa iniciou-se a partição utilizando-se os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, formando respectivamente as frações FH, FD, FC e FA (Figura 1).

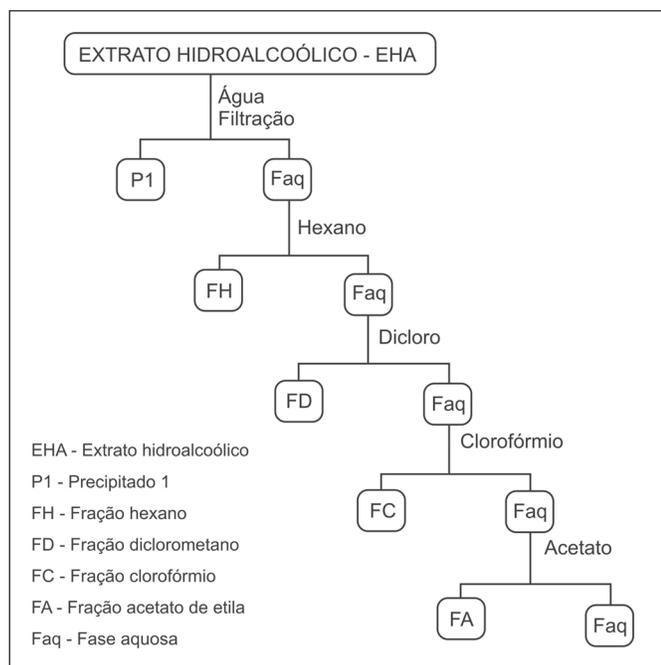


Figura 1 - Esquema do fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*

Preparo das amostras

O EHA, P1, e as frações FH, FD, FC e FA constituíram as amostras de análise. Mentol (M) e os antifúngicos cetoconazol (Janssen-Cilag) e fluconazol (Pfizer) os controles de referência.^(11,12)

Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO (Merck), na concentração de 1% do volume da solução mãe, à exceção do fluconazol que foi diluído em água destilada esterilizada. A partir dessas soluções foi procedida a preparação de diluições seriadas das amostras em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) conforme a metodologia empregada (Clinical Laboratory Standards Institute CLSI - documento M27-A3).⁽¹³⁾

As concentrações testadas corresponderam às faixas intervalares entre 1 a 512 µg/mL para amostras e mentol; 0,015 a 8 µg/mL para cetoconazol e 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol.

Microorganismos utilizados e preparação dos inóculos

Foram utilizadas as espécies *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750 pertencentes ao Laboratório de Micologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

No crescimento e manutenção das culturas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi utilizado o meio Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai - Índia).

As amostras de *Candida* spp. foram cultivadas em tubos contendo meio Sabouraud sólido e incubadas a 28°C durante 24 horas. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente com alça esterilizada e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado com cerca de 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), equivalente a escala de turvação 0,5 da escala MacFarland.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada segundo protocolo M27-A3 do CLSI, em microplacas com 96 poços. Em cada orifício foram dispensados 100 µL da amostra teste e 100 µL do inóculo de cada espécie de *Candida* spp., perfazendo volume final de 200 µL em cada poço. Todas as concentrações foram testadas em duplicata. As placas foram incubadas a 28°C e as leituras foram realizadas após 48 horas.

As CIMs foram obtidas por leitura visual e expressas em redução de crescimento, comparadas ao controle positivo, sendo de 80% em fluconazol e cetoconazol e 100% no mentol^(11,12) e nas amostras.⁽¹⁴⁾

RESULTADOS

O extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *C. verticillata verticillata*, o precipitado 1 (P1), a fração diclorometano (FD), clorofórmio (FC), acetato de etila (FA) e o mentol (M) inibiram o crescimento fúngico conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima do extrato hidroalcoólico e frações de *C. verticillata verticillata* pelo método de microdiluição em placa.

Microorganismos	ATCC	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)							
		EHA	P1	FD	FC	FA	M	Flu	Ceto
<i>C. albicans</i>	18804	256	256	256	256	256	256	2	0,25
<i>C. krusei</i>	6258	256	512	125	256	256	125	4	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	22019	256	512	256	256	256	256	4	0,25
<i>C. tropicalis</i>	750	256	512	256	125	256	256	> 64	4

EHA = Extrato hidroalcoólico; P1 = Precipitado 1; FD = Fração diclorometano; FC = Fração clorofórmio; FA = Fração acetato; M = Mentol; Flu = Fluconazol; Ceto = Cetoconazol

DISCUSSÃO

Dentre as amostras testadas pelo método de microdiluição em placa, as frações FD e FC tiveram os resultados mais significativos com CIM de 125 µg/mL em *C. krusei* e em *C. tropicalis* respectivamente. O perfil de inibição do crescimento da FD foi igual ao perfil de inibição do mentol, sendo a CIM de 256 µg/mL em *C. albicans*, 125 µg/mL em *C. krusei*, 256 µg/mL em *C. parapsilosis* e 256 µg/mL em *C. tropicalis*.

Segundo Pereira et al.,⁽¹⁵⁾ o mentol promoveu inibição do desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* nas concentrações 1500 e 2000 mg/mL, respectivamente. A atividade antimicrobiana do mentol parece estar associada ao caráter lipofílico.⁽⁹⁾

No estudo de Silva et al.,⁽¹⁶⁾ atividade antifúngica de *C. verticillata* foi relatada nas frações clorofórmio e acetato de etila que continham respectivamente o sesquiterpenoide biciclogermacreno e resveratrol (3, 4', 5 trihidroxiestilbeno). Outros compostos como os flavonoides kaempferol, quercetina e luteolina foram identificados em folhas de *C. sicyoides*.⁽²⁾

No entanto, na fração acetato de etila (FA), a CIM em *Candida* spp não superou as expectativas, embora sejam detectados nessa fração os compostos fenólicos, flavonoides e taninos.

A fração acetato de etila das folhas da espécie *Pyrostegia venusta* inibiu o crescimento de *Candida albicans* na concentração de 300 µg/mL. Detectaram-se em tal espécie flavonoides e compostos fenólicos.⁽¹⁷⁾ O extrato das folhas de *Baccharis dracunculifolia* também inibiu o crescimento de *Candida krusei* na concentração de 65 µg/mL.⁽¹⁸⁾ O extrato aquoso de *Serjania erecta* teve atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* com CIM de 62,5 µg/mL. A atividade antifúngica deve-se provavelmente à presença de flavonoides no extrato.⁽¹⁹⁾

Não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável nos produtos naturais quando comparados com antifúngicos padrões; dessa forma, Aliqianis et al.⁽²⁰⁾ propuseram a classificação dos materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como forte inibição a CIM até 500 µg/mL; inibição moderada a CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição a CIM acima de 1600 µg/mL.

No trabalho de Magina et al.⁽²¹⁾ foram considerados ativos os extratos de *Eugenias* sp. com CIM menor que 1000 µg/mL, e muito ativos os extratos com CIM inferior a 100 µg/mL. Dessa

forma, nas amostras testadas, as CIMs foram todas inferiores a 512 µg/mL, podendo portanto, serem consideradas ativas.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo indicaram que folhas de *C. verticillata verticillata* têm potencial antifúngico promissor nas frações diclorometano e clorofórmio. São necessários novos testes com constituintes químicos isolados dessas frações, buscando atividade superior na inibição do crescimento de *Candida* spp.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Ouro Preto, CNPq e Fapemig pelo subsídio concedido.

REFERÊNCIAS

- Oliveira AB. *Cissus verticillata* (VITACEAE): Informações etnofarmacológicas e anatomia dos órgãos vegetativos. Viçosa, MG: UFV, 2006, 75p. (tese).
- Barbosa WL, Santos WR, Pinto L N, Tavares IC. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002;12: supl., p.13-15.
- Beltrame FL, Sartoretto JL, Bazotte RB, Cuman RN, Cortez DA. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial anti-diabético de *Cissus sicyoides* L. (VITACEAE). Química Nova. 2001;6:783-5.
- Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.
- Organização Pan-Americana de Saúde. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília, 2003. Disponível em http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf. Acesso: dezembro 2006.
- Schedhter M, Guimarães-Walker AP. Diabetes mellitus e doenças infecciosas. In: Oliveira JE, Milech A. Diabetes mellitus - clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. Cap.17, p.199-215.
- Lima IO, Oliveira RA, Lima EO, Farias NM, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2006;16(2):197-201.
- Duarte MC. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. MultiCiência, v. 7, 2006.
- Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões C. M, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JC, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5a. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. Cap.13, p. 289-326.
- Matos BM, Komiya EY, Balducci I, Koga-Ito CY. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Revista de Odontologia da UNESP. 2009;38(4):244-8.
- Sabzghabae AM, Nili F, Ghannadi A, Eizadi-Mood N, Anvari M. Role of menthol in treatment of candidal napkin dermatitis. World J Pediatr. 2011; 7(2):167-70.
- CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute, Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, 2008.
- Gupta AK, Kohli Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and intraconazole against dermatophytes and non-dermatophytes, and evaluation of combination antifungal activity. Br J Dermatol. 2003;149(2):296-305.
- Pereira MC, Vilela GR, Costa LM, Silva RF, Fernandes AF, Fonseca EW, Piccoli RH. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. Ciência Agrotecnica. 2006;30(4): 731-8.
- Silva L, Oniki GH, Agripino DG, Moreno PR, Young MC, Mayworm, MA, Ladeira AM. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007;17(3): 361-7.

17. Silva PB, Gregol AFO, Medeiros AC, Duarte MC, Santos C. Antimicrobial activity of extracts from *Pyrostegia venusta*. In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.
18. Silva Filho A A, Resende DO, Fukui MJ, Furtado NA, Silva ML, Cunha WR, Sousa JP, Gregorio LE. Phytochemical study and comparative evaluation of the in vitro antimicrobial activity of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and Brazilian green propolis. In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.
19. Oliveira PV, Fachin AP, Rosseti ES, França SC, Pietro RC, Fusco-Almeida AM, Pereira PS. Antifungal activity of *Serjania erecta* Radlk. In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.
20. Aligianis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem.* 2001;49(9):4168-70.
21. Magina MD, Johann S, Resende MA, Pizzolatti MG, Brighente IM. Antifungal activity of three *Eugenia* species. In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.

Autor correspondente

Tatiane Vieira Braga

Centro de Saúde, Campos Universitário Morro do Cruzeiro,
Universidade Federal de Ouro Preto, s/n
35400-000 – Ouro Preto, MG, Brasil
e-mail: tativbr@yahoo.com.br

Atividade *in vitro* da tigeciclina frente aos isolados de *Acinetobacter baumannii* no Hospital Júlia Kubitschek da Fundação Hospitalar de Minas Gerais

In vitro activity of tigecycline against *Acinetobacter baumannii* isolates in Hospital Júlia Kubitschek of Minas Gerais Hospital Foundation

Valéria Martins Soares¹, Giselle Cristina Dominguete Carvalho¹

Resumo: *Acinetobacter baumannii*, importante patógeno nosocomial, pode ser difícil de ser tratado devido à resistência a várias classes de antimicrobianos, evidenciando a necessidade do uso de drogas de novas classes terapêuticas para estes micro-organismos. A tigeciclina, uma nova gliciliciclina, tem um amplo espectro de ação, incluindo *Acinetobacter baumannii*. O objetivo deste estudo foi verificar a atividade da tigeciclina contra cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas entre setembro de 2008 a maio de 2009 de pacientes internados no Hospital Júlia Kubitschek. Os testes de sensibilidade pelo método de disco difusão foram realizados de acordo com metodologia padronizada pelo CLSI. Com relação ao perfil de resistência, foi observado que a maioria das cepas de *Acinetobacter baumannii* eram multirresistentes e a tigeciclina apresentou atividade *in vitro* contra todas estas cepas.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; Antimicrobianos; Resistência

Abstract: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen, can be problematic to treat due to resistance to multiple classes of antibiotics, further highlighting the need for new therapeutic agents effective against this organism. Tigecycline, a novel glycylicycline, has a broad spectrum of activity which includes *Acinetobacter baumannii*. The aim of this study was to verify the tigecycline activity profile against *A. baumannii* isolated between September 2008- May 2009 from patients interned in Hospital Júlia Kubitschek. To perform the assay, disk diffusion susceptibility testing was performed according to the CLSI guidelines. Regarding the profile of resistance, it was observed that the majority of the strains of *Acinetobacter baumannii* were multiresistant and tigecycline were active *in vitro* against all of this strains

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Antimicrobials; Resistance

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Acinetobacter spp* são caracterizadas por serem bacilos Gram negativos, não fermentadores de glicose, causadores de uma grande variedade de infecções nosocomiais. No passado foi considerado de baixa virulência, porém, agora, é reconhecido como um importante patógeno hospitalar, afetando principalmente pacientes criticamente doentes em unidades de tratamento intensivo. *Acinetobacter baumannii* é capaz de sobreviver por longos períodos em superfícies secas e esta habilidade para tolerar dissecação, bem como desenvolver resistência a múltiplas drogas, pode contribuir para sua permanência no cenário hospitalar.⁽¹⁾ Apesar de não serem constituintes da microbiota usual humana, sua prevalência aumentada no ambiente hospitalar resulta na colonização da pele e do trato respiratório.⁽²⁾

A resistência do *Acinetobacter spp* às cefalosporinas, aminoglicosídeos e ciprofloxacina estão disseminadas, porém os carbapenêmicos, colistina, sulbactam e minociclina permanecem efetivos em cerca de 80% das cepas.⁽³⁾

As infecções nosocomiais causadas pelo *Acinetobacter baumannii* geralmente são de difícil tratamento devido aos diversos mecanismos de resistência.⁽⁴⁾ A multirresistência entre o *Acinetobacter baumannii* é um problema emergente em muitos hospitais.⁽⁵⁾ Os carbapenêmicos exerciam um papel importante no manejo de infecções severas causadas pelo *Acinetobacter baumannii*.⁽⁴⁾ No entanto, o isolamento de cepas resistentes aos carbapenêmicos tem sido cada vez mais frequente devido à produção de enzimas beta-lactamases pertencentes às classes D e B de Ambler.⁽⁶⁾

As metallo-beta-lactamases (MBLs) têm sido reportadas com maior frequência em todo o mundo, sendo uma das principais causas de resistência aos carbapenêmicos. Outro mecanismo de resistência do *Acinetobacter baumannii* aos carbapenêmicos que tem sido reportado com bastante frequência é a produção de carbapenemases do tipo OXA.⁽⁷⁾

A tigeciclina é uma nova droga da classe das gliciliclinas para uso intravenoso. Possui um amplo espectro de ação, incluindo micro-organismos multirresistentes como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Streptococcus pneumoniae*, bacilos Gram negativos produtores de enzimas

Trabalho realizado no setor de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Júlia Kubitschek da Fundação Hospitalar de Minas Gerais

¹Farmacêutica Bioquímica do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Júlia Kubitschek

beta-lactamases de espectro ampliado e *Acinetobacter baumannii*. No entanto não é ativa contra espécies de *Proteus* spp, *Providencia* spp e *Pseudomonas aeruginosa*.⁽⁸⁾

O desenvolvimento da tigeciclina é importante porque a tigeciclina e outras gliciliclinas são ativas contra cepas bacterianas que possuem um ou ambas das duas principais formas de resistência às tetraciclina: bombas de efluxo e proteção ribossomal. Além disso, a resistência a tigeciclina é pouco frequente e difícil de ser induzida mesmo em laboratório.⁽⁹⁾

A tigeciclina é bacteriostática contra a maioria das cepas suscetíveis. Exerce sua ação unindo-se à subunidade 30s do ribossomo bacteriano, inibindo a tradução da síntese proteica. Foi aprovada para o tratamento de infecções moderadas e severas de pele e tecidos moles e infecções intra-abdominais complicadas, porém seu espectro de ação permite pensar no seu uso potencial no tratamento de pneumonias hospitalares adquiridas, pneumonias associadas à ventilação mecânica e infecções associadas a catéteres.⁽¹⁰⁾

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 88 cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas de pacientes internados no Hospital Júlia Kubitschek, um hospital geral de grande porte, entre setembro de 2008 e maio de 2009. Neste estudo foram considerados mais de um isolado por paciente, sendo que o número total de pacientes foi 58. A inclusão dos isolados foi independente do histórico médico, uso de antimicrobiano, idade e gênero.

O isolamento das cepas bacterianas foi realizado através de meios de cultura apropriados para cada tipo de amostra. As bactérias isoladas foram identificadas com base na morfologia ao Gram, crescimento a 42° C, ágar OF (oxidativo-fermentativo) e crescimento em meio SIM (Motilidade, Indol, H₂S). Os testes de sensibilidade foram realizados através do método de disco difusão.⁽¹¹⁾ segundo padronização do Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI.⁽¹²⁾ Os antimicrobianos padronizados no hospital e utilizados no antibiograma para *Acinetobacter baumannii* foram: imipenem, meropenem, ceftazidime, cefepime, ampicilina/sulbactam, ciprofloxacina, gentamicina e amicacina. Os discos de tigeciclina de 15 mcg foram fornecidos pela Wyeth Pharmaceuticals (Collegeville, PA, USA) e incluídos no antibiograma rotineiramente realizado, sem haver a liberação do resultado no laudo final.

O Food and Drug Administration – FDA e o CLSI ainda não têm critérios interpretativos para *Acinetobacter* spp., sendo sugerida a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) para resultados com zona de inibição menores que 19 mm. A ausência de ponto de corte não significa necessariamente ausência de atividade *in vitro*, que pode ser avaliada através do MIC (Concentração inibitória mínima).

Devido à falta de critérios interpretativos, alguns autores utilizam os pontos de corte de Enterobactérias para interpretar dados de *Acinetobacter* spp. Jones et al.⁽¹³⁾ sugerem que para *Acinetobacter* spp. halos maiores ou iguais a 16 mm têm melhor correlação com o MIC de 2 mcg/ml.

Assim, as cepas que apresentaram halos de inibição menores que 16 mm foram encaminhadas para a Wieth, através de meio de transporte Stuart, para determinação da concentração inibitória mínima.

RESULTADOS

No período de setembro de 2008 a maio de 2009 foram isoladas 88 cepas de *Acinetobacter baumannii* provenientes de diversas amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Júlia Kubitschek.

Os sítios de infecção analisados foram: Ponta de catéter (42%), sangue (17%), lavado bronco alveolar (21,6%), urina (7,9%), lesão de membro inferior (2,8%), escara infectada (2,8%), escarro (3,4%), líquido pleural (1,1%) e secreção abdominal (1,1%).

A Figura 1 mostra a frequência de *Acinetobacter baumannii* por local de internação do paciente no Hospital Júlia Kubitschek. A unidade que apresentou maior número de isolamentos de *Acinetobacter baumannii* foi o Centro de Tratamento intensivo (CTI) com 73% dos casos.

A Tabela 1 apresenta o perfil de resistência (% de cepas resistentes) aos antimicrobianos das cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas no período deste estudo. Observa-se que as cepas de *Acinetobacter baumannii* foram bastante resistentes aos antimicrobianos testados, como as cefalosporinas (cefepime 97,7% e ceftazidime 88,6%), ampicilina/sulbactam

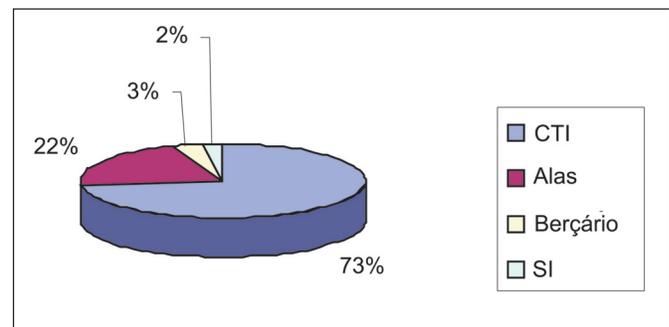


Figura 1 – Frequência de *Acinetobacter baumannii* por local de internação do paciente no Hospital Júlia Kubitschek (SI: Unidade de terapia semi-intensiva).

Tabela 1- Perfil de resistência (%) de *Acinetobacter baumannii* isolados no Hospital Júlia Kubitschek no período de setembro de 2008 a maio de 2009

Antimicrobiano	Perfil de resistência (%)
Amicacina	81,1
Ampicilina/sulbactam	82,9
Ceftazidime	88,6
Cefepime	97,7
Ciprofloxacina	90,9
Gentamicina	75
Imipenem	84
Meropenem	84
Tigeciclina	0

(82,9%), amicacina (81,1%), ciprofloxacina (90,9%), gentamicina (75%). Ressalta-se a grande porcentagem de cepas resistentes ao imipenem e meropenem (84%).

Das 88 cepas isoladas, 81 apresentaram halos de inibição maiores ou igual a 16 mm e sete apresentaram halos de inibição menores que 16 mm, sendo encaminhadas para a realização do MIC, que apresentou resultados menores ou iguais a 2, sendo consideradas sensíveis a tigeciclina. Assim, houve 100% de atividade *in vitro* da tigeciclina contra as cepas analisadas.

DISCUSSÃO

A espécie *Acinetobacter baumannii* apresenta uma grande propensão para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana extremamente rápida e múltipla, causando sérios problemas terapêuticos.

O uso de agentes antimicrobianos é considerado um fator de predisposição para a emergência de bactérias resistentes. Práticas em Centros de Tratamento intensivo contribuem para o desenvolvimento de resistência porque o uso de antimicrobianos por paciente e por área de superfície é significativamente mais alto nesta parte do hospital.⁽¹⁾ No Hospital Júlia Kubitschek verificou-se a maior prevalência de *Acinetobacter baumannii* no Centro de Tratamento Intensivo (73%), de acordo com a Figura 1.

A suscetibilidade do *A. baumannii* a antimicrobianos é consideravelmente diferente entre países, centros e até setores de um hospital. As diferenças de padrões de resistência em amostras enfatizam a importância de investigações locais para determinar a terapia mais adequada para infecções por *Acinetobacter baumannii*.⁽¹⁾

Infecções secundárias causadas pelo *Acinetobacter spp* representam atualmente um desafio com o aumento da resistência bacteriana em todo o mundo. Os carbapenêmicos exerciam um papel fundamental no manejo de infecções severas por *Acinetobacter baumannii*. No entanto, relatos de resistência aos carbapenêmicos têm aumentado bastante devido à produção de carbapenemases. Como consequência, infecções causadas por cepas exibindo resistência aos carbapenens e até polimixina estão sendo regularmente observadas.

As metallo-beta-lactamases (MBLs) têm sido descritas cada vez mais em vários países pelo mundo e estão se tornando o mais prevalente e significativo mecanismo de resistência aos carbapenêmicos. Atualmente, MBLs são frequentemente encontradas em *Acinetobacter baumannii* e se disseminam facilmente em plasmídeos causando infecções nosocomiais e surtos com alta mortalidade.⁽¹⁴⁾ Além disso, a produção de carbapenemases do tipo OXA, classe D de Ambler, tem também sido regularmente descrita como mecanismo de resistência codificado em plasmídeos.⁽⁷⁾

O que mais chamou a atenção neste estudo foi a alta porcentagem de cepas que apresentaram resistência ao imipenem (84%) e meropenem (84%), sendo consideradas multirresistentes, segundo o Serviço de Controle de Infecção do Hospital Júlia Kubitschek. Cetin et al.⁽²⁾ encontraram taxas

de resistência ao imipenem e meropenem de 44% e 47% respectivamente.

Além disso, estas cepas também apresentaram altas taxas de resistência aos outros antimicrobianos testados, como o cefepime (97,7%), ceftazidime (88,6%), amicacina (81,8%), ampicilina/sulbactam (82,9%), ciprofloxacina (90,9%) e gentamicina (75%), de acordo com a Tabela 1. Assim, a emergência de resistência entre *Acinetobacter baumannii* é preocupante, deixando relativamente poucas opções terapêuticas no tratamento de infecções por estes patógenos. Maltezou⁽¹⁴⁾ observou que cepas produtoras de carbapenemases apresentavam fenótipos de multirresistência.

Neste trabalho, verificou-se que a tigeciclina apresentou atividade *in vitro* contra todas as cepas isoladas, inclusive as multirresistentes. Assim, a sensibilidade da tigeciclina contra cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* é promissora para seu uso em terapia.

No entanto, enquanto a tigeciclina apresenta excelente atividade *in vitro*, sua atividade clínica ainda deve ser mais estudada. Existem poucos dados sobre a eficácia da tigeciclina contra infecções por gram negativos, especialmente aquelas envolvendo o trato respiratório inferior e bacteremia.^(15,5)

Gimenez et al.⁽¹⁶⁾ observam que, na prática clínica diária, o uso da tigeciclina tende a aumentar devido ao crescente isolamento de patógenos nosocomiais multirresistentes, e este antimicrobiano pode ser uma das poucas alternativas contra estas cepas.

O conhecimento da atividade *in vitro* da tigeciclina frente a cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas no Hospital Júlia Kubitschek é importante para que seja avaliada uma possível introdução deste antimicrobiano entre os fármacos padronizados na unidade, uma vez que foram apresentadas altas taxas de isolamento de cepas multirresistentes, principalmente no CTI.

Uma das limitações deste estudo foi não ter sido avaliado qual o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos desenvolvido pelas cepas bacterianas avaliadas.

CONCLUSÃO

A tigeciclina apresentou atividade *in vitro* contra todas as amostras avaliadas neste estudo e pode vir a ser uma alternativa viável no tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* frequentemente isoladas neste hospital, principalmente no CTI.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Wyeth Pharmaceuticals pelo fornecimento dos discos de tigeciclina e apoio científico e a todos os funcionários do setor de Microbiologia do Laboratório do Hospital Júlia Kubitschek.

REFERÊNCIAS

1. Pontes VM, Menezes EA, Cunha FA, Ângelo MR, Salviano MN, Oliveira IR. Perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos nas Unidades de Terapia intensiva e semi-intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. Rev Bras Anal Clín. 2006;38(2):123-6.

2. Cetin ES, Durmaz R, Tetik T, Oflu B, Kaya S, Caliskan A. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *Am J Infect Control*. 2009;37(1):56-64.
3. Henwood CJ, Gatward T, Warner M, James D, Stockdale MW, Spence RP, et al. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and in vitro evaluation of tigecycline (GAR-936). *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(3):479-87.
4. Uma Karthika R, Srinivasa Rao R, Sahoo S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, et al. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from South Indian tertiary care hospital. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 4):430-5.
5. Gordon NC, Wareham DW. A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(4):775-80.
6. Mendes RE, Castanheira M, Pignatari AC, Gales AC. Metallo-beta-lactamases. *J Brás Patol Med Lab*. 2006;42(2):103-13.
7. Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(4):641-7.
8. Bhattacharya M, Parakh A, Narang M. Tigecycline. *J Postgrad Med*. 2009;55(1):65-8.
9. Projan SJ. Preclinical pharmacology of GAR-936, a novel glycolcyclo antibiotic agent. *Pharmacotherapy*. 2000;20(9 Pt 2):219S-223S.
10. Curcio D, Isturiz R. Tigecycline, la primeira gliciciclina. *Rev Panm Infectol*. 2006;8(3):25-42.
11. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-6.
12. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, in document M100-S18. Clinical Laboratory standards institute, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, 2008.
13. Jones RN, Ferraro MJ, Reller LB, Schreckenberger PC, Swenson JM, Sader HS. Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(1):227-30.
14. Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(5):405.e1-7.
15. Eser OK, Ergin A, Tunçkanat F, Haşcelik G. In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. *New Microbiol*. 2008;31(4):535-42.
16. Giménez MJ, García-Rey C, Barberán J, Aguilar L. Clinical experience with tigecycline in the treatment of nosocomial infections caused by isolates exhibiting prevalent resistance mechanisms. *Rev Esp Quimioter*. 2009; 22(1):48-56. [Article in Spanish].

Autor correspondente

Valéria Martins Soares

Rua José do Patrocínio Carneiro, 10, apto 602 – Bairro Buritys
30575-250 – Belo Horizonte, MG

Aumento dos níveis de LDLox induzem maior formação de células espumosas *in vitro*

Increased levels of oxLDL induce higher foam cells formation *in vitro*

Marlene Silva Bardi Gonçalves¹, Décio Sabbatini Barbosa², Francis Fregonesi Brinholi¹, Bruno Alberto Fabris³, Maria Emília Fávero²

Resumo: Inúmeras evidências sustentam a hipótese de que a modificação oxidativa da LDL contribui para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose em uma variedade de modelos animais e que as células espumosas constituem um evento crucial no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A LDL oxidada tem uma ação quimioatratante sobre os monócitos, induzindo a transformação de macrófagos em células espumosas. Neste trabalho, foi desenvolvido um protocolo simples e reproduzível de cultura de células mononucleares humanas, o qual foi utilizado para avaliação da capacidade aterogênica da LDL oxidada comparada à LDL nativa na formação de células espumosas com ativação espontânea dos macrófagos. A partir do sangue de 10 indivíduos normolipidêmicos, obteve-se a LDL por processo de ultracentrifugação sendo a mesma oxidada *in vitro* na presença de íons cobre. Monócitos diferenciaram-se em macrófagos e foram incubados com LDL nativa e oxidada em diferentes concentrações. Houve formação de células espumosas apenas em macrófagos estimulados com LDL oxidada, variando quantitativamente de acordo com a sua concentração. Concluiu-se que este protocolo de estudo, além de possibilitar a utilização de macrófagos humanos, permitiu a redução do tempo de incubação da cultura. Paralelamente, demonstrou-se que a formação de células espumosas é dependente da extensão do grau de oxidação da LDL.

Palavras-chave: Células espumosas; Macrófagos; Lipoproteínas; Aterosclerose

Abstract: Much evidence sustains the hypothesis that oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) contributes to the development and progression of atherosclerosis and that foam cells constitute a crucial event in the development of the atherosclerotic lesion. Oxidized LDL (oxLDL) presents a chemotactic action on monocytes, inducing the transformation of macrophages into foam cells. In this work, a simple reproducible protocol for culturing human mononuclear cells was developed to evaluate the atherogenic capacity of oxLDL compared to native LDL in the formation of foam cells. Monocytes differentiate into macrophages when stimulated with native and oxidized LDL at different concentrations. Foam cell formation only occurred in macrophages stimulated by oxLDL, which varied quantitatively according to its concentration. This study protocol, besides making the use of human macrophages possible, permitted a reduction in culture incubation time. Moreover, the study demonstrated that foam cell formation is dependent on the degree of LDL oxidation.

Keywords: Foam cells; Macrophages; Lipoproteins; Atherosclerosis

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença de causas multifatoriais. Evidências indicam que o evento fundamental para o início das lesões é o acúmulo de lipoproteínas modificadas derivadas do plasma na íntima arterial, que desencadeia reações celulares específicas, das quais a disfunção endotelial e o estado inflamatório são os componentes principais.⁽¹⁾

A teoria sobre a patogênese da aterosclerose é a de que ocorre uma resposta à agressão endotelial, na qual monócitos circulantes são quimiotaticamente atraídos para a lesão penetrando no espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos e transformam-se posteriormente em células espumosas.⁽²⁾ O acúmulo de células espumosas (macrófagos locupletados de colesterol) na parede arterial possui papel chave no início da aterosclerose e constitui a primeira lesão detectável química e microscopicamente do depósito de lipídeos na íntima da artéria, sendo considerada a alteração morfológica mais precoce e característica desta patologia.⁽³⁾

A modificação da LDL por processos oxidativos, base da hipótese oxidativa da aterosclerose, propõe que este importante mecanismo seja possivelmente obrigatório na origem desta doença, envolvendo um complexo desequilíbrio lipídico, assim como respostas inflamatórias mediadas por macrófagos e células espumosas.⁽⁴⁾ Estas evidências baseiam-se principalmente em modelos animais, onde macrófagos murinos são muito utilizados, além de outras linhagens celulares destes fagócitos.

O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica para obtenção de células espumosas a partir de macrófagos derivados de monócitos humanos estimulados com LDL nativa e oxidada em diferentes concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Foram selecionados dez indivíduos aparentemente saudáveis, normolipidêmicos com idade variando entre 23 a

¹Laboratório de Histocompatibilidade, Hemocentro Regional de Londrina

²Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas - Centro de Ciências da Saúde

³Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação

55 anos, funcionários do Hospital Universitário de Londrina/UEL.

Parâmetros bioquímicos analisados

Análises bioquímicas automatizadas foram utilizadas para dosagem de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triacilgliceróis.

Obtenção da LDL

Foram coletados 8 mL de sangue em tubos a vácuo, contendo EDTA sódico como anticoagulante.

O plasma teve sua densidade ajustada para 1.090 g/mL pela adição de brometo de sódio e a obtenção da fração LDL feita através de ultracentrifugação (ultracentrífuga Sorvall®, USA) durante 24 horas em 277.000 X g a 4°C em uma adaptação de técnica descrita por Griffin et al.⁽⁵⁾ utilizando-se um gradiente salino descontínuo.

A fração isolada foi dialisada sob agitação contra uma solução de cloreto de sódio 0,85% a 4°C por 15 horas, utilizando-se membrana de diálise Nephropane®.

As proteínas da LDL foram quantificadas utilizando-se a metodologia de Lowry⁽⁶⁾ com leitura em espectrofotômetro (UV-visível, Spectronic®, USA) em comprimento de onda de 660 nm. A LDL oxidada foi preparada incubando-se a LDL nativa com 5 µmol/L de sulfato de cobre durante 15 horas a 37°C sob agitação mecânica em banho Dubnoff. Após a oxidação, a LDL foi filtrada em filtro Millipore 0,20 µm e utilizada imediatamente na cultura de células.

Isolamento de células mononucleares e cultura de macrófagos derivados de monócitos

Foram coletados 20 mL de sangue periférico em tubos a vácuo, estéreis, contendo EDTA sódico.

Obtiveram-se células mononucleares por centrifugação em Histopaque® (Amersham Biosciences) com gradiente de densidade 1.077. A fração de células foi removida, lavada e ressuspensa em meio RPMI 1640 (Sigma) estéril com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, baixos níveis de endotoxina, suplementada com 10% de soro bovino fetal inativado (GIBCO), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomina. As plaquetas foram removidas da suspensão celular por centrifugação em baixa rotação.

Empregou-se o teste de exclusão por azul de tripano para verificar a viabilidade celular, antes da incubação das células na placa de cultura, sendo a viabilidade em todos os testes superior a 95%.

As células mononucleares foram colocadas em placas de cultura (Costar®) de 24 poços na densidade de 2×10^6 células/mL em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Thermo Forma®) durante três horas. As células não aderentes foram removidas por duas lavagens consecutivas com meio RPMI 1640. As células aderidas (monócitos) foram incubadas durante 72 horas em meio RPMI 1640 estéril (suplementado com antibióticos e soro bovino fetal inativado, como descrito acima) em estufa a 37°C com 5% de CO₂ para a obtenção dos macrófagos. Após a diferenciação dos monócitos em macrófagos, foram acrescentadas LDL nativa e oxidada nas

concentrações de 30 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL e incubadas durante 48 horas em estufa.

Para avaliar o isolamento e a aderência dos monócitos e, posteriormente dos macrófagos à placa de cultura, as células aderidas aos poços foram raspadas utilizando-se *scraper*, centrifugadas e feito um esfregaço em lâmina com o concentrado de células. As lâminas foram coradas pela técnica de Rosenfeld,⁽⁷⁾ examinadas em microscópio ótico, magnitude de 1000x.

Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Coloração das células espumosas e análise quantitativa

As placas de cultura contendo células espumosas foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído a 4% por 20 minutos. Após lavar novamente com PBS, a avaliação da formação das células espumosas foi feita pela coloração das células contendo inclusões lipídicas com 3% de fat red em 60% de álcool isopropílico por 30 minutos, novamente lavadas com PBS e examinadas em microscopia de contraste de fase invertida (Nikon®). As células espumosas foram contadas baseadas no critério de 3 campos/poço da placa de cultura.⁽⁸⁾

RESULTADOS

Os valores dos parâmetros bioquímicos nos 10 indivíduos avaliados foram para o colesterol total ($170,8 \pm 30,37$ mg/dL), colesterol HDL ($53,4 \pm 12,64$ mg/dL), colesterol LDL ($98,9 \pm 27,35$ mg/dL) e triacilgliceróis ($92,0 \pm 52,38$ mg/dL).

Como demonstrado na Figura 1(A), evidenciamos nas lâminas coradas pela técnica de Rosenfeld, a aderência de monócitos à placa de cultura e, na Figura 1(B), monócitos

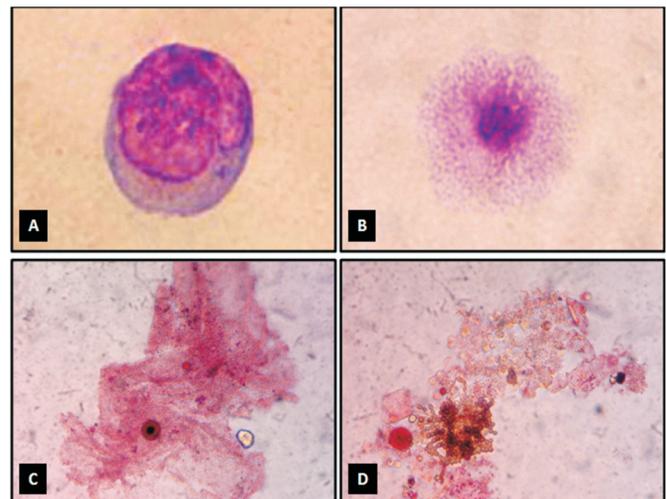


Figura 1. Diferenciação de monócitos em macrófagos e formação de células espumosas após estímulo com LDLox. **A:** Monócitos aderiram à placa de cultura após 3 horas de incubação. **B:** Monócitos diferenciados em macrófagos após um período de incubação de 72 horas. Nas figuras **A** e **B**, as células foram coradas pelo método de Rosenfeld, com magnitude de 1000x. **C** e **D:** Macrófagos estimulados com 100 µg/mL de LDL oxidada por 48 horas, formaram células espumosas. Nas figuras **C** e **D**, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído, coradas com 3% de fat-red e visualizadas em microscopia de contraste de fase invertida, magnitude de 200x

diferenciados em macrófagos, após 72 horas de incubação, confirmando assim o isolamento e a obtenção destas células.

Observou-se pela coloração com *fat red* que macrófagos estimulados com LDL nativa nas concentrações de 30 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL não formaram células espumosas, enquanto macrófagos estimulados com LDL oxidada nas mesmas concentrações induziram a formação de grandes aglomerados celulares, contendo inclusões lipídicas, denotando a presença de células espumosas (Figura 1C e 1D).

Evidenciou-se que macrófagos incubados junto a altas concentrações de LDL oxidada (100 µg/mL) apresentaram maior número de células espumosas/campo quando comparado às concentrações de 30 µg/mL e 50 µg/mL deste tipo de lipoproteína. O acúmulo de colesterol nos macrófagos foi concentração-dependente e específico para a LDL oxidada.

Para a análise quantitativa das células espumosas visualizadas na placa de cultura por microscopia de contraste de fase invertida, procedeu-se à contagem de células espumosas/campo conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da formação de células espumosas de acordo com o estímulo e a concentração de LDL

LDL (µg/mL)	Macrófago estimulado com LDL nativa	Macrófago estimulado com LDL oxidada
	Célula espumosa/campo	Célula espumosa/campo
30,00	0	1-9
50,00	0	10-15
100,00	0	≥ 16

DISCUSSÃO

A hipótese da modificação oxidativa baseia-se no conceito de que a LDL em sua forma nativa não é aterogênica.⁽⁹⁾ *In vitro*, a LDL nativa não induz acúmulo de colesterol esterificado em macrófagos, inclusive humanos, que possuem receptor de alta afinidade para esta lipoproteína. Contudo, a LDL quimicamente modificada é prontamente interiorizada pelos macrófagos, via receptor *scavenger*, acumulando colesterol esterificado.^(10,11)

A exposição das células vasculares no meio que contém metais de transição, como ferro e cobre, também resulta na modificação da LDL.^(12,13) Durante este processo, a LDL está sujeita a oxidação e modificação dos resíduos de lisina na apo B-100, levando ao aumento de cargas negativas nas partículas de lipoproteínas.^(14,15) Esta modificação da apo B-100 deixa a LDL suscetível a captação pelos macrófagos mediado pelos receptores *scavenger*, produzindo células espumosas carregadas de colesterol esterificado.^(15,16)

Estudos do metabolismo lipídico têm explorado a interação dos macrófagos com lipoproteínas em placa de cultura de tecidos. O modelo considerado clássico para a formação de células espumosas *in vitro*, utiliza macrófagos da linhagem celular murina J774A.1.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ ou RAW 264.7,⁽²⁰⁾ enquanto outros estudos utilizam a linhagem celular monocítica humana THP-1^(8,21) na qual os macrófagos são ativados com PMA

(13-acetato forbol 12-miristato) para aumentar a captação de LDL⁽²²⁾ e favorecer a diferenciação de monócitos em macrófagos.^(23,24)

No presente estudo foi desenvolvido um sistema de cultura de células *in vitro* a partir de células mononucleares humanas, utilizando-se pequeno volume de sangue, permitindo a utilização deste teste não somente em voluntários saudáveis, mas também em pacientes.

Os monócitos diferenciaram-se em macrófagos por um mecanismo de ativação espontânea, ou seja, na ausência do tratamento com PMA. Todo o processo de formação de células espumosas foi feito na própria placa de cultura, sem a necessidade do cultivo prévio de macrófagos em outro meio, possibilitando o encurtamento do tempo de cultivo para a formação de células espumosas para apenas cinco dias, quando comparado a outros sistemas que utilizam tempo de incubação de sete dias⁽²⁵⁾ e nove dias para a diferenciação de monócitos em macrófagos.⁽⁸⁾

Neste protocolo de estudo, os macrófagos foram estimulados com LDL nativa e LDL oxidada nas concentrações de 30 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Não foi constatada a formação de células espumosas em macrófagos expostos a LDL nativa, mesmo com o aumento da concentração, enquanto nas células estimuladas com LDL oxidada a indução de células espumosas foi concentração-dependente. Na análise quantitativa, a concentração de 100 µg/mL de LDLox, quando comparada a 30 µg/mL e 50 µg/mL deste tipo de lipoproteína modificada, induziu maior formação de células espumosas.

Múltiplas evidências apoiam a importância da LDL oxidada no processo aterogênico *in vivo*. LDL extraídas de lesões ateroscleróticas exibem as propriedades físicas, biológicas e imunológicas atribuídas às preparações de LDL oxidada *in vitro*.⁽²⁶⁾

Apesar dos níveis de LDL na íntima das artérias apresentarem-se altos, variando de 0,7 a 2,7 mg/mL de LDL⁽²⁷⁾ e de alguns trabalhos utilizarem concentrações que variam até 200 µg/mL,^(8,28) níveis de LDL inferiores a 100 µg/mL são comumente utilizados para estudos em cultura de macrófagos.⁽²⁹⁾ Alguns trabalhos relatam que a concentração de LDL superior a 50 µg/mL em cultura de células pode ser citotóxica aos macrófagos, provocando lise sobre a membrana celular.⁽¹⁹⁾ Asmis & Jelk⁽³⁰⁾ demonstraram que macrófagos expostos a 100 µg/mL de LDLox na ausência de soro autólogo, apresentaram um aumento marcante na perda da integridade da membrana, enquanto na presença de soro autólogo nenhuma citotoxicidade foi observada.

Neste trabalho não se evidenciou efeito citotóxico sobre os macrófagos e células espumosas quando utilizada a concentração de 100 µg/mL de LDLox. Provavelmente, o soro fetal bovino inativado suplementado ao meio de cultura RPMI 1640, provocou um efeito protetor sobre a membrana celular, evitando a lise celular mediada por altas concentrações de LDLox sobre os macrófagos.

O desenvolvimento deste modelo de cultura é aplicável a uma grande variedade de estudos, permitindo, por exemplo, estudar a expressão diferencial de receptores LDL; analisar

o conteúdo e a composição de colesterol celular; testar as defesas antioxidantes celulares; quantificar citocinas liberadas no sobrenadante da cultura; avaliar os níveis de estresse oxidativo celular; estudar a expressão de proteínas mRNA em células espumosas, etc., ampliando assim o conhecimento da biologia do macrófago nas lesões ateroscleróticas.

A extrapolação de dados de modelos animais para humanos podem não ser confiáveis, especialmente em relação à formação de células espumosas. Provavelmente, macrófagos de animais respondem diferentemente aos estímulos aterogênicos.⁽³⁰⁾ Do mesmo modo, experimentos com linhagens celulares devem ser tratados com cautela.⁽³¹⁾ Linhagens celulares de macrófagos, contrariamente aos macrófagos humanos são caracterizados por altos índices de proliferação, fazendo da linhagem celular um modelo não apropriado para a formação de células espumosas humanas.⁽³²⁾

CONCLUSÃO

Com a otimização deste protocolo de estudo foi possível a utilização de células mononucleares humanas, empregando-se pequeno volume de sangue para o procedimento da cultura, além de reduzir consideravelmente o tempo de incubação para a formação de células espumosas, tornando esta metodologia simples, aplicável e reproduzível.

Concluiu-se também que, no sistema de cultura de células com ativação espontânea dos macrófagos, a formação de células espumosas é concentração-dependente, ou seja, depende diretamente da extensão do grau de oxidação da LDL, evidenciando a alta afinidade apresentada pelos macrófagos quando expostos à LDL modificada oxidativamente.

REFERÊNCIAS

- Favarato D, Luz P L. Hipertensão e aterosclerose, aspectos fisiopatológicos. Rev. Soc. Bras. Hipert. 2003;6(4):131-4.
- Asmis R, Jelk J. Large variations in human foam cell formation in individuals: a fully autologous *in vitro* assay based on the quantitative analysis of cellular neutral lipids. Atherosclerosis. 2000;148(2):243-53.
- Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. Biol Pharm Bull. 2003;26(1):1-9.
- Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet. 1994;344:793-5.
- Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. Atherosclerosis. 1990;83(1):59-67.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.
- Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Mem. Inst. Butantan. 1947;20:315-28.
- Giacona MB, Papapanou PN, Lamster IB, Rong LL, D'Agati VD, Schmidt AM, et al. Porphyromonas gingivalis induces its uptake by human macrophages and promotes foam cell formation *in vitro*. FEMS Microbiol Lett. 2004;241(1):95-101.
- Goldstein JL, Brown MS. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Annu Rev Biochem. 1977;46:897-930.
- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(1):333-7.
- Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoprotein increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. J Biol Chem. 1997;272(34):21654-9.
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(10):6499-503.
- Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. FASEB J. 2001;15(12):2073-84.
- Haberland ME, Fogelman AM, Edwards PA. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(6):1712-6.
- Østerud B, Bjørklid E. Role of monocytes in atherogenesis. Physiol Rev. 2003;83(4):1069-112.
- Haberland ME, Olch CL, Fogelman AM. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. J Biol Chem. 1984;259(18):11305-11.
- Tabas I, Weiland DA, Tall AR. Unmodified low density lipoprotein causes cholesteryl ester accumulation in J774A.1 macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82(2):416-20.
- Via DP, Plant AL, Craig IF, Gotto AM Jr, Smith LC. Metabolism of normal and modified low-density lipoproteins by macrophage cell lines of murine and human origin. Biochim Biophys Acta. 1985;833(3):417-28.
- Yang X, Galeano NF, Szabolcs M, Sciacca RR, Cannon PJ. Oxidized low-density lipoproteins alter macrophage lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. J Nutr. 1996;126(4 Suppl):1072S-5S.
- De Vries HE, Ronken E, Reinders JH, Buchner B, Van Berkel TJ, Kuiper J. Acute effects of oxidized low-density lipoprotein on metabolic responses in macrophages. FASEB J. 1998;12(1):111-8.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer. 1980;26(2):171-6.
- Kruth HS, Huang W, Ishii I, Zhang WY. Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. J Biol Chem. 2002 ;277(37):34573-80.
- Girona J, La Ville AE, Heras M, Olivé S, Masana L. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF- alpha secretion by THP-1 human macrophages. Free Radic Biol Med. 1997;23(4):658-67.
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. Cancer Res. 1982;42(4):1530-6.
- Baoutina A, Dean RT, Jessup W. Macrophages can decrease the level of cholesteryl ester hydroperoxides in low density lipoprotein. J Biol Chem. 2000; 275(3):1635-44.
- Hodis HN, Krams DM, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hwang JA. Biochemical and cytotoxic characteristic in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). J Lipid Res. 1994;35(4):669-77.
- Smith EB, Ashall C. Low-density lipoprotein concentration in interstitial fluid from human atherosclerotic lesions. Relation to theories of endothelial damage and lipoprotein binding. Biochim Biophys Acta. 1983;754(3):249-57.
- Geng YJ, Hansson GK. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. J Clin Invest. 1992;89(4):1322-30.
- Nakagawa T, Nozaki S, Nishida M, Yakub JM, Tomiyama Y, Nakata A, et al. Oxidized LDL increase and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18(8):1350-7.
- Asmis R, Jelk J. Vitamin E supplementation of human macrophages prevents neither foam cell formation nor increased susceptibility of foam cells to lysis by oxidized LDL. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(9): 2078-86.
- Suzukawa M, Abbey M, Clifton P, Nestel PJ. Effects of supplements with vitamin E on the uptake of low density lipoprotein and the stimulation of cholesteryl ester formation in macrophages. Atherosclerosis. 1994;110(1):77-86.
- Asmis R, Llorente VC, Gey KF. Prevention of cholesteryl ester accumulation in P388D1 macrophage-like cells by increased cellular vitamin E depends on species of extracellular cholesterol: conventional heterologous non-human cell cultures are poor models of human atherosclerotic foam cell formation. Eur J Biochem. 1995 ;233(1):171-8.

Autor correspondente

Décio Sabbatini Barbosa

Avenida Robert Koch, nº 60 – Vila Operária

86039-440 – Londrina, PR, Brasil

Phone: 55 43 3371-245

Email: sabatini@sercomtel.com.br

Avaliação do desempenho analítico do coagulômetro automatizado Sysmex® Ca-1500: experiência do Hospital de Clínicas da UFPR

Performance evaluation of the Automated Coagulation Analyzer Sysmex® Ca-1500: experience of the Hospital de Clínicas of UFPR

Samuel Ricardo Comar¹, Giuliana Baldissarelli Locatelli², Lilian Odeli³, Lismara Kafka do Bomfim⁴

Resumo: O Sysmex® CA-1500 é um analisador automatizado de coagulação que detecta a formação de fibrina por princípio ótico. A avaliação do seu desempenho analítico foi realizada através de testes de precisão, reprodutibilidade, arraste e linearidade, além de ensaios para verificar a influência de fatores pré-analíticos como relação anticoagulante / sangue e hemólise nas determinações de TP, TTP, TT e fibrinogênio. Além disso, os resultados de TP e TTP foram correlacionados com os obtidos no coagulômetro ST4, Diagnostica STAGO, que utiliza o método eletromagnético para a detecção do coágulo de fibrina. Observou-se grande variação dos resultados sobre a influência da hemólise (TP: 0,91 a 2,33%; TTP: 1,37 a 6,54% e TT: 1,38 a 12,72%) e relação anticoagulante/sangue (TP: 1,39 a 659,3%; TTP: 2,93 a 275,2%, TT: 4,0 a 128% e fibrinogênio: 3,4 a 32,2%), quando comparados com amostras sem hemólise e com a relação anticoagulante/sangue de 1:9. A porcentagem de arraste foi (TP: 0,75%, TTP: 0,50% e fibrinogênio: 5,65%). A precisão intraensaio para TP, TTP, TT e fibrinogênio obteve CV < 3% para plasmas normais e patológicos, assim como a reprodutibilidade interensaios em plasma normal liofilizado e *pool* de plasmas de pacientes normais. As correlações para TP e TTP entre os dois coagulômetros avaliados obteve valores de $r \geq 0,90$. A linearidade foi boa até aproximadamente 650 mg/dL de fibrinogênio e obteve $r = 0,981$. Os resultados obtidos demonstraram que o CA-1500 realiza os testes de coagulação com desempenho analítico satisfatório.

Palavras-chave: Coagulômetro Sysmex CA-1500; Automação; Controle de qualidade; Testes de coagulação sanguínea

Abstract: The Sysmex® CA-1500 is an automated coagulation analyzer that detects the formation of fibrin clot by optical principle. The evaluation of its analytical performance was accomplished through tests of precision, reproducibility, linearity and carryover, as well as tests to check the influence of pre-analytical factors such as the anticoagulant / blood ratio and hemolysis on the determinations of PT, PTT, TT and fibrinogen. Moreover, the results of PT and PTT were correlated with those obtained in the ST4 coagulometer, Diagnostica Stago, using the electromagnetic method for the detection of fibrin clot. We found great variation in results under the influence of hemolysis (PT: 0,91 to 2,33%, PTT: 1,37 to 6,54% and TT: 1,38 to 12,72%) and anticoagulant / blood ratio (PT: 1,39 to 659,3%, PTT: 2,93 to 275,2%, TT: 4,0 to 128% and fibrinogen: 3,4 to 32,2%) compared with samples without hemolysis and the ratio of 1:9 anticoagulant / blood. The percentage of carryover was (PT: 0,75%, PTT: 0,50% and fibrinogen: 5,65%). The intra-assay precision for PT, PTT, TT and Fibrinogen had CV < 3% for normal and abnormal plasmas, as well as inter-assay reproducibility in normal lyophilized plasma and normal pooled plasma. The correlations between TP and TTP on the two evaluated coagulometers obtained r values $\geq 0,90$. The linearity was good up to about 650 mg/dl of fibrinogen and obtained $r = 0,981$. The results showed that CA-1500 perform coagulation tests with satisfactory analytical performance.

Keywords: Automated coagulation analyzer Sysmex CA-1500; Automation; Quality control; Tests of blood coagulation

INTRODUÇÃO

Quando se iniciaram os estudos em medicina laboratorial, por volta de 1920, os ensaios eram realizados manualmente e, dentre eles, estavam os métodos de detecção visual da formação do coágulo de fibrina, que eram utilizados para se avaliarem problemas de coagulação sanguínea. Nas décadas seguintes, com os avanços na medicina, ciências básicas e tecnologia, houve o início do desenvolvimento da automação do laboratório clínico. Já na década de 1970 foram desenvolvidos os primeiros analisadores de coagulação semiautomatizados, os quais se baseavam em princípios fotométricos ou mecânicos para detectar a formação de fibrina,

o que tornou possível a padronização da determinação do ponto final da coagulação. No entanto, a operacionalização destes coagulômetros consumia trabalho árduo, uma vez que a adição das amostras e reagentes era manual, além da exigência de sempre confirmar os testes em duplicatas.^(1,2)

A automação total em hemostasia é relativamente recente e tem promovido melhorias como a liberação de resultados em tempo menor, facilidade de execução e padronização dos testes e aumento e eficácia na produção, sem perda da qualidade, o que é ideal para os laboratórios, médicos e pacientes. Contudo, nosso país ainda é refém dos custos financeiros sobre os insumos e manutenção especializada.^(2,3)

¹Farmacêutico bioquímico. Chefe da Seção de Hematologia UAD - HC - UFPR. Preceptor da Residência multiprofissional do HC-UFPR

²Farmacêutica bioquímica. Residente multiprofissional do HC-UFPR - Área de concentração Saúde da mulher

³Farmacêutica bioquímica. Residente multiprofissional do HC-UFPR - Área de concentração Hematologia/Oncologia

⁴Farmacêutica bioquímica. Seção de Hematologia UAD - HC - UFPR. Tutora da Residência multiprofissional do HC-UFPR

O desempenho analítico dos analisadores de coagulação é tradicionalmente avaliado através de testes de precisão, exatidão, linearidade, *carryover* ou arraste, reprodutibilidade e correlação dos resultados com outras metodologias já consolidadas. Quando os resultados laboratoriais são interpretados, é importante reconhecer a possível ocorrência de erros randômicos dos resultados fornecidos, independentemente da possibilidade destes resultados poderem ser influenciados por variabilidade analítica e biológica. Portanto, verificar e avaliar a imprecisão analítica de coagulômetros automatizados constitui uma ação que deve ser realizada em todos os laboratórios que os utilizam, principalmente naqueles que possuem um alto volume de amostras, incluindo pacientes constantemente monitorados.⁽⁴⁻¹⁰⁾

Considerando, ainda, que os exames de coagulação são amplamente requisitados nas consultas médicas e fundamentais para detectar patologias que envolvam a hemostasia, os laboratórios devem dispor de ferramentas para garantir que os resultados sejam os mais confiáveis possíveis. Neste sentido, a verificação do desempenho analítico dos resultados produzidos por um coagulômetro torna-se um item de especial importância, principalmente por refletir a qualidade do trabalho laboratorial e impactar diretamente na conduta clínica dos pacientes.

Por conseguinte, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho analítico do CA-1500, ressaltando sua importância na prática clínica e laboratorial. Para isso, foram realizados testes de precisão, reprodutibilidade, arraste e linearidade, além de ensaios para verificar a influência de fatores pré-analíticos como relação anticoagulante/sangue e hemólise, nas determinações de tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial (TTP), tempo de trombina (TT) e dosagem de fibrinogênio. Além disso, os resultados de TP e TTP foram correlacionados com os resultados obtidos pelo coagulômetro ST4®, Diagnostica STAGO, que utiliza o método eletromagnético para a detecção de fibrina.

É importante ressaltar que esse estudo, além de servir de base para que outros laboratórios de hematologia compreendam a importância de se validar um coagulômetro automatizado, fornece subsídios para proceder tal validação nas rotinas laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras: as amostras foram coletadas em tubos de plástico evacuados contendo citrato de sódio a 3,2% (109 mmol/L), na proporção de 1 vol./9 vol. (Vacutainer® Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). O plasma pobre em plaquetas foi obtido através de centrifugação a 1830 x g (3000 rpm) durante 10 minutos a 25°C. As análises foram realizadas em até 4 horas após a coleta ou foram aliquotadas e congeladas a -80°C até serem analisadas. As determinações foram realizadas nas amostras de pacientes internados e ambulatoriais para os quais exames de coagulação foram solicitados. Para a avaliação dos interferentes pré-analíticos foram utilizadas amostras de oito voluntários saudáveis, com idades entre 23 e 30 anos, cujas contagens de leucócitos e

plaquetas encontravam-se entre 3,88 e 8,32 x 10³/μL e 179 e 337 x 10³/μL, respectivamente, a concentração de hemoglobina entre 12,8 e 16,3 g/dL e o volume globular de 37 a 44,6%.

Coagulômetro automatizado: o coagulômetro automatizado utilizado foi o aparelho "CA 1500" (Sysmex®, Kobe, Japão) que é um analisador multiparamétrico, para uso diagnóstico *in vitro*. Este realiza testes coagulométricos, através da detecção da dispersão da luz a 660nm, testes cromogênicos por método colorimétrico e testes imunológicos através de método turbidimétrico. O CA-1500 é equipado com um perfurador de tampas de tubos que faz a transferência do plasma para uma placa localizada no interior do equipamento, minimizando riscos biológicos para o operador, possui leitores de código de barras para a identificação de amostras e reagentes e uma unidade de resfriamento para os reagentes e aquecimento para as amostras. Permite, ainda, a análise aleatória e simultânea de 15 parâmetros, tem a capacidade de interfacear dados com sistemas de informação laboratorial, armazena dados de até 15.000 testes, além de possuir um *software* próprio de controle de qualidade. O CA 1500 possui a capacidade de processar cerca de 120 TP e 80 TP/TTP por hora.

Reagentes utilizados: os reagentes, os calibradores e controles comerciais liofilizados utilizados no presente estudo seguem as mesmas especificações daqueles utilizados na rotina laboratorial do HC-UFPR e estão descritos na Tabela 1. Todos os ensaios foram realizados de acordo com as especificações dos fabricantes, seguindo as boas práticas de laboratório. Previamente à realização dos testes de precisão, reprodutibilidade, arraste e linearidade, procedeu-se uma lavagem completa do CA-1500, denominada *rinse probe*, de modo a eliminar interferentes de fundo.

Tabela 1 - Reagentes utilizados neste trabalho

Teste	Reagente
TP	Thromborel® S - Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
TTP	Actin® e Cloreto de cálcio - Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
TT	BC Thrombin reagent - Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Fibrinogênio	Multifibren™ U - Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Plasma padrão humano (controle normal liofilizado)	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Controle normal	HemosIL™ IL Company
Calibrador liofilizado	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH

Desempenho analítico

Precisão: o objetivo do teste foi verificar a capacidade do CA-1500 em reproduzir os mesmos resultados para uma dada

amostra em condições padronizadas, ou seja, pelo mesmo técnico, em um mesmo momento do dia, com os mesmos reagentes. Para tal, um *pool* de plasmas normais e um *pool* de plasmas patológicos foram analisados dez vezes consecutivas. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram calculados para as determinações de TP, TTP, TT e fibrinogênio.

Arraste: teve por objetivo verificar a influência que valores alterados de TP, TTP e fibrinogênio podem provocar nas determinações subsequentes de um mesmo parâmetro, através do arraste de vestígios remanescentes das amostras analisadas anteriormente. Para isso, um *pool* de plasmas patológicos foi analisado três vezes consecutivas, acompanhados imediatamente pela análise de um *pool* de plasmas normais, pelo mesmo número de vezes. A porcentagem de arraste foi calculada através da seguinte equação: $|N1 - N3| \times 100/A3 - N3$. Onde N1 foi o valor da amostra normal na primeira determinação, N3 o valor da amostra normal na terceira determinação e A3 o valor da amostra patológica na terceira determinação. A porcentagem final de arraste foi obtida como a média de três experimentos sucessivos.

Reprodutibilidade: o objetivo do teste foi determinar a capacidade do CA-1500 em reproduzir os mesmos resultados, para um determinado parâmetro, em uma dada amostra ao longo de vários dias. Para tal, foram empregados plasma humano padrão (controle normal liofilizado) e um *pool* de plasmas de pacientes normais. Ambos os plasmas foram preparados e alíquotados e, após, congelados a 80°C negativos. Diariamente, cada alíquota foi descongelada à temperatura ambiente e analisada no CA-1500 durante 22 dias consecutivos. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram calculados para as determinações de TP, TTP, TT e fibrinogênio.

Correlação: foi realizada a correlação entre os valores de R (relação Paciente/Controle) empregando-se 52 amostras de pacientes da rotina laboratorial, para os testes TP e TTP analisados no CA-1500 e no coagulômetro ST4®. Esta comparação de metodologias foi realizada, utilizando-se os mesmos reagentes em ambos os equipamentos. O objetivo foi comparar os valores obtidos de TP e TTP pelo uso da detecção ótica do coágulo (CA-1500) com aqueles obtidos através da detecção por método eletromagnético (ST4®).

Linearidade: este teste teve o objetivo de determinar os limiares válidos para a relação linear existente entre valores teóricos e observados no CA-1500 na dosagem de fibrinogênio. Para isso, uma amostra com fibrinogênio de 1148 mg/dL foi selecionada. As diluições empregadas foram de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. Cada faixa, com seis pontos, incluindo a amostra pura, foi testada três vezes consecutivas no CA-1500. A relação entre os valores dos ranges medidos e os valores teóricos foi estudada pela determinação do

coeficiente de correlação linear e a significância da diferença entre esses dois intervalos foi analisada pelo teste t.

Interferentes pré-analíticos

Hemólise: o objetivo deste ensaio foi verificar a influência da hemólise sobre os testes de coagulação. Coletaram-se, de cada voluntário, oito tubos de amostra em citrato de sódio a 3,2% (109 mmol/L). Um tubo de cada voluntário foi submetido a congelamento a 80°C negativos pelo período de uma hora, de modo a provocar hemólise na amostra e a partir dos outros 7 tubos preparou-se um *pool* de plasma de cada voluntário. Para cada voluntário, misturou-se o sangue hemolisado com o respectivo *pool* de plasma de modo a se obter plasmas hemolisados com diferentes concentrações de hemoglobina, as quais variaram entre 0 e 1,1g/dL. Cada diluição foi submetida às determinações de TP, TTP e TT no CA-1500.

Relação anticoagulante/sangue: o ensaio visou verificar a interferência que a relação anticoagulante/sangue das amostras, provoca nos resultados dos testes de coagulação. Coletaram-se, de oito voluntários saudáveis, seis tubos de amostra em citrato de sódio a 3,2% (109 mmol/L), de forma que o preenchimento atingisse 110%, 100%, 75%, 50%, 25% e 12,5% do volume total indicado pelo fabricante, o qual é representado por 100% e a proporção anticoagulante/sangue fosse de 1/10, 1/9, 1/6,75, 1/4,5, 1/2 e 1/1 respectivamente. As amostras foram então analisadas no CA-1500, para as determinações de TP, TTP, TT e fibrinogênio.

Análises estatísticas

A significância estatística dos dados experimentais foi analisada pelo teste de Friedman através do programa MEDCALC® versão 7.3.0.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), onde valores de $p \leq 0,05$ foram considerados como significativos e as correlações entre os resultados de R para TP e TTP foram realizadas por análise de regressão, no programa Excel (Microsoft Corporation, EUA), onde valores de $r \geq 0,90$ foram considerados como bons índices de correlação. Os coeficientes de variação foram comparados com as especificações correntes de qualidade analítica encontradas na literatura.

RESULTADOS

A precisão intraensaio, conforme Tabela 2, mostrou coeficientes de variação muito abaixo de 3%⁽⁵⁾ para TP, TTP, TT e fibrinogênio, tanto com a utilização de *pool* de plasmas normais frescos como *pool* de plasmas patológicos frescos, fato que demonstra uma excelente capacidade analítica em termos de repetição de resultados.

A Tabela 3 demonstra a reprodutibilidade apresentada pelo CA-1500 ao longo de 22 dias de avaliação com a utilização de amostras de plasma normal liofilizado e um *pool* de plasmas de pacientes normais. Os coeficientes de varia-

Tabela 2 - Precisão intraensaio do analisador de coagulação Sysmex® CA-1500

	Pool de plasmas normais frescos*				Pool de plasmas patológicos frescos*			
	TP (seg.)	TTP (seg.)	TT (seg.)	Fibrinogênio (mg/dL)	TP (seg.)	TTP (seg.)	TT (seg.)	Fibrinogênio (mg/dL)
	12,17	25,27	14,82	261,45	18,11	71,49	87,81	736,61
DP	0,04	0,30	0,26	7,53	0,16	1,25	1,32	10,58
CV (%)	0,003	0,012	0,017	0,028	0,009	0,017	0,015	0,014

* Os resultados são fornecidos como a média, desvio padrão e coeficiente de variação. (n = 10 repetições consecutivas para cada parâmetro).

Tabela 3 - Reprodutibilidade interensaios do analisador de coagulação Sysmex® CA-1500

	Plasma normal liofilizado (comercial)				Pool de plasmas de pacientes normais			
	TP (seg.)	TTP (seg.)	TT (seg.)	Fibrinogênio (mg/dL)	TP (seg.)	TTP (seg.)	TT (seg.)	Fibrinogênio (mg/dL)
	13,0	26,3	21,6	274	11,7	24,1	19,2	329
Máximo	13,6	27,8	25,2	315	12,5	30,6	22,5	486
Mínimo	12,1	25,0	18,9	223	10,9	21,4	16,6	233
DP	0,41	0,82	1,45	24,60	0,45	2,18	1,58	67
CV (%)	0,03	0,03	0,06	0,08	0,04	0,09	0,08	0,20

Os resultados são fornecidos como a média, valor máximo, valor mínimo, desvio padrão e coeficiente de variação. (n = 22 repetições ao longo de 22 dias para cada parâmetro)

ção encontrados para os parâmetros analisados foram todos abaixo de 5%, conforme recomendado por Fisher et al.,⁽⁵⁾ sendo que os valores encontrados para o plasma normal liofilizado foram ligeiramente menores, porém não significativos, que os observados para o pool de plasmas normais.

Para avaliar a quantidade de arraste ou *carryover*, foram utilizadas amostras com valores normais e amostras de pacientes com valores alterados, como os observados em pacientes sob terapia anticoagulante e hemocomponentes como os crioprecipitados, que apresentam alta concentração de fibrinogênio. Os valores encontrados para TP (0,75) e TTP (0,90) encontraram-se dentro dos limites preconizados, entretanto o arraste para a dosagem de fibrinogênio atingiu 5,65%.

Os resultados da comparação entre os valores de R para os testes TP e TTP analisados no CA-1500 e no coagulômetro ST4® são mostrados nas Figuras 1 e 2. Os resultados obtiveram elevada correlação, sendo em ambos os casos $\geq 0,90$. Realizou-se ainda o teste t presumindo variâncias diferentes e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois coagulômetros avaliados, tanto para o TP ($p = 0,616$) como para o TTP ($p = 0,872$).

A Figura 3 mostra o gráfico de linearidade entre os valores teóricos e práticos para a dosagem de fibrinogênio utilizando o CA-1500. Os resultados mostraram boa correlação até o limite de aproximadamente 650 mg/dL de fibrinogênio. O coeficiente de correlação foi de 0,981 e o teste t não mostrou diferença significativa entre os resultados.

Os efeitos da hemólise sobre os resultados dos testes de coagulação estão sintetizados na Tabela 4. A adição de hemolisados nas amostras produziu, de um modo geral, uma consistente tendência, concentração dependente, em super-

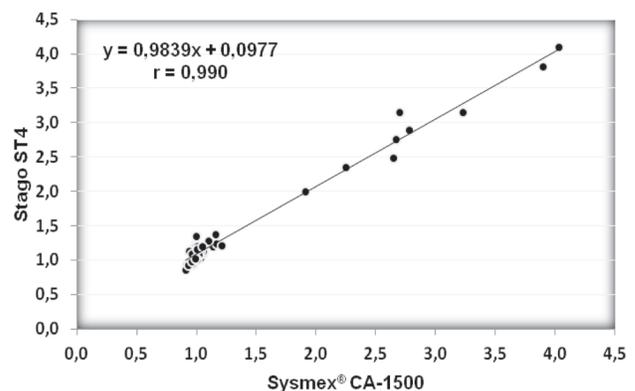


Figura 1 – Correlação da relação entre os tempos paciente/controle para o TP entre os coagulômetros Sysmex® CA-1500 e Stago ST4. (n = 52)

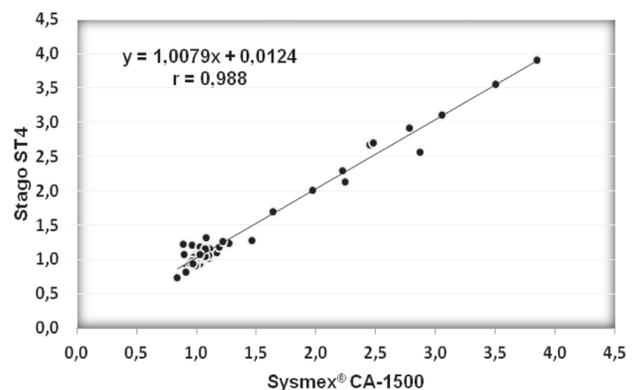


Figura 2 – Correlação da relação entre os tempos paciente/controle para o TTP entre os coagulômetros Sysmex® CA-1500 e Stago ST4. (n = 52)

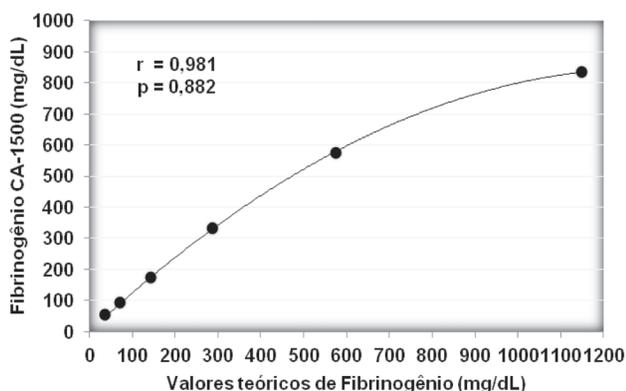


Figura 3 – Linearidade observada para o Fibrinogênio no CA-1500

Tabela 4 - Variação média (%) dos resultados de TP, TTP e TT em função da hemólise observada nas amostras, quando comparados com os resultados observados em amostras sem hemólise detectável

Hemoglobina plasmática (g/dL)	TP	TTP	TT
1,1	1,8 ± 1,5	6,54 ± 3,5	12,72 ± 13,1
0,97	2,33 ± 1,3	5,61 ± 3,2	9,09 ± 11,5
0,86	1,82 ± 1,7	5,34 ± 3,1	7,36 ± 7,4
0,76	2,14 ± 1,3	5,18 ± 3,1	6,38 ± 9,7
0,65	1,71 ± 1,8	5,16 ± 3,1	5,42 ± 5,2
0,47	0,91 ± 0,9	4,47 ± 2,3	6,19 ± 6,9
0,33	1,32 ± 0,83	2,95 ± 1,9	2,5 ± 3,0
0,18	1,92 ± 2,2	2,47 ± 1,9	2,74 ± 3,2
0,12	1 ± 0,7	1,9 ± 1,9	1,38 ± 1,7
0,06	1,46 ± 1,0	1,37 ± 1,1	1,81 ± 0,9

Os resultados expressam a média ± DP entre 8 experimentos realizados em duplicata

estimar a variação entre os resultados de TTP e TT. Contudo, este efeito não foi significativo para os resultados de TP.

Já os efeitos provocados pela alteração da relação anticoagulante / sangue nas determinações de TP, TTP, TT e fibrinogênio são mostrados na Tabela 5. Pela análise, percebe-se que a variação dos resultados foi amplamente afetada pela proporção anticoagulante/sangue existente nas amostras.

Tabela 5 - Variação média (%) dos resultados de TP, TTP, TT e Fibrinogênio em função da relação anticoagulante / sangue nas amostras, quando comparados com os resultados observados na relação 1:9.

A:S	% P	TP		TTP		TT		Fibrinogênio	
		%	F	%	F	%	F	%	F
1:1	12,5	659,3 ± 195,3	p < 0,05	275,2 ± 62,9	p < 0,05	128,0 ± 25,1	p < 0,05	32,2 ± 5,2	p < 0,05
1:2	25	258,1 ± 182,9	p < 0,05	190,7 ± 126,6	p < 0,05	90,1 ± 16,2	p < 0,05	21,6 ± 3,6	p < 0,05
1:4,5	50	10,17 ± 6,8	p < 0,05	18,3 ± 12,6	p < 0,05	43,3 ± 9,7	p < 0,05	8,1 ± 4,5	p < 0,05
1:6,75	75	1,39 ± 1,2	p > 0,05	2,93 ± 3,0	p > 0,05	14,1 ± 4,4	p < 0,05	3,4 ± 2,1	p < 0,05
1:9	100	0	*	0	*	0	*	0	*
1:10	110	2,79 ± 3,39	p > 0,05	4,6 ± 9,7	p > 0,05	4,0 ± 3,5	p < 0,05	4,4 ± 3,27	p < 0,05

* A relação 1:9 foi tomada como base para as comparações estatísticas. Os resultados expressam a média ± DP entre 8 experimentos independentes e realizados em duplicata

A:S = Relação anticoagulante / sangue; % P = Porcentagem de preenchimento do tubo; F = Teste de Friedman.

tras. Os resultados de TP, TTP, TT e fibrinogênio mostraram porcentagens de variação em relação à amostra colhida corretamente (relação 1:9) de 659,3%, 275,2%, 128% e 32,2% respectivamente para a relação de anticoagulante e sangue de 1:1 (12,5% de preenchimento do tubo). Todavia, os testes TP, TTP não mostraram variação significativa dos resultados quando as proporções de 1:6,75 (75% de preenchimento do tubo), e 1:10 (110% de preenchimento do tubo) foram testadas, conforme análise estatística pelo teste de Friedman, obtendo um valor de p > 0,05. Os resultados de TT e fibrinogênio foram afetados por todas as relações diferentes da preconizada.

DISCUSSÃO

A geração atual de analisadores de coagulação, introduzidos em sua maior parte na década de 1990, consiste em equipamentos totalmente automatizados que, além de serem conectados a sistemas de aquisição e processamento de dados e sistemas de interfaceamento, podem em um mesmo equipamento, empregar métodos coagulométricos, cromogênicos e imunológicos para a realização dos testes de coagulação.^(1,2)

Para garantir que as informações fornecidas pelos analisadores automatizados de coagulação sejam pertinentes e relevantes para a conduta médica e para fornecer um resultado de alta qualidade, a interferência humana deve ser direcionada para a verificação dos resultados que são gerados, seja através da correta avaliação e tomadas de decisões relativas ao controle de qualidade interno e externo ou pela verificação e análise do desempenho analítico dos coagulômetros.⁽¹¹⁾

As discrepâncias nos resultados dos testes de coagulação, sejam em ensaios realizados para o acompanhamento de terapia anticoagulante ou para triagem e diagnósticos de doenças hemorrágicas e trombóticas, podem ocasionar erros na conduta clínica e riscos para os pacientes. A maioria dos erros dos resultados de testes de coagulação surge na fase pré-analítica, portanto, garantir a qualidade das amostras coletadas em citrato de sódio é fundamental para se obterem resultados confiáveis. Compreender as fontes de variabilidade pré-analítica e participar de programas educacionais

de melhoria de qualidade otimizam a prestação de serviços do laboratório, sobretudo por resultar em aumento da qualidade dos cuidados com os pacientes.⁽¹²⁾ O documento H21-A5 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽¹³⁾ fornece as orientações para coleta, transporte e processamento de amostras destinadas a testes de coagulação.

Antes de um coagulômetro ser utilizado para analisar amostras de pacientes, ele deve receber uma avaliação completa para analisar seu desempenho analítico, sobretudo, em laboratórios em que se observam ranges analíticos amplos na população atendida. As Tabelas 2, 4 e 5 mostram a imprecisão instrumental do CA-1500. Cada analisador automatizado possui características próprias, sendo, portanto, necessário estudar a melhor maneira de utilizar e operar cada analisador de modo que se extraia o melhor da tecnologia nele empregada. A precisão, reprodutibilidade e arraste encontrados neste estudo para o CA-1500 foi satisfatória, mesmo utilizando amostras patológicas, as quais são frequentemente analisadas por este laboratório. Beckala et al.⁽¹⁴⁾ sugerem que a precisão e reprodutibilidade de um coagulômetro é satisfatória quando os coeficientes de variação forem abaixo de 3% e 5% respectivamente. Portanto, é considerado que se obtiveram excelentes resultados para estes quesitos neste estudo.

Considerando que os valores de CV do *pool* de plasmas de pacientes normais foram semelhantes aos obtidos com o plasma normal liofilizado, obtido comercialmente nos ensaios de reprodutibilidade ao longo de 22 dias, sugere-se que o *pool* de plasmas de pacientes normais pode ser uma alternativa com boa relação custo benefício para a realização do controle de qualidade interno dos testes TP, TTP e TT, corroborando os resultados obtidos por Henneberg et al.⁽¹⁵⁾ utilizando *pool* de plasmas de pacientes normais para controle de qualidade interno do TTP.

Para que um *pool* de plasmas de pacientes normais possa ser utilizado para o controle de qualidade interno da dosagem de fibrinogênio, a sua dosagem deve ser realizada imediatamente após a sua preparação em um coagulômetro devidamente calibrado.

Os valores de arraste obtidos neste estudo foram de 0,75%, 0,50% e 5,65% para TP, TTP e fibrinogênio respectivamente. Yao⁽¹⁰⁾ encontrou os valores de 0,2% e 4,6% para TP e TTP, empregando o CA-1500. O elevado arraste do fibrinogênio talvez possa ter ocorrido pelo fato da amostra alterada (crioprecipitado) possuir um valor muito elevado de fibrinogênio, o qual não é comumente observado em amostras de pacientes. A ausência quase completa de arraste entre amostras é um recurso valioso, especialmente para laboratórios que analisam amostras de diversas fontes, tais como unidades de emergências, clínicas de hematologia e oncologia e unidades de terapia intensiva. O nível de arraste encontrado para o fibrinogênio neste estudo, em uma amostra, não deve colocar em dúvida os resultados do CA-1500, a não ser que estudos prospectivos confirmem tal fato em amostras de vários perfis.

Os resultados de TP dependem da sensibilidade da tromboplastina utilizada, a qual varia de acordo com marcas e lotes diferentes. Em virtude disso, podem haver diferenças no

TP quando se comparam os tempos em segundos ou as porcentagens de atividade da protrombina. Neste sentido, comparou-se, neste estudo, as relações paciente/controle, definidas como R. As Figuras 1 e 2 mostram as correlações entre os R de TP e TTP entre o coagulômetro CA-1500 e o coagulômetro ST4®. Os coeficientes de correlação foram considerados altos ($r \geq 0,90$) para os dois ensaios realizados e sugere-se que tal correlação foi alta em virtude de se utilizarem, para ambos analisadores, os mesmos reagentes, embora ambos possuam diferentes princípios de análise.

O estudo de linearidade foi muito convincente (Figura 3) e o teste t emparelhado produziu probabilidades que ultrapassaram o limite de significância estatística (0,05), assim, não houve diferenças significativas entre os valores teóricos e os valores observados no CA-1500. Contudo, recomenda-se diluir as amostras com valores acima de 650 mg/dL de fibrinogênio ao invés de 700 mg/dL, como sugerido pelo manual do equipamento.

A hemólise não é um achado raro entre as amostras enviadas ao laboratório clínico para testes de coagulação, sendo que a presença ou ausência de hemólise é comumente julgada pelo olho humano e raramente se quantifica na prática a concentração de hemoglobina no plasma a ser analisado. Entre os fatores que podem induzir hemólise nas amostras destacam-se o tempo de garroteamento prolongado, diâmetro estreito da agulha de punção, elevada pressão exercida no êmbolo das seringas, agitação vigorosa das amostras e, até mesmo, tempo e força de centrifugação aumentados.⁽¹⁶⁾

Laga et al.⁽¹⁷⁾ descrevem que as amostras com um valor de hemoglobina do sobrenadante inferior a 0,02 g/dL possuem aspecto claro e são consideradas como não hemolisadas, e as amostras com um valor de hemoglobina sobrenadante de mais de 0,03 g/dL são consideradas como hemolisadas. Neste trabalho empregou-se como a menor concentração de hemoglobina do sobrenadante o valor de 0,06 g/dL e o maior de 1,1 g/dL, conforme Tabela 4.

Neste estudo, foram observadas diferenças significativas na variação dos resultados de TTP e TT conforme se aumentou a concentração de hemoglobina no plasma analisado. Para o TTP, na concentração de 0,06 g/dL, a variação observada foi de 1,37%, e de 6,54% para a concentração de 1,1 g/dL; já para o TT foi de 1,81% e 12,72% respectivamente. Lippi et al.⁽¹⁸⁾ demonstraram que amostras com presença a partir de 0,9% de hemólise influenciaram na confiabilidade dos resultados de TP, TTP, fibrinogênio e D-dímeros, provocando grandes variações nos mesmos em relação aos resultados das respectivas amostras não hemolisadas. Quando se observou hemólise significativa nas amostras deste estudo, os resultados de TTP e TT variaram consideravelmente quando foram realizadas sucessivas análises do mesmo, fato este que pode acarretar em erros de conduta médica. A variação dos resultados de TP em função da hemólise das amostras, diferentemente dos encontrados por Lippi et al.,⁽¹⁸⁾ não foi significativa em nenhuma concentração de hemoglobina plasmática avaliada; contudo, testes em amostras patológicas também devem ser realizados para verificação da variabilidade dos resultados.

Um outro estudo, empregando amostras de indivíduos saudáveis com hemólise induzida *in vitro*, não demonstrou diferenças significativas nos resultados de TP e TTP. Os autores sugeriram que a política de rejeitar amostras hemolisadas para testes de coagulação deve ser revista, pois se as diferenças observadas, quando presentes, forem mínimas, é improvável que sejam consideradas clinicamente significativas e, para isso, cada laboratório deve instituir tais políticas.⁽¹⁷⁾

Recomenda-se, através deste estudo, que amostras muito hemolisadas, de coloração vermelho intenso, sejam recoletadas para confirmação dos resultados. Cabe neste quesito a sugestão de elaboração de uma escala de cor de hemólise, determinante para a rejeição das amostras.

O volume de sangue coletado é fundamental para se obterem resultados precisos nos teste de coagulação. A relação anticoagulante/sangue de 1:9 deve ser sempre mantida.⁽¹³⁾ O uso de seringas torna mais difícil de se obter consistentemente o volume adequado de sangue, sendo preterida em relação à coleta a vácuo. A coleta com seringa também pode produzir variação na força de cisalhamento para as plaquetas. Isto é particularmente importante quando se considera a monitorização da heparina, pois esta força de cisalhamento ativa as plaquetas, podendo haver consumo de alguns fatores da coagulação e resultar em alongamento dos resultados do TTP.⁽¹²⁾ Todavia, a qualidade de uma coleta a vácuo pode variar de acordo com a altitude, temperatura ambiente, data de fabricação do tubo e pressão venosa.⁽¹⁹⁾

Os testes de coagulação requerem uma determinada concentração plasmática de citrato de sódio, que por sua vez controla a quantidade de cálcio ionizado disponível para a coagulação. Se o tubo de citrato está sobrecarregado com sangue, a relação anticoagulante/sangue estará diminuída, resultando em uma disponibilidade excessiva de cálcio ionizado e, artefactualmente, em curtos tempos de coagulação. Por outro lado, em um tubo não preenchido totalmente, a relação estará aumentada, reduzindo a disponibilidade de cálcio ionizado e provocando, artefactualmente, prolongação dos tempos de coagulação.

A análise dos resultados descritos na Tabela 5 mostra que há uma grande variação dos valores dos testes de coagulação conforme se modifica a relação anticoagulante/sangue em relação à proporção 1:9. Esta variação foi mais significativa nas relações 1:1, 1:2 e 1:4,5. O documento H1-A5 do CLSI [NCCLS]⁽¹⁹⁾ preconiza que o preenchimento de $\pm 10\%$ do volume nominal do tubo de citrato é suficiente para manter a exatidão dos testes de coagulação; em contrapartida, este estudo demonstrou que o TT e fibrinogênio sofreram variações significativas quando foram analisadas amostras com volume de 10% acima do nominal. Estas mesmas avaliações devem ser feitas com amostras patológicas no sentido de se confirmarem estas observações. Neste laboratório de hematologia definiu-se, através deste estudo, que amostras coletadas na relação anticoagulante/sangue de 1:4,5 devem ser rejeitadas e recoletadas a fim de evitar falsos resultados.

Já o documento H21-A5 do CLSI⁽¹³⁾ recomenda o uso de citrato de sódio a 3,13% ou 3,2%, apesar de nos últimos anos ter havido uma mudança significativa para a utilização de citrato

a 3,8%. É importante salientar que a inversão do tubo de citrato deve ser feita logo em seguida ao preenchimento do tubo para assegurar uma mistura adequada e evitar a coagulação no tubo. No entanto, um excessivo número de inversões ou vigorosa agitação do tubo pode levar à ativação das plaquetas e alteração artefactual dos testes, especialmente em amostras heparinizadas. Assim, é ideal se invertem suavemente os tubos de 3 a 4 vezes.

A adoção de coagulômetros automatizados melhorou significativamente a qualidade dos resultados; além disso, a evolução contínua destes analisadores vem ampliando consideravelmente a produtividade dos laboratórios, bem como a redução do tempo de liberação dos resultados. No entanto, a atuação de pessoal técnico devidamente qualificado é fundamental. Dados recentes confirmam que a automação permite que laboratórios de análises clínicas melhorem seu desempenho analítico somente se o pessoal técnico operar de acordo com procedimentos operacionais bem definidos, garantindo assim, um acompanhamento contínuo da qualidade analítica. A tecnologia conduz à efetividade de resultados sempre que gerenciada por profissionais comprometidos.

CONCLUSÃO

Um dos principais aspectos do analisador de coagulação CA-1500 é a sua alta produtividade, fato que o torna compatível com grandes rotinas laboratoriais. Os testes realizados neste laboratório têm confirmado estas expectativas, uma vez que este analisador pode processar mais de 80 testes por hora. Com alta capacidade e confiabilidade analítica, o CA-1500 se mostrou, de maneira geral, capaz de satisfazer os requisitos do presente estudo.

Contudo, a plena eficiência dos testes de coagulação somente será alcançada através da ação conjunta entre controle da fase analítica e a implantação de políticas adequadas para avaliação da qualidade total destinadas a reduzir as fontes de variabilidade pré-analítica, desde a identificação do paciente até a coleta e manuseio das amostras.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam agradecer a empresa J.R. EHLKE por gentilmente fornecer os reativos utilizados nos testes de correlação.

REFERÊNCIAS

1. Kitchen S, Mccraw A, Echenagucia M. Diagnosis of hemophilia and other bleeding disorders. 2 ed. Montréal, World Federation of Hemophilia, 2010.
2. Flanders MM, Crist R, Safapour S, Rodgers GM. Evaluation and performance characteristics of the STA-R coagulation analyzer. Clin Chem. 2002;48(9):1622-4.
3. Cembrowski GS. Thoughts on quality-control systems: a laboratorian's perspective. Clin Chem. 1997;43(5):886-92.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers; Approved Guideline. CLSI document H-57A, Wayne, PA, 2008.
5. Fischer F, Appert-Flory A, Jambou D, Toulon P. Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex® CA-7000. Thromb Res. 2006;117(6):721-9.
6. Lee CS, Park CJ, Kang SY, Kim JM, Kim DJ, Cho BC, et al. PT and aPTT Evaluation of automated coagulation analyzer, Sysmex CA-7000. Sysmex Journal International. 2003;13(2):97-103.

7. Levi M, Opal SM. Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Crit Care*. 2006;10(4):222.
8. Mizoe A, Amemiya N, Endo M, Endo T, Kume S. Evaluation of the automated coagulation analyzer CA-6000™ - Particularly on the accuracy of five parameter data. *Sysmex Journal International*. 1996;6(1):56-62.
9. Nicole M. Evaluation of Sysmex CA-7000 automated coagulation analyzer. *Sysmex Journal International*. 2000;10(2):93-5.
10. Yao B. Evaluation of performance of CA-1500 automatic coagulometer. *Acta Universitatis Scientiae Medicinae*, 2001-01.
11. Preston FE, Lippi G, Favaloro EJ, Jayandharan GR, Edison ES, Srivastava A. Quality issues in laboratory haemostasis. *Haemophilia*. 2010;16(Suppl 5):93-9.
12. Lawrence JB. Preanalytical variables in the coagulation laboratory. *Laboratory Medicine*. 2003;34(1):49-56.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition. CLSI document H21-A5, Wayne, PA, 2008.
14. Beckala HR, Leavelle DE, Didisheim P. A Comparison of five manually operated coagulation instruments. *Am J Clin Pathol*. 1978;70 (1): 71-5.
15. Henneberg R, Silva PH, Kopp RL, Nascimento AJ, Correa JR, Dal Molin F. Avaliação do *pool* de plasma caseiro como controle normal para o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTP). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2011;47(1):39-42.
16. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Salvagno GL, Poli G, Guidi GC. Quality and reliability of routine coagulation testing: can we trust that sample? *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17(7):513-9. Comment in: *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18(7):709-11.
17. Laga AC, Cheves TA, Sweeney JD. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(5):748-55.
18. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(2):181-4.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Tubes and Additives for Venous Blood Specimen Collection; Approved Guideline - Fifth Edition. NCCLS document H1-A5, Wayne, PA, 2003.

Autor correspondente
Samuel Ricardo Comar
Seção de Hematologia, Unidade de Apoio diagnóstico do
Hospital de Clínicas
Universidade Federal do Paraná – HC-UFPR
Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória
80060-240 – Curitiba, PR, Brasil
Tel.: (+55 41) 3360-7973
Email: srcomar@ufpr.br

Buccal *Candida albicans* in children with Down's syndrome: prevalence and *in vitro* susceptibility to antifungal drugs by E-test® ribbons method

Candida albicans de cavidade oral de crianças com Síndrome de Down: prevalência e suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas pelo método de fitas de E-test®

Evandro Leão Ribeiro¹, Cerise de Castro Campos¹, Mara Silvia Carvalhaes¹, Clever Gomes Cardoso¹, Wesley Magno Ferreira¹, Meire Maria de Lima², Ana Carolina Bussaco Maranhão², Sueli Meira da Silva Dias¹, Fabiana Cristina Pimenta¹, Orlando Ayrton de Toledo²

Abstract: The anatomic-physiological alterations of the mouth of children with Down's syndrome favor the proliferation of a diversified microbiota. This study aimed to verify the occurrence of *Candida* in buccal mucosa of children with Down's syndrome, from April/2006 to July/2007, and to detect the *in vitro* susceptibility to antifungal drugs by E-test® ribbons method. *C. albicans* was the only species of *Candida* identified in thirty five children with Down's syndrome (87.5%) and in 10 children of the control group (12.5%). All *C. albicans* have shown *in vitro* sensitive to the antifungals employed, especially the polyene drugs with the smallest minimum inhibitory concentrations.

Keywords: *Candida albicans*; Antifungal drugs; Down's syndrome

Resumo: As alterações anatomofisiológicas da cavidade oral de crianças com Síndrome de Down favorecem a proliferação de uma diversificada microbiota. Este estudo objetivou verificar a ocorrência de *Candida* na mucosa bucal de crianças com Síndrome de Down, no período de abril/2006 a julho/2007, e detectar a suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas pelo método de fitas de E-test. *C. albicans* foi a única espécie de *Candida* identificada em trinta e cinco (87,5%) crianças com Síndrome de Down e em 10 (12,5%) crianças do grupo controle. Todas as *C. albicans* mostraram-se sensíveis *in vitro* aos antifúngicos empregados, especialmente as drogas poliênicas com as menores concentrações inibitórias mínimas.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Drogas antifúngicas; Síndrome de Down

INTRODUÇÃO

The buccal floor is an organic cavity inhabited by several microorganisms since man's birth. Its microbiological colonization takes place gradually with the presence of cocci, bacilli and spirochetes in aerobic, optional and obligatory anaerobic conditions, besides enteric bacilli, mycoplasmas and fungi.^(1,2,3) These microorganisms can be isolated gradually from the establishment of the primary to the definitive buccal microbiota throughout children's growth. This dysbiosis is commonly linked to the establishment of pathological processes in the mouth.⁽²⁾ Associated with this microbiological unbalance there are alterations of buccal physical-chemical factors that also favor the rupture of the host-parasite balance as temperature, humidity, oxide-reduction potential, low pH and the amount of topical nutrients.^(1,2,4,5)

Down's syndrome children have buccal cavity anatomic-physiological alterations, macroglossia, saliva stagnation due to muscular incompetence of the mouth, motion difficulty, constant breathing diseases, and immunodeficiency and, also, as additional factors, susceptibility for fungal illnesses.^(1,4,6-8)

Candida yeasts have been detected in the mouth of approximately 69% of Down's syndrome children and 40% of

the cases are linked to buccal candidiasis.⁽⁴⁾ In Brazil, the frequency of children with Down's syndrome is estimated at 1:600 births. The 2000 population census showed that Brazilian infantile population between 0 and 10 years old comprised approximately 36.3 million inhabitants, 60.5 thousand children were bearers of this syndrome, corresponding to approximately 0.2% of the present infantile population.^(1,9) These findings reinforce the importance of understanding the physiopathological mechanisms of the disease in Down's syndrome children to improve their life quality and the relevance for Public Health.⁽⁹⁾

The deficient cognitive skills of Down's syndrome children can affect the correct diagnosis of episodes of fever, migraine, buccal pains and deglutition difficulty, that can happen due to main and/or opportunistic pathogenic manifestations of *Candida* yeasts in infectious processes in the mouth.^(10,11) The clinical observation of the buccal cavity of these children allows the detection of whitish and removable plates that characterize the pseudomembranous aspect of the buccal candidiasis.^(5,10,12,13)

Polyene antibiotics, azole and pyrimidine derivatives constitute the buccal candidiasis therapeutic arsenal, although *Candida* species have been reported resistant to these drugs.

¹Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

²School of Dentistry, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO and School of Dentistry and of Medicine Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil

The first two antifungal groups act on the ergosterol of the fungal cell and the pyrimidine drugs act compromising the formation of RNA necessary for the expression of the fungal proteins.^(6,13-15)

The objective of the present work was to verify the occurrence of *Candida* yeasts in the buccal mucosa of children with Down's syndrome and to detect *in vitro* the susceptibility of *Candida* strains isolated against polyene, azole and pyrimidine drugs.

MATERIAL AND METHODS

Candida samples

Hundred and twenty (120) saliva secretion samples of children with or without the 21st chromosome pathology, used in this work, were due to a case-control study. Saliva secretion samples were collected with a swab from the jugal mucosa of 40 children with Down's syndrome (test group) and 80 ones without the syndrome constituting the control group. All the children presented intact buccal mucosa and were not using any medication. The children belonged to an age group ranging from 0 to 10 years old and were assisted, between April/2006 and July/2007, at the Pediatric Dental Clinic of the School of Dentistry of Universidade Federal de Goiás (CO/FO/UFG) in Goiânia, state of Goiás, Brazil. The present study was previously accepted by the Ethics Committee in the Human and Animal Medical Investigation of the Clinic Hospital of Universidade Federal de Goiás (HC/UFG) and the children's parents or people responsible gave their consent to the investigators in order they could conduct the work.

Isolation and identification

After the homogenization of each saline solution containing saliva secretion, the material was sowed in duplicate in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) with 0.1mg.mL⁻¹ of chloramphenicol and maintained at room temperature for 15 days. The white-yellowish colonies were identified through the presence/absence of germ tube in bovine fetal serum, clamidospores formation in corn-meal agar with tween 80 and biochemical tests (carbon assimilation and fermentation).^(8,10)

It was accomplished by applying the χ^2 (Chi-squared) test to correlate the indexes of oral carriage of *Candida* yeasts in children with and without Down's syndrome. The obtained values were considered statistically significant when $p < 0.05$.

In vitro susceptibility

Candida strains susceptibility tests against antifungal drugs (amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, itraconazole and 5-fluorocytosine) were done *in vitro* by means of E-test® ribbons (ABBIODISK) for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The *Candida* yeasts isolated, after double subsequent cultivations to obtain purity and fungal satisfactory viability, were individually added to 5 mL of sterilized water and the cellular density adjusted on a spectrophotometer to 85% transmittance in 530 nm wavelength, resulting in a solution with an inoculum varying from 0.5×10^2 to 2.5×10^3 CFU/mL (colony forming units per milliliter). The

Petri dishes with one homogenized mixture of 25mL of dextrose agar previously cooled to 45°C and 25 mL of filtered RPMI-1640 agar. After solidification, 0.6 mL of each *Candida* sample was added to the Petri dishes and sowed with a swab. Shortly after absorption of the suspension by the agar, E-test® ribbons of the antifungal drugs used were added and the plates maintained at 30°C for 24 hours. MIC was considered as being the point where the microorganism growth inhibition in the agar intercepted the E-test® ribbon.^(12,15)

RESULTS

Candida was detected in 37.5% (45/120) of the samples, all belonging to the species *C. albicans*. In Down's syndrome group, 87.5% (35/40) of yeasts were isolated, in contrast with only 12.5% (10/80) in the control group (children without the syndrome), thus demonstrating a significant statistical relationship (Table 1). All *Candida albicans* strains from the test and control groups (children with and without Down's syndrome) showed *in vitro* susceptibility to the antifungal drugs used in drug diffusion test by E-test® (Table 2).

Table 1 - Prevalence of *Candida albicans* strains, distributed by age group, isolated from the jugal mucosa of children assisted at the Pediatric Dental Clinic of the School of Dentistry, Universidade Federal de Goiás in Goiânia, GO, Brazil

Age (years)	Children with Down's syndrome (Cw/DS) n = 35 (%) ^a	Children without Down's syndrome (Cw/oDS) n = 10 (%)
0 - 1	01 (2.9)	-
2 - 3	02 (5.7)	02 (20.0)
4 - 5	06 (17.1)	03 (30.0)
6 - 7	10 (28.6)	01 (10.0)
8 - 9	12 (34.3)	01 (10.0)
9 - 10	04 (11.4)	03 (30.0)

Statistical relationship among the groups of Cw/DS and Cw/oDS ($\chi^2 = 64.0; p < 0.05$)

Table 2 - Minimum inhibitory concentration of the antifungal drugs used against *Candida albicans* strains isolated from the jugal mucosa of children assisted at the Pediatric Dental Clinic of the School of Dentistry, Universidade Federal de Goiás in Goiânia-GO/Brazil

Antifungal drugs MIC	Children with Down's syndrome		Children without Down's syndrome	
	Limit of MIC ^a (µg/mL)	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	Limit of MIC (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Amphotericin B	0.023 - 0.50	0.19	0.046 - 1.00	0.25
Ketoconazole	0.064 - 0.75	0.38	0.032 - 1.50	0.75
Fluconazole	0.50 - 4.00	2.00	0.50 - 3.00	1.50
Itraconazole	0.016 - 0.25	0.25	0.032 - 1.00	0.50
5 - fluorocytosine	0.064 - 1.50	0.50	0.032 - 0.75	0.38

^aMIC - minimum inhibitory concentration.

^bIC₅₀ - concentration of the drug able to inhibit the growth of the *C. albicans* strains by 50%.

DISCUSSION

Buccal candidiasis is a fungal infection that affects humans during all their lives. However, childhood and old age stand out as the two most favorable life periods for these yeasts infectious manifestations.^(3,5)

Down's syndrome favours alterations of the buccal cavity of the children whose bear this chromosomal alteration. Such alterations allow the tissue of the mouth to be populated by *Candida* yeasts as colonizing and/or pathogenic microorganisms, as in the case of angular cheilitis, in an incidence of 16% of the children.^(1,2,11) Periodontal disease can be related with microbiological alelobiosis, which includes *Candida* isolates, due to the formation of dental plaque, low buccal hygiene, neutropenic compromising and repair capacity deficiency present in children with this chromosomal mutation (fast bone loss).⁽¹⁾

The low occurrence of dental caries in Down's syndrome children when compared to other pathologies which cause mental retardation, brings the secondary linking of *Candida* to *Streptococcus mutans* as main agents of the cariogenic dental process.^(3,5,11) Another factor that would favour the high carriage of *Candida* in the mouth of children with Down's syndrome is the verification of the physical-chemical alterations of saliva secretion. Variation of salivary pH and sodium, calcium and bicarbonate ions concentration, among other substances, seem to affect *Candida* mouth survival, as it keeps pH oscillation between acidity and alkalinity.^(2,11)

It is also added to this chromosomal alteration, the situation of the immune system of children with Down's syndrome. Neutrophils, T lymphocytes and natural killer cells functions are abnormal, the first ones are associated with lower rates of IgG₂ and IgG₄ immunoglobulins and the others with altered superoxide desmutase favouring the action of *Staphylococcus* and *Candida* as common infectious agents in the mouth.⁽⁹⁾ In our study, we verified that the buccal cavity of these children showed highly carriage of *Candida* yeasts with the prevalence of 87.5%, confirming the high predisposition of these individuals to buccal candidiasis. This prevalence was shown to be statistically significant. Carstedt et al. verified that 69% of the 55 Swedish children and adolescents with Down's syndrome carried *Candida* strains in the mouth as compared to 35% of individuals in the control group.⁽⁴⁾

The available *Candida* infections antifungal treatment includes polyene, azole and pyrimidine drugs. Constant findings of *Candida* yeasts resistant *in vitro* to these drugs constitute a frequent clinical-laboratory concern. Polyene antibiotics may have their pharmacological action reduced by alterations of the fungal plasmatic membrane lipids composition and the fungal catalase activity increased reducing the sensibility to the oxidative damages of these drugs. The azoles, in general, show lower efficacy against *Candida* strains due to the low binding affinity of the 14 α -demetilase to the antifungal drug, added to the increase of its enzymatic activity and high content of ergosterol in the fungus. On the other hand, the fungal resistance to pyrimidine drugs is probably favored by the loss or mutation of any associated enzymes responsible for its conversion and incorporation to the transcription of fungus RNA. In the case of *C. albicans* strains the nucleic acid constitution affected by mutations, inhibit the production of UMP PP-fosforibosil transferase.^(13,14)

The use of *in vitro* susceptibility test against antifungal drugs by E-test® drug diffusion in solid media used in this

study, was performed as a consequence of its easy methodological procedure and also to corroborate with the rules extolled by NCCLS/CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical Laboratory Standards Institute) (Atlanta/USA). However, this method does not yet have E-test® ribbons for antifungal drugs such as nystatin and clotrimazole which have shown to be effective *in vitro* and *in vivo* against buccal candidiasis.^(13,14) In our study, we verified that all *C. albicans* isolates, regardless of the chromosomal alteration witnessed in the children with Down's syndrome, were sensitive *in vitro* to the antifungal drugs. According to Thornsberry and Sabath⁽¹⁵⁾ the IC₅₀ (concentration of the drug able to inhibit the growth of the microorganism by 50%) detected for each drug tested, against the *Candida* yeasts studied, was in agreement with the spectrum of the plasmatic level that each antifungal drug can reach in the human subject (resistance levels for the fungi isolates that present MIC \geq 8 μ g/mL for azole derivatives, MIC \geq 2 μ g/mL for amphotericin B and MIC \geq 64 μ g/mL for 5-fluorcytosine), constituting an effective therapeutic resource for the treatment of buccal candidiasis in the children with Down's syndrome.

REFERENCES

1. Mustacchi Z. Síndrome de Down: aspectos clínicos e odontológicos. Editora CID, São Paulo, 1990.
2. Negroni M. Microbiología estomatológica. Panamericana. Madrid. 1999.
3. Ribeiro EL, Pires CCC, Rocha FP, Castro JS. Carreamento de leveduras de *Candida* na cavidade oral de crianças com síndrome de Down. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31:219.
4. Caslstedt K, Krekmanova L, Dahloff G, Ericsson B, Braathen G, Modeer T. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. Int J Paediatr Dent. 1996;6(2):95-100.
5. Ribeiro EL, Campos CC, Crespo AMC, Castro JS, Rocha FP, Alves M et al. Detecção de *Candida albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. Acta Médica Portuguesa. 2002; 3:171-4.
6. Colombo AL, Barchiesi, F, Mogough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol. 1995;33 (3):535-40
7. Desai SS. Down syndrome: a review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;84(3):279-85.
8. Kregen-van Rij NJW. The yeast: a taxonomic study. Editora Elsevier, Amsterdam, 1984.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo populacional 2000. www.ibge.gov.br. Acesso em 28.09.2007.
10. Bolso G. Doenças infecciosas e parasitárias. Aspectos clínicos. Vigilância epidemiológica e medidas de Controle. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Brasília, 1999.
11. Roncari AM, Rodrigues AB, Elias MS. Síndrome de Down e odontologia. Investigação. 2002;6:70-4.
12. Richardson MD, Warnock DW. Fungal infections. 2nd. Oxford: Blackwell. 1997.
13. Zaitz C, et al. Compêndio de Micologia de Médica. Editora Medsi; Rio de Janeiro, 1998.
14. Ribeiro MA. Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência ao fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
15. Thornsberry C, Sabath LD. Aproximate concentration of antimicrobial agents achieved in blood. In: Manual of Clinical Microbiology. 4a ed. E.H. Lennette A. American Society of Microbiology 1985.

Autor correspondente
Evandro Leão Ribeiro
 Pathogenic Fungi Laboratory,
 Institute of Tropical Pathology and Public Health,
 Universidade Federal de Goiás
 Rua 85A nº 60 Apto 1501, Setor Sul
 74080-020 – Goiânia, GO, Brazil
 evandro0@terra.com.br

Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro

Molecular diagnosis – past, present and future

Gustavo Barcelos Barra, Maria Cecília Sant Anna Soares Borges Caixeta, Patrícia Godoy Garcia Costa
Claudia Ferreira de Sousa, Lara Franciele Ribeiro Velasco

Resumo: Este artigo consiste em uma descrição dos fatos históricos relacionados ao diagnóstico molecular, das técnicas disponíveis e do que se espera para o futuro do setor. Inicialmente, foram abordados as descobertas e os avanços originados dentro dos laboratórios de pesquisa das universidades, onde, efetivamente, nasceram as técnicas de análise de ácidos nucleicos. Posteriormente foi descrita a evolução que estas técnicas vêm sofrendo ao longo do tempo até se chegar ao formato atual, passando pela biologia molecular manual e automatizada, abrangendo, basicamente, a PCR e a PCR tempo real. Além disso, foram discutidas e descritas brevemente outras técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, amplificação de sinal e microarranjos. Por fim, foi apresentado um resumo das principais expectativas em relação ao diagnóstico molecular, considerando seu crescimento, o mercado de análises clínicas e as novas áreas e abordagens.

Palavras-chave: Biologia Molecular; PCR; Genotipagem; Sequenciamento

Abstract: This article is a description of historical events related to molecular diagnosis, the techniques used today, and what the hope for the future of this segment is. First, we turn back to discoveries and advances originated within the research laboratory inside the universities, where the nucleic acid analysis techniques were born and we describe the progress that they have suffered until the current format. Otherwise, this is a brief history from manual molecular biology to automated molecular biology covering mainly PCR, real time PCR. Moreover, we discuss briefly about other techniques for nucleic acid amplification, signal amplification and microarrays. Finally, we make a summary of the main expectations for the molecular diagnosis covering growth, market, new areas and approaches.

Keywords: Molecular biology; PCR; Genotyping, Sequencing

INTRODUÇÃO

A biologia molecular é um setor emergente na medicina laboratorial. Suas análises se baseiam na detecção, identificação e quantificação de ácidos nucleicos (DNA/RNA). Atualmente, as principais áreas de interesse são a detecção de doenças genéticas (X-Frágil, Fibrose Cística *delta F 507*), detecção, identificação e quantificação de microrganismos (HIV, HCV, *Micobacterium tuberculosis*), genotipagem e estudos de vínculo genético. Tais análises são as responsáveis pela maior parte da rotina do setor, auxiliam o diagnóstico e prognóstico de doenças infecciosas e genéticas, além de resolver questões familiares.^(1,2) Ademais, a análise da expressão gênica pela quantificação de RNA, determinação do número de cópias de DNA (dosagem gênica), farmacogenômica, tipagem de HLA, testes pré-implantacionais e análise das condições fetais pela análise do sangue materno representam áreas de interesse em crescimento.⁽¹⁻³⁾ Além disso, o setor se destaca pela sua capacidade inovadora de desenvolver e validar seus próprios exames e criar soluções para pesquisas científicas e clínicas.⁽²⁾

Uma breve revisão sobre o passado, presente e futuro do diagnóstico molecular, desde o desenvolvimento das primeiras ferramentas até a automação do setor e suas perspectivas para o futuro, é apresentado. A Tabela 1 apresenta a

sequência de eventos literários relacionados com o desenvolvimento da biologia molecular

DIAGNÓSTICO MOLECULAR - PASSADO

Por trás do sucesso do setor de biologia molecular no laboratório clínico existem mais de trinta anos de história envolvendo inovações técnicas para análise de ácidos nucleicos. O descobrimento das enzimas de restrição⁽⁴⁻⁶⁾ e da transcriptase reversa,^(7,8) a introdução do "Southern",⁽⁹⁾ "Northern"⁽¹⁰⁾ e "Dot Blotting",⁽¹¹⁾ os métodos de sequenciamento de DNA^(12,13) e uma variedade de outras inovações técnicas promoveram o aparecimento de testes moleculares praticáveis no início dos anos setenta.

Entretanto, foi a descoberta da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sua automação^(14,15) na metade dos anos oitenta que realmente revolucionou a biologia e o diagnóstico molecular. Interessantemente, a primeira descrição da PCR utilizou a técnica para diagnóstico pré-natal dos alelos beta A e beta S da anemia falciforme. A genotipagem envolvia amplificação da região do gene da beta-globina que continha as mutações e digestão de uma sonda marcada radioativamente com enzimas de restrição na presença do produto amplificado. Assim, o genótipo da beta-globina pôde ser determinado em menos de um dia e com menos de um

Tabela 1. Linha de tempo dos principais descobertas no campo da biologia molecular que influenciaram diretamente o diagnóstico molecular

1953	Descoberta da dupla hélice de DNA
1958	Isolamento da DNA polimerase
1960	Primeira técnica de hibridização
1970	Descoberta das enzimas de restrição e transcriptase reversa
1975	Southern Blotting
1977	Sequenciamento de DNA
1983	Primeira síntese de oligonucleotídeos
1984	Descoberta dos minissatélites para identificação humana
1985	Análise por RFLP
1985	Invenção da PCR
1988	DNA polimerase termoestável - otimização da PCR
1990	RT-PCR em um único passo
1990	Extração de Boom
1991	NASBA
1991	Sondas TaqMan
1992	Conceito de PCR em tempo real
1992	UDG para se evitar contaminação em PCR
1993	PCR-hot Start
1994	Captura Híbrida
1994	SYBR green
1996	Microarranjo de DNA
1997	bDNA
2001	Sequenciamento do genoma humano
2005	Automação Biologia Molecular
2007	Sequenciadores de segunda geração

micrograma de DNA genômico.⁽¹⁵⁾ Este tipo de abordagem modelou a forma com que o diagnóstico molecular seria realizado nas duas décadas seguintes, revolucionando a prática clínica e tornando os ácidos nucleicos humanos e de agentes infecciosos mais acessíveis para detecção.

Em seguida, a evolução metodológica da PCR clássica para a PCR em tempo real e o desenvolvimento dos microarranjos de DNA marcaram o início de uma segunda revolução no diagnóstico molecular (iniciada nos anos 90 e que ainda está em andamento).⁽³⁾ Não se pode deixar de ressaltar a técnica de extração de ácidos nucleicos descoberta por Boom,⁽¹⁶⁾ que compõe o princípio da maioria dos kits manuais de extração de ácidos nucleicos e também dos equipamentos automatizados de extração.⁽¹⁷⁾

Para ilustrar os fatos relatados acima, pode-se rever o histórico dos testes de vínculo genético (paternidade). Inicialmente, a análise de vínculo genético necessitava de uma grande quantidade de DNA porque não existia a etapa de amplificação por PCR. Os perfis genéticos, ou seja, as "impressões digitais" moleculares eram obtidas por digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, separação por eletroforese seguida de Southern Blot com uso de sondas radioativas.⁽¹⁸⁾ Desta forma, um caso de paternidade clássico com suposto pai, mãe e filho (trio) poderia ser resolvido em algumas semanas.⁽¹⁹⁾ Posteriormente, com o advento da PCR, a quantidade de DNA inicial necessária para o teste diminuiu, o que permitiu o uso dos "Shorts Tandem Repeats" (STRs),

passando a análise das reações no formato de singleplex ou multiplex, a ser feita em gel de acrilamida, corado com prata.⁽¹⁸⁾ Assim, um caso de paternidade clássico poderia ser resolvido em alguns dias.⁽¹⁹⁾ Atualmente, os kits comerciais necessitam de uma quantidade ínfima de amostra, alguns até inclusive, dispensam a extração de DNA (AmpFISTR® Identifier® Direct PCR Amplification Kit, Life Technologies™). Vários STRs são amplificados simultaneamente em uma única reação de PCR (na maioria das vezes quinze), com *primers* marcados com diferentes fluorescências e analisados por eletroforese e capilar em sequenciadores genéticos como o ABI 3500 (Life technologies™), equipamento já desenhado prevendo o diagnóstico molecular (com rastreabilidade de reagentes, por exemplo), com capacidade de detectar seis fluorescências simultaneamente e revelar o perfil genético dos envolvidos, em um trio de paternidade, em 35-50 minutos.^(18,19)

DIAGNÓSTICO MOLECULAR - PRESENTE

Os exames que envolvem técnicas de biologia molecular são divididos em três etapas (extração, amplificação e análise). Tradicionalmente, no laboratório clínico os ácidos nucleicos são extraídos de amostras como sangue total, líquido amniótico, soro, plasma, urina, tecidos parafinados, raspados bucais, cervicais, e uretrais.^(1,17) Ademais, o DNA fetal circulante no sangue materno é uma oportunidade de análise não invasiva do feto.⁽²⁰⁾

A extração de DNA/RNA é realizada, na grande maioria das vezes, pela técnica de Boom utilizando-se de sílica convencional ou sílica magnética de forma manual ou automatizada.⁽¹⁷⁾ Após a extração, a mistura complexa de ácidos nucleicos extraída é pesquisada pela sequência alvo que se deseja detectar. A sequência amplificada é então analisada diretamente por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida (pesquisa de agentes infecciosos – *Toxoplasma gondii*), ou nestes mesmos géis após digestão com enzimas de restrição (pesquisa de mutações conhecidas – Fator V Leiden), ou por eletroforese capilar (análise de fragmentos para paternidade), ou sequenciada (pesquisa de mutações desconhecidas – BRCA 1 e 2), ou hibridizada contra um microarranjo (genotipagem do HPV), dentre outras.

Na maioria das vezes, estas análises são manuais ou semiautomatizadas. Entretanto, vêm sendo continuamente aperfeiçoadas para que tenham uma melhor performance. Dentre as melhorias, destacam-se o PCR "Hot-Start", os *primers* e sondas modificadas, as novas enzimas e enzimas geneticamente modificadas e os sistemas de detecção semi-automatizados e automatizados.⁽³⁾

Foi observado, há várias décadas, que a PCR geralmente resulta em produtos inespecíficos. Uma das soluções para este problema foi a abordagem "Hot-Start" da PCR, onde a polimerase se torna ativa apenas após alguns minutos à alta temperatura, evitando, assim, a extensão de *primers* anelados parcialmente, que são as principais fontes de produtos inespecíficos.⁽²¹⁻²³⁾ O PCR "Hot-Start" não só melhora a sensibilidade e especificidade da reação como também resulta em ampliações mais robustas, permitindo inclusive

que a reação seja preparada à temperatura ambiente.⁽³⁾ As principais estratégias para se obter o "hot-start" atualmente são a inativação com reagentes químicos, haptâmeros, anticorpos e introdução de mutações na polimerase.^(3,24,25)

Com relação aos *primers* e sondas modificadas, atualmente existe uma série de modificações disponíveis, principalmente, no que diz respeito a fluoróforos e atenuadores. Nas últimas duas décadas, diversos tipos de sondas para detecção e quantificação de ácidos nucleicos foram desenvolvidos; dentre eles destacam-se as sondas de hidrólise (Taq^{Man}™), "Beacons" moleculares, os *primers* "Sunrise", "Scorpions" e "DzyNA".

Um grande avanço tem sido notado na tecnologia das enzimas utilizadas no diagnóstico molecular, principalmente, em relação às enzimas termoestáveis, que desempenham um papel crítico nos métodos de amplificação de ácidos nucleicos, que necessitam de desnaturação do DNA e termociclagem.⁽³⁾ Diversas polimerases termoestáveis já foram geneticamente modificadas e as principais vantagens que apresentam são maior fidelidade e velocidade.^(29,30) A Tabela 2 apresenta uma lista das principais polimerases utilizadas na atualidade. Com relação à velocidade das reações, termocicladores capazes de realizar troca de temperaturas ultrarrápidas (StepOne™ Realtime PCR System - Life technologies™)⁽²⁷⁾ e polimerases ultrarrápidas (Kod DNA polimerase)⁽³¹⁾ já estão disponíveis.

O carregamento de produtos pré-amplificados é uma das principais preocupações de quem executa a PCR, pois podem gerar reações falso-positivas, sendo este o motivo pelo qual o setor de biologia molecular é dividido fisicamente em áreas Pré-PCR, Trans-PCR e Pós-PCR.^(32,33) A enzimologia para PCR avançou também no sentido de se evitar este carregamento. A substituição do deoxitimidina trifosfato (dTTP) pela deoxiuridina trifosfato (dUTP) e a adição da enzima Uracil DNA Glicosilase (UDG) na reação de PCR elimina produtos pré-amplificados que contenham o dUTP, preservando o DNA

nativo da amostra, devido à ação da UDG sobre DNA dupla fita com dUTP, o que não ocorre com o DNA nativo que contém dTTP.⁽³⁴⁾ Atualmente, os "master mixes" comerciais para PCR e PCR em tempo real contemplam o dUTP na sua composição.

As reações de RT-PCR em um único passo (contínua) é também outro avanço importante, pois evita abertura dos tubos para transferência do cDNA para reação de PCR, após sua transcrição reversa, a partir do RNA. A RT-PCR contínua tornou-se viável com o uso de enzimas que apresentam tanto atividade transcriptase reversa quanto DNA polimerase (Tth DNA polimerase) ou com a mistura das duas enzimas envolvidas no processo, a transcriptase reversa (AMV ou MMLV) com uma Taq DNA polimerase "Hot-Start".⁽³⁵⁾ Quando os métodos de RT-PCR foram comparados, o método contínuo com duas enzimas mostrou-se o mais sensível, seguido pela reação de RT-PCR em dois passos (não contínua) e, por fim, o método contínuo com uma única enzima.⁽³⁵⁾ A tecnologia de RT-PCR contínua com duas enzimas foi extremamente importante na detecção do vírus H1N1, durante a pandemia de 2009.

Para aumentar a utilidade diagnóstica de um teste molecular, existe um forte interesse nas reações "multiplex" (onde mais de um DNA/RNA alvo são analisados por reação simultaneamente), assim, uma variedade de novos desenhos analíticos foram introduzidos na rotina laboratorial,⁽³⁾ como, por exemplo, a genotipagem de HPV realizada em micro-arranjos de DNA e que será discutida posteriormente.

Uma importante revolução ocorreu no diagnóstico molecular com o advento do PCR em tempo real. Inicialmente, o funcionamento de uma reação de PCR era semelhante a uma caixa preta. Os reagentes eram misturados com o DNA molde a ser avaliado em um tubo, que, em seguida, era colocado no termociclador. Após algumas horas, se tudo ocorresse bem, uma banda de tamanho esperado apareceria no gel após a eletroforese. Com o advento da técnica de PCR em tempo real, tornou-se possível olhar para dentro do tubo durante o

Tabela 2 - Polimerases mais comuns para PCR ⁽²⁴⁾

	Taq DNA polimerase	Tth DNA polimerase	Fragmento de Stoffel	Fragmento KlenTaq	Pfu DNA polimerase	Kod DNA polimerase
Organismo	<i>Thermus aquaticus</i> YT1	<i>Thermus thermophilus</i> HBB	<i>Thermus aquaticus</i> YT1	<i>Thermus aquaticus</i> YT1	<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Thermococcus Kodakaraensis</i>
Peso molecular	94 kDa	94 kDa	61 kDa	63 kDa	90 kDa	91 kDa
Aminoácidos	832	832	544	555	775	~783
Cadeia polipeptídica	Única	Única	Única	Única	Única	Única
Taxa de extensão	2-4 kb/min	2-4 kb/min	2-4 kb/min	2-4 kb/min	1-2 kb/min	6-8 kb/min
Atividade transcriptase reversa	Mínima/Baixa	Sim, dependente de Mn ²⁺	Mínima/Baixa	Mínima/Baixa	Não	Não
Meia Vida a 95°C	40 min	20 min	80 min	80 min	>4 hrs	2 hrs
Processividade	50-60 bases	30-40 bases	5-10 bases	5-10 bases	15-20 bases	> 300 bases
Atividade 5'-3' exonuclease	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
Atividade 3'-5' exonuclease	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
Incorpora dUTP	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Adiciona A extras	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não

processo e "ver" o que está acontecendo com o DNA molde, à medida que ele vai sendo amplificado, ao longo dos ciclos.^(24,27) Assim, a PCR em tempo real é a coleta contínua de sinal fluorescente de uma ou mais reações de PCR em um intervalo de ciclos. Esta técnica pode ser utilizado tanto para análises qualitativas quanto quantitativas, pois a PCR quantitativa em tempo real é a conversão dos sinais fluorescentes de cada reação em um valor numérico para cada amostra.^(24,27)

O monitoramento em tempo real da reação de PCR pode ser alcançado por uma variedade de moléculas fluorescentes repórteres, como corantes (SYBR Green I) ou sondas de hidrólise (TaqMan™), "Beacons" moleculares, *primers* "Sunrise", "Scorpions" e "DzyNA".⁽²⁴⁻²⁷⁾ Algumas dessas moléculas são repórteres DNA-dupla fita específicos (SYBR Green I), enquanto outros são sequências específicas (TaqMan™).^(24,27)

Desse modo, o PCR em tempo real é considerado homogêneo por combinar a amplificação e análise em um único passo. Anteriormente, discutimos que os testes moleculares consistiam de três etapas (extração, amplificação e análise), o PCR em tempo real combinou as duas últimas etapas e, com isso, diminuiu o tempo de liberação de resultados e aumentou a faixa dinâmica de análise para 10^7 (faixa dinâmica de análise do PCR convencional é 10^3), reduzindo o problema de carreamento de produtos pré-amplificados devido ao fato de ser desnecessário abrir o tubo onde houve a reação de PCR.⁽³⁾ Além disso, esta técnica apresenta outros benefícios no que diz respeito a ensaios diagnósticos. Dispensa manipulação Pós-PCR e a contaminação do laboratório com produtos de PCR é diminuída ou eliminada, permitindo, inclusive, a unificação das áreas Pré-PCR e Pós-PCR. Assim, ensaios mais rápidos, e mais confiáveis podem ser realizados.⁽³⁷⁾

Nos últimos anos, devido às suas vantagens e grande dispersão nos laboratórios, houve um aumento progressivo no número de publicações a respeito de PCR em tempo real (Figura 1-A), demonstrando o ganho de importância da técnica. Para comparação, o número de publicações envolvendo PCR convencional está representado na Figura 1-B.

O aparecimento dos extratores de DNA automatizados, como Nuclisens® easyMag (bioMérieux), QIAcube (Qiagen), QIAxtractor (Qiagen), bem como as plataformas fechadas para testes moleculares como o m2000 real-time system (Abbott), QIASymphony RGQ (Qiagen) e Cobas® 4800 system (Roche), onde amostra primária é colocada no equipamento e todo processo de extração e amplificação é realizado com pouca dependência de um operador, é hoje uma realidade no laboratório clínico.

Outro avanço importante é a análise de variações na sequência de DNA pela curva de desnaturação de alta resolução (HRM). Uma técnica relativamente nova como abordagem diagnóstica. Esta análise é baseada na propriedade fundamental do DNA dupla fita em se desnaturar com o aquecimento da amostra. Geralmente, a análise por HRM tem sido utilizada para detecção de mutações conhecidas e desconhecidas. Sua inclusão nos equipamentos de PCR em tempo real simplificou o processo, aumentou a capacidade de aná-

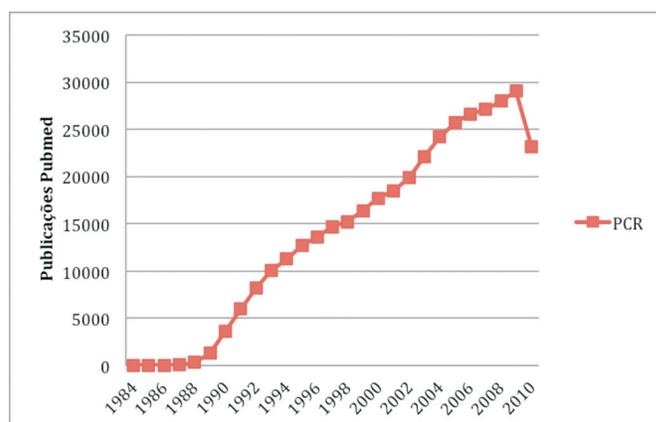
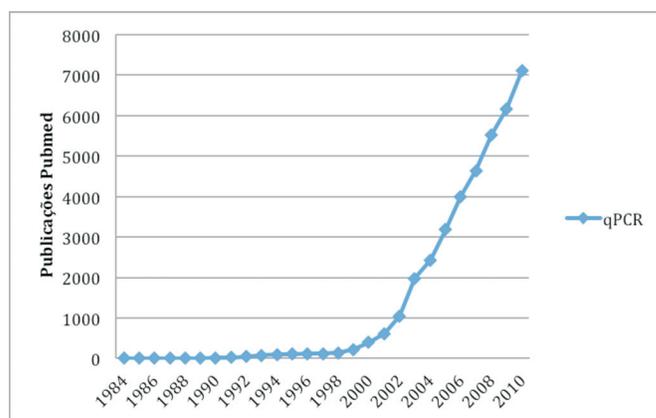


Figura 1. Número de publicações envolvendo as técnicas de PCR em tempo real (A) e PCR (B) no Pubmed do NCBI de 1984 a 2010. Pesquisa para PCR realizada com o termo "Polymerase Chain Reaction" e "PCR". Pesquisa para PCR tempo real realizada com os termos: "Real-time PCR", "qPCR" "real time PCR", e "quantitative PCR" em 19/04/2011.

lises simultâneas, reduziu os custos com reagentes e manteve a análise em tubo fechado, ou seja, um sistema homogêneo. Uma única sonda fluorescente (Simple Probe™), ou um corante ligador de DNA fluorescente (LightCycler Green™), é o suficiente para as análises de HRM.^(39,40)

Com relação aos microarranjos, o impacto desta tecnologia na pesquisa biomédica é comparável ao sequenciamento de DNA e a descoberta da PCR. Sua introdução provocou uma minirrevolução no mundo da ciência e da medicina.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ O conceito dos microarranjos é muito similar ao das técnicas de *blottings*.⁽⁴¹⁾ Por definição, os sistemas e equipamentos de microarranjos realizam várias análises de hibridização de DNA/RNA em paralelo e em um formato miniaturizado, permitindo assim a análise da expressão de mRNAs, polimorfismos no DNA genômico ou genotipagem de patógenos. Estes microarranjos podem ser fabricados sobre suportes de vidro, sílica, ou plástico e contêm centenas de sítios discretos contendo sondas imobilizadas em sua superfície. A análise das reações de hibridização geralmente envolve a detecção do sinal gerado pela ligação da sequência de DNA/RNA alvo, normalmente um produto de PCR, marcado fluorescentemente com as sondas dispostas no microarranjo. Na

maioria das vezes, um escâner de fluorescência é utilizado para analisar o padrão de hibridização formado.⁽⁴²⁾ Atualmente, no Brasil, o principal ensaio envolvendo microarranjos de DNA realiza a genotipagem de HPV em amostras biológicas. O teste conhecido como Papillocheck® (Greiner-bio-one) é capaz de genotipar 24 subtipos de HPV, 18 genótipos de alto risco e seis de baixo, simultaneamente, após a amplificação do DNA HPV por PCR, com *primers* marcados fluorescentemente. Os produtos de PCR são hibridizados contra um microarranjo contendo sequências específicas para os 24 diferentes tipos de HPV detectados pelo exame. A hibridização contra determinado local (ou sítio) do microarranjo indica o genótipo presente na amostra. Uma das principais vantagens da genotipagem de HPV ser realizada em microarranjo de DNA é o fato de permitir a detecção de infecções múltiplas, ou seja, aquelas com mais de um tipo de HPV, que normalmente está associada a um maior risco de progressão para o câncer cervical.⁽⁴⁴⁾

A amplificação de ácidos nucleicos baseada na sequência (NASBA) é uma tecnologia *primer*-dependente que pode ser utilizada para a amplificação contínua de ácidos nucleicos em uma mistura em uma única temperatura.⁽⁴⁵⁾ Imediatamente após sua invenção, o NASBA foi usado para o diagnóstico rápido e quantificação do HIV-1, no soro de pacientes.⁽⁴⁶⁾ Apesar do RNA poder ser amplificado por RT-PCR, a vantagem do NASBA é que se trata de uma reação isotérmica, geralmente na temperatura constante de 41°C, ou seja, dispensa termociclagem exigida na PCR.

Além das técnicas que envolvem amplificação do DNA/RNA existem aquelas que permitem apenas uma forte amplificação de sinal da presença do alvo. Diversas aplicações diagnósticas atuais são dependentes destas técnicas. Que não envolvem amplificação da molécula de DNA/RNA do alvo. Dentre elas, destaca-se o Branched DNA (bDNA) e a captura híbrida.

Nos ensaios de bDNA, a amplificação de sinal é obtida pela ligação de uma grande quantidade de moléculas da enzima fosfatase alcalina na molécula de DNA ou RNA alvo via hibridização de uma série de sondas de oligonucleotídeos. Cada evento de reconhecimento molecular leva à formação de estruturas ramificadas. Estas ramificações contêm a região de reconhecimento para a sonda subsequente e são as responsáveis pela amplificação do sinal indicativo da presença do DNA/RNA alvo.⁽⁴⁷⁾ O bDNA é o terceiro maior método molecular (juntamente com a RT-PCR e o NASBA) para quantificação da carga viral do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e também é usado para determinação da carga viral do HCV e HBV. Para compensar a baixa sensibilidade apresentada pelas versões iniciais do bDNA, uma variação foi desenvolvida e a sensibilidade do sistema atingiu a faixa do zeptomoles, fazendo com que o sistema pudesse rivalizar com o PCR.⁽⁴⁸⁾

A captura híbrida é um ensaio rápido não radioativo, no qual as moléculas de DNA alvo se hibridizam a sondas de RNA específicas. Após uma etapa de hibridização em solução, os híbridos de DNA/RNA formados são capturados por uma superfície sólida coberta com anticorpos específicos anti-híbridos e detectados por um sensível sistema de amplifica-

ção de sinal quimioluminescente.⁽⁴⁹⁾ Ensaios de captura híbrida estão disponíveis comercialmente para detecção de agentes microbianos. A captura híbrida é o principal ensaio para detecção do Papilomavirus humano (HPV) no Brasil e vem sendo gradativamente substituída por técnicas mais modernas e que incluem a genotipagem do HPV, como o Papillocheck®. Entretanto, tanto a captura híbrida quanto o bDNA e outras técnicas de amplificação de sinal, atualmente, vêm sendo gradativamente substituídas pelo PCR tempo real devido às vantagens de um ensaio homogêneo, já descritas anteriormente.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR - FUTURO

O mercado de diagnóstico molecular é o segmento que mais cresce no diagnóstico *in vitro* e está sendo impulsionado por vários fatores. Isto inclui a necessidade de técnicas automatizadas e de fácil manuseio que combinam otimizada a preparação de amostras, a análise e a avaliação de dados. Além disso, há uma crescente disponibilidade de testes moleculares para monitorar a eficácia terapêutica de medicamentos de alto custo. Atualmente, o diagnóstico molecular é um mercado de 2-3 bilhões de dólares, que cresce a uma taxa 25% anuais, e é previsto que atinja 6,4-7 bilhões de dólares em 2012.^(2,50)

Atualmente, os imunoensaios representam aproximadamente 25% do mercado global e o diagnóstico molecular, cerca de 6%. No entanto, este "novo" segmento está pronto para assumir uma parcela maior do diagnóstico *in vitro* nos próximos anos. As doenças infecciosas e a triagem de sangue são os maiores segmentos do diagnóstico molecular (>70%) e deverão crescer a uma taxa anual de 7-8% nos próximos anos. Outros segmentos do mercado incluem a genética tradicional, a medicina personalizada, e o câncer, com 13%, 9% e 8% do mercado nos laboratórios clínicos americanos, respectivamente. Como as doenças infecciosas são um segmento maduro, outras categorias estão crescendo relativamente mais rápido.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

A introdução de novos testes diagnósticos, principalmente na área de doenças infecciosas, manterá o crescimento do setor no curto prazo. Nos países em desenvolvimento, as infecções respiratórias, HIV/AIDS, doenças diarreicas, a malária e tuberculose estão entre as dez principais causas de morte. Os novos testes moleculares devem contemplar os patógenos destas doenças.^(2,50,51)

Por outro lado, o câncer é a segunda causa mais comum de morte, depois das doenças cardiovasculares. E o envelhecimento da população favorece que esta estatística piore. Assim, os testes moleculares para o câncer tendem a crescer nos próximos três a cinco anos. Atualmente, o diagnóstico do câncer é baseado principalmente no imunodiagnóstico para a detecção de marcadores tumorais. Várias empresas estão desenvolvendo testes de predisposição com base nas variações genômicas associadas a fases anteriores do câncer. Além disso, o codesenvolvimento do diagnóstico molecular e terapêutica alvo associados é uma estratégia bem sucedida no desenvolvimento de drogas anticâncer.^(2,50,51)

Os recentes desenvolvimentos no campo da farmacogenômica podem fazer uma evolução rápida entre o diagnóstico da doença e a terapia adaptada às características genéticas de um indivíduo (muitas vezes referida como a medicina personalizada). Embora ainda esteja em desenvolvimento, este segmento tem imenso potencial para se tornar um mercado lucrativo.^(2,50,51)

Os atuais produtos de diagnóstico molecular consistem, principalmente, em testes concebidos em torno de um único marcador associado a um estado de doença. A próxima geração vai empregar ainda mais plataformas "multiplex". Há indícios de que as próximas tecnologias envolverão a medição de vários tipos de biomarcadores simultaneamente (por exemplo, DNA e proteínas). Tais inovações dizem respeito a construções, tais como o *microarrays* DNA/anticorpos, capazes de dosar ácidos nucleicos e proteínas simultaneamente, ou imunoenaios utilizando marcações de ácidos nucleicos, onde os resultados são gerados por PCR (Imuno-PCR). Estes testes devem permitir que os imunoenaios e os testes de ácidos nucleicos sejam realizados em um único equipamento,⁽⁵²⁾ o que pode significar a união dos dois setores.

A nanobiotecnologia e os "biochips" também devem impulsionar o crescimento futuro e fazer uma contribuição significativamente notável para o crescimento do diagnóstico molecular, inclusive com o desenvolvimento de instrumentos portáteis "Point-of-care testing" (POCT) para execução de testes moleculares.^(2,3)

CONCLUSÃO

A partir do exposto, é possível concluir que o diagnóstico molecular é um setor do laboratório clínico em crescimento literalmente exponencial. Adquiriu considerável importância clínica e comercial, nas últimas décadas. Continuamente, novas abordagens e ferramentas dependentes da análise de ácidos nucleicos vêm sendo desenvolvidas. Isto tem impulsionado o crescimento do segmento. O grande destaque nesta década, sem dúvida, é a automação do setor, avanço inimaginável até alguns anos atrás.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial para Dra. Janete Ana Ribeiro Vaz e Dra. Sandra Santana Soares Costa por incentivarem a pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico e inovação na iniciativa privada, disponibilizando recursos do Laboratório Sabin para tal finalidade. Um agradecimento especial também para os demais colegas do Laboratório Sabin que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

REFERÊNCIAS

- Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular diagnostics : for the clinical laboratorian. 2nd ed. Humana Press: Totowa, N. J.; 2006.
- Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. Molecular diagnostics : promises and possibilities. Dordrecht: Springer; 2010.
- Csako G. Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. Clin Chim Acta. [Review]. 2006;363(1-2):6-31.
- Arber W. DNA modification and restriction. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. [Review]. 1974;14(0):1-37.
- Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971; 68(12):2913-7.
- Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. J Mol Biol. 1970;51 (2):379-91.
- Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature. 1970;226(5252):1209-11.
- Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature. 1970;226(5252):1211-3.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 1975;98(3):503-17.
- Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci U S A. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1980; 77(9):5201-5.
- Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucleic Acids Res. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1979;7(6):1541-52.
- Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1977;74 (2):560-4.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12): 5463-7.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155: 335-50.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985;230(4732):1350-4.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990;28(3):495-503.
- Bruns DE, Ashwood ER, Burtis CA. Fundamentals of molecular diagnostics. St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier; 2007.
- Butler JM. Fundamentals of forensic DNA typing. Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier; 2010.
- Sousa CF. Comunicação pessoal - Perita em testes de paternidade. 2011.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1997;350(9076):485-7.
- Ailenberg M, Silverman M. Controlled hot start and improved specificity in carrying out PCR utilizing touch-up and loop incorporated primers (TULIPS). Biotechniques. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000;29(5):1018-20,22-4.
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Res. 1992;20(7):1717-23.
- D'Aquila RT, Bechtel LJ, Videler JA, Eron JJ, Gorczyca P, Kaplan JC. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. Nucleic Acids Res. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1991;19(13):3749.
- Dorak MT. Real-time PCR. New York: Taylor & Francis; 2006.
- Lebedev AV, Paul N, Yee J, Timoshchuk VA, Shum J, Miyagi K, et al. Hot start PCR with heat-activatable primers : a novel approach for improved PCR performance. Nucleic Acids Res. [Evaluation Studies Research Support, N.I.H., Extramural]. 2008;36(20):e131.
- Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2006;363(1-2):32-47.
- Logan J, Edwards K, Saunders N. Real-time PCR : current technology and applications. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2009.
- IDT. Integrated DNA technologies <http://www.idtdna.com>. 2011.
- Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. Trends Biotechnol. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2004;22(5):253-60.
- Kermekchiev MB, Tzekov A, Barnes WM. Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR. Nucleic Acids Res. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003;31(21):6139-47.
- Moore P. PCR: replicating success. Nature. 2005;435(7039):235-8.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature. 1989;339 (6221):237-8.
- Lo YM, Mehal WZ, Fleming KA. False-positive results and the polymerase chain reaction. Lancet. [Letter]. 1988;2(8612):679.
- Pang J, Modlin J, Yolken R. Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based

- amplification of RNA. *Mol Cell Probes*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1992;6(3):251-6.
35. Sellner LN, Turbett GR. Comparison of three RT-PCR methods. *Biotechniques*. [Comparative Study Technical Report]. 1998;25 (2):230-4.
 36. Organization TWH. CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1). 2009. p. 8.
 37. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2004;10(3):190-212.
 38. Mitchelson KR. The use of capillary electrophoresis for DNA polymorphism analysis. *Mol Biotechnol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2003;24(1):41-68.
 39. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. [Review]. 2003;4(11):1120-8.
 40. Gingeras TR, Higuchi R, Kricka LJ, Lo YM, Wittwer CT. Fifty years of molecular (DNA/RNA) diagnostics. *Clin Chem*. [Historical Article]. 2005; 51(3):661-71.
 41. Kurian KM, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. *J Pathol*. [Editorial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1999;187(3):267-71.
 42. Heller MJ. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. [Comparative Study Review]. 2002;4:129-53.
 43. Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem Sci*. [Review]. 1999; 24(5):168-73.
 44. bio-one G. DNA-Chip for the identification of 24 types of genital HPV. 2011 [cited 2011 19/04/2011].
 45. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. [Comparative Study]. 1991;350(6313):91-2.
 46. Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods*. 1991;35(3):273-86.
 47. Collins ML, Irvine B, Tyner D, Fine E, Zayati C, Chang C, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(15):2979-84.
 48. Capaldi S, Getts RC, Jayasena SD. Signal amplification through nucleotide extension and excision on a dendritic DNA platform. *Nucleic Acids Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000; 28(7):E21.
 49. Barlet V, Cohard M, Thelu MA, Chaix MJ, Baccard C, Zarski JP, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum using chemiluminescence: comparison with radioactive solution hybridization assay. *J Virol Methods*. [Comparative Study]. 1994; 49(2):141-51.
 50. The World Market for Molecular Diagnostics - KLI1914575. 2009; Available from: <http://www.kaloramainformation.com/Molecular-Diagnostics-Pre-1914575/>.
 51. Worldwide In Vitro Diagnostics (IVD) Market Research Bundle (Worldwide Market for In Vitro Diagnostic Tests, SNP Genotyping Markets, Companion Diagnostics, Testing Services Markets) - KLI1927625. 2008(October 1).
 52. Rajeevan MS. Immunoassays versus Molecular Diagnostics: Who has the upper hand? *Research Analyst, Healthcare*. 2006(March).

Autor correspondente
Gustavo Barcelos Barra
SEPS 710/910 Sul, loja 03, térreo. Ed. Via Brasil.
Asa Sul
70390-105 – Brasília, DF
Telefone: (61)3901-4635
Email: gbarra@gmail.com / gustavo@sabinonline.com.br

Estudo do líquido pleural: uma revisão

Pleural effusion study: a review

Luiz Fernando de Almeida Fonseca

Resumo: O acúmulo de líquidos em cavidades fechadas do organismo chama-se derrame cavitário. A efusão pleural é o derrame patológico de líquido na cavidade formada pelas membranas mesoteliais que revestem os pulmões. Causas diversas podem originar estes derrames. Transudatos e exsudatos são classificações preliminares de efusões pleurais de acordo com alguns caracteres físico-químicos. Transudatos possuem LDH, proteínas e celularidade menores do que os exsudatos. Culturas para anaeróbios, micobactérias e fungos são solicitadas de acordo com a suspeita clínica e epidemiológica. Dosagens bioquímicas e de marcadores tumorais assim como o estudo citológico, microbiológico e de biologia molecular são bastante úteis para o esclarecimento das causas dos derrames pleurais.

Palavras-chave: Líquido pleural; Transudatos; Exsudatos.

Abstract: The accumulation of fluid in the closed cavities of the body is called spill cavity. The pleural effusion is the pathological spill of liquid into the cavity formed by mesotelial membranes, which recover the lungs. Many causes can origin these various spills. Transudates and exudates are preliminary classifications of pleural effusions according to some physical and chemical characteristics. Transudates have LDH, proteins and cellularity lower than the exsudates. Cultures for anaerobics, mycobacteria and fungi are invited according to epidemiological and clinical suspicion. Biochemical and tumor markers doses rates and so the cytologic study, microbiological study and molecular biology are very helpful to clarify the causes of pleural effusions.

Keywords: Pleural effusion; Transudates; Exudates

INTRODUÇÃO

A cavidade pleural, num organismo sadio, é o espaço virtual entre duas membranas mesoteliais, que delimitam uma pequena quantidade de líquido (aproximadamente 20 mL) que as lubrifica. Esta cavidade só se torna real com o acúmulo patológico de ar, sangue ou de um líquido chamado de cavitário.⁽¹⁾ Uma das membranas constitui a parede da cavidade (membrana parietal) e a outra (membrana visceral) é a que envolve os pulmões. A efusão pleural é formada como ultrafiltrado de plasma e sua produção e reabsorção estão controladas pela pressão hidrostática (pressão sanguínea) e coloidosmótica (concentração de proteínas) exercidas pelos capilares que irrigam a área. Este fluido tem por funções a proteção mecânica do pulmão consequente ao amortecimento proporcionado pela lubrificação e deslize das membranas, o fornecimento de nutrientes e a excreção de catabólitos.⁽²⁾ As membranas mesoteliais pleurais são semelhantes aos túbulos proximais renais quanto ao transporte de cátions, água e resistência elétrica transepitelial, sugerindo a hipótese de que a pleura trabalha como se fora um "túbulo proximal torácico", com um transporte ativo de íons levando a uma dinâmica mais complexa dos fluidos envolvidos pelos mesotélios.⁽³⁾ Diversas causas podem aumentar o volume destes líquidos devido às alterações de pressão hidrostática e coloidosmótica, da permeabilidade de capilares e das membranas, passando a chamar-se o excesso de líquidos de derrame.⁽¹⁾ O aumento do volume de líquidos cavitários causa descon-

forto, compressão, dor e prejudica o funcionamento dos órgãos adjacentes, agravando-se caso haja uma infecção. Como recurso terapêutico e também de diagnóstico etiológico dos derrames, recorre-se à aspiração e ao esvaziamento, onde o líquido extraído pode ser utilizado para diversos exames bioquímicos, citológicos, imunológicos, microbiológicos entre outros.⁽⁴⁾

CLASSIFICAÇÃO DO LÍQUIDO PLEURAL

A classificação dos líquidos cavitários como transudatos ou exsudatos, pela análise do aspecto visual e de algumas características físico-químicas, contribui para a descoberta da causa do derrame. Contudo, esta classificação não pode ser analisada de forma absoluta em virtude de algumas características serem sobrepostas em determinadas patologias. Exsudatos são líquidos que, em geral, têm proteínas totais acima de 3 g/dL e lactato desidrogenase (LDH) relativamente alto em comparação com dosagens séricas. Por outro lado, os transudatos, em geral, possuem proteínas abaixo de 3 g/dL e LDH reduzido. Os transudatos surgem devido à baixa pressão hidrostática na insuficiência cardíaca congestiva ou à reduzida pressão coloidosmótica na nefrose ou cirrose hepática.⁽¹⁾ Em geral, os transudatos não requerem exames mais elucidativos. Já os exsudatos, por terem causas inflamatórias diversas, necessitam de análises mais aprofundadas.⁽²⁾ Não existe teste único para definir se o líquido é um transudato ou um exsudato.⁽⁵⁾ Os médicos recorrem sobretudo às probabili-

dades implícitas nos dados obtidos tanto laboratorialmente como clinicamente.⁽⁶⁾ Somente um conjunto de exames laboratoriais e de investigações clínicas poderia distinguir um transudato de um exsudato.⁽⁷⁾ Foi definido que pelo menos um dos três parâmetros, relatados a seguir, classificam o líquido como um exsudato (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios de Light (1972) para a distinção entre transudatos de exsudatos

Dosagem	Transudato	Exsudato
LDH pleural	Menor ou igual a 200 UI/L	Maior que 200 UI/L
Relação: Proteína pleural/ Proteína sérica	Menor ou igual a 0,5	Maior que 0,5
Relação: Proteína pleural/ Proteína sérica	Menor ou igual a 0,5	Maior que 0,5

Fonte: Referência 39

Observa-se que a combinação dos dois primeiros parâmetros é encontrada em 97% dos exsudatos e que tais critérios estão bem reforçados com diversos estudos clínicos. Constata-se a necessidade de dosagens pareadas no líquido pleural e no soro para que sejam feitas comparações. Existe a possibilidade de que alguns pacientes acometidos de insuficiência cardíaca congestiva, com uso de diuréticos venham apresentando transudatos pleurais e tenham estes líquidos erroneamente classificados como exsudatos. O tratamento com diuréticos, pela depleção de água, concentra a maioria dos componentes do soro e mais ainda do líquido pleural, induzindo a classificação equivocada de transudatos em exsudatos. O gradiente de albumina (soro menos líquido

Tabela 2. Etiologias dos derrames pleurais

Transudatos	Exsudatos
Insuficiência cardíaca congestiva	Neoplasias diversas
Nefrose (hipoalbuminemia)	Infecções (abdominais e pneumonias)
Cirrose hepática hipoalbuminemia)	Tuberculose
5% de neoplasias onde há comprometimento dos mesotélios	Embolia pulmonar

Fontes: Referências adaptadas de 1,7,26

Tabela 3. Derrames pleurais e patologias.

Tipo de derrame	Patologia associada
Quilotórax	Traumas cirúrgicos, linfomas com obstrução do duto torácico
Empiema	Pus no líquido devido às infecções
Empiema	Pus no líquido devido às infecções
Paramaligno	Neoplasias sem comprometimento direto da pleura, mas com obstrução de dutos linfáticos
Maligno	Neoplasias com comprometimento direto da pleura
Benigno	Transudatos em geral (insuficiência cardíaca congestiva, nefrose e cirrose)
Parapneumônico	Pneumonias não complicadas
Pneumônico	Pneumonias complicadas
Urinotórax	Tumores renais e de próstata, gravidez, obstrução e litíase renal e pós-transplante renal

Fontes: Referências adaptadas de 2,5,11,13,14,17,28,40-42

pleural) menor ou igual a 1,2 g/dL classificaria o derrame como um exsudato.⁽⁷⁾ Transudatos e exsudatos têm causas distintas (Tabela 2). Diferentes classes de derrames são relacionadas a diversas patologias (Tabela 3).

COLETA

A coleta de líquido pleural (toracocentese) deve ser realizada em local delimitado após cuidadoso exame clínico confirmado com a radiografia de tórax ou ultrassonografia situando-se na região subescapular e na borda superior do arco costal. O paciente deve estar preferencialmente sentado, com cabeça e braços apoiados em travesseiros sobre uma mesa ou posicionado em decúbito lateral ao lado do respectivo derrame. Recomenda-se esvaziar todo o líquido contido, porém não mais do que 1500 mL devido ao risco de edema pulmonar de re-expansão. O procedimento deve ser interrompido caso haja desconforto respiratório do paciente, tosse ou hipotensão. Não existem contraindicações definitivas para a toracocentese exceto se avistarem alterações severas da coagulação ou se o paciente apresentar lesões de pele como piodermites, herpes ou queimaduras.⁽⁸⁾ Faz-se a assepsia do local da punção com álcool a 70%, iodo a 1% ou 2% ou polivinilpirrolidona-iodo (PVPI a 10%), removendo depois o iodo com álcool a 70% para evitar queimaduras ou reação alérgica.⁽⁹⁾ O transporte do material ao laboratório deve ser dentro de duas horas à temperatura ambiente (20 a 25°C), na própria seringa em que foi colhido ou transferido para um recipiente estéril seco. A coleta em tubos contendo anticoagulantes pode inibir o crescimento de micro-organismos exigentes. O uso de anticoagulantes inibe também uma eventual coagulação do líquido, sinal que poderia ajudar na classificação do derrame como um exsudato.⁽¹⁰⁾

CARACTERES FÍSICOS

A turbidez pode significar uma infecção devido ao aumento de células em suspensão, no entanto o aspecto opalescente mesmo após a centrifugação sugere um derrame quiloso. O aspecto hemorrágico pode sinalizar uma neoplasia, traumas ou mesmo acidente de punção. O quilotórax pode significar o aumento de células, debris ou um alto conteúdo lipídico (triglicerídeos). Um derrame claro ou hemorrágico, porém com alta viscosidade, sugere o mesotelioma e a dosagem elevada de ácido hialurônico é praticamente patognomônica.⁽¹¹⁾

BIOQUÍMICA

O potencial hidrogeniônico (pH): a amostra para determinação de pH pleural deverá ser colhida de forma anaeróbica com seringa heparinizada e transportada em gelo para o laboratório, semelhante à coleta de gasometria arterial. O pH normal do líquido pleural é próximo de 7,64. Um pH menor que 7,3 sugere neoplasia, infecção, colagenose ou inflamação. Faixa de pH entre 7,3 a 7,4 indica condições benignas. Valores de pH abaixo de 7,2 concomitantes às pneumonias

em geral têm prognóstico grave, e valores de pH maiores de 7,4 têm prognóstico favorável mesmo em tumores malignos. Tradicionalmente, a dosagem baixa de pH era determinante para a drenagem de um derrame parapneumônico enquanto que um achado de pH elevado indicava o sucesso do tratamento medicamentoso.⁽¹¹⁾ **Proteínas totais e fracionadas:** a determinação das proteínas totais pelo método do biureto é a técnica clássica para diferenciar os transudatos dos exsudatos, mas este parâmetro isoladamente não deve ser visto como definitivo, pois pode acontecer sobreposição de valores que venham a confundir a diferenciação. A eletroforese de proteínas pode ser usada nos exames de líquido pleural e apresenta perfil semelhante ao soro, permitindo a distinção das várias frações de proteínas. No entanto, a sobreposição de valores nas diversas etiologias e a inespecificidade levam ao desuso deste exame. Proteínas totais acima de 3,0 g/dL podem aparecer em: tuberculose, neoplasias e outras infecções.⁽¹⁾ **Glicose:** útil para o diagnóstico diferencial entre derrame reumatoide e derrame do lúpus eritematoso sistêmico, visto que, nesta última situação, a glicose do líquido pleural é geralmente superior a 60 mg/dL. Derrames reumatoides estão associados à diminuição de glicose no líquido pleural com níveis geralmente abaixo de 10 mg/dL.^(1,12) **Triglicerídeos:** os líquidos quilosos apresentam triglicerídeos entre 110 mg/dL e 2000 mg/dL. Líquidos pseudoquilosos podem ter aumento de globulina-lectina e de colesterol, mas não de triglicerídeos. Entre 60 e 110 mg/dL de triglicerídeos pode haver sobreposição de valores para líquidos quilosos e pseudoquilosos.^(1,13,14) **Colesterol:** o baixo poder de resolução do colesterol para diferenciar transudato de exsudato o contraindica como exame discriminatório único.⁽¹¹⁾ **Lactato desidrogenase (LDH):** a dosagem de LDH é primordial na diferenciação entre transudatos e exsudatos conforme os critérios de Light (Tabela 1). A determinação de isoenzimas da lactato desidrogenase (LDH1 até LDH5), por separação eletroforética pode ser útil nos derrames pleurais de origem indeterminada, como auxiliar na caracterização do exsudatos.⁽¹⁾ **Amilase:** elevações em líquidos pleurais podem aparecer na pancreatite aguda e crônica, pseudocistos pancreáticos, carcinomas e metástases do pâncreas e fístula esofágica (amilase salivar). Interessante observar que derrames pleurais podem ocorrer em cerca de 20% dos casos de pancreatite aguda.⁽¹⁾ **Adenosina desaminase (ADA):** diante da necessidade de um marcador rápido, barato, pouco invasivo e eficaz para a tuberculose, a ADA vem aparecendo como mais um parâmetro bioquímico. A ADA catalisa a transformação de adenosina em inosina e da desoxiadenosina em desoxi-inosina, fazendo parte da proliferação de linfócitos, além da maturação de monócitos.^(1,15) A ADA é considerada um marcador da imunidade celular embora possa estar aumentada em empiemas infecciosos, nos linfomas e nas doenças autoimunes como o lúpus eritematoso.⁽¹⁵⁾ A ADA é encontrada em praticamente todos os tecidos, principalmente no tecido linfóide (células T). As duas isoenzimas da ADA (ADA1 e ADA2) diferenciam-se pelo seu pH ideal de reação, sendo a ADA2 (encontrada em monócitos e macrófagos) a mais específica para o diagnóstico de tuberculose.^(16,17) Foi recomendado o valor de corte adequado da ADA de

35 U/L para o diagnóstico da tuberculose em nosso país devido à alta prevalência deste micro-organismo em nossa população.⁽¹⁸⁾ Não está determinado um valor de corte de consenso mundial para a ADA, devendo este ser definido de acordo com a população estudada, a prevalência da tuberculose e outras doenças relacionadas ao derrame pleural. A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia sugere, entretanto o valor de corte de 40 U/L. Com uma atividade baixa de ADA, num derrame pleural, pode-se praticamente excluir a etiologia por *Mycobacterium tuberculosis*, mas valores elevados devem ser distinguidos de outras causas.⁽¹⁹⁾

MARCADORES TUMORAIS E CITOCINAS

Os marcadores tumorais no líquido pleural são utilizados para o acompanhamento da evolução da doença neoplásica e na diferenciação de alguns carcinomas e do mesotelioma, além de estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico.^(20,21) O câncer de pulmão é responsável por quase 30% dos derrames pleurais malignos, seguindo-se o câncer de mama e os linfomas, que, reunidos, representam 68% das causas de derrames pleurais malignos. O uso de marcadores tumorais isoladamente é bastante controverso devido à baixa sensibilidade e especificidade, porém foi sugerida a sua utilização antes de exames mais profundos e invasivos e nos casos não conclusivos devido à sua promissora relação custo benefício.⁽²²⁾ O tumor de células mesoteliais pode ter seu diagnóstico dificultado por semelhanças com alguns adenocarcinomas, sendo o ácido hialurônico o exame mais indicado na suspeita de mesotelioma. Valores maiores que 0,8 mg/mL são conclusivos.⁽¹⁾ Os marcadores tumorais mais empregados estão relacionados na Tabela 4, com as suas respectivas patologias associadas. **As citocinas:** a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tecidual alfa (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ) são

Tabela 4. Marcadores tumorais e afecções relacionadas.

Marcadores tumorais	Afecções relacionadas
Ácido hialurônico	Mesotelioma
Alfa feto proteína (AFP)	Tumor gastrointestinal, hepatocarcinoma, hepatite, cirrose
Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Adenocarcinoma de cólon e reto, neoplasias de pulmão, trato gastrointestinal, biliar, tireóide, cérvix e mama
CA 15-3	Cânceres de mama, ovário, pulmão, colo uterino, hepatocarcinomas e linfomas
CA 19-9	Cânceres de pâncreas, vesícula biliar, estômago, colorretal, mama, pulmão, cabeça e pescoço
CA 125	Cânceres epiteliais de ovário e gástrico, adenocarcinoma de pulmão e mesotelioma, cirrose, hepatite, pancreatite e endometriose
CYFRA 21-1	Cânceres de células escamosas de pulmão e células pequenas de pulmão, bexiga, cérvix, cabeça e pescoço

Fontes: Referências adaptadas: 1,20,21,22,40

envolvidas na formação de granuloma tuberculoso. Todas as três estão marcadamente elevadas na tuberculose, porém a $\text{IFN-}\gamma$ é a mais específica para esta infecção. A IL-6 possui diagnóstico confuso e o $\text{TNF-}\alpha$ está elevado em outras situações como malignidade e derrames parapneumônicos.⁽²³⁾ A formação de granulomas tuberculosos acontece devido à resistência da micobactéria aos efeitos dos macrófagos. Ocorre uma reação inflamatória local onde os macrófagos infectados fundem-se e são envolvidos por linfócitos T na tentativa de isolar a infecção do resto do organismo.⁽²⁴⁾ Níveis de $\text{IFN-}\gamma$ pleurais podem ser usados de maneira similares às dosagens de ADA no líquido pleural para o estabelecimento de diagnóstico de tuberculose com razoável certeza, sendo sugerido o ponto de corte de 200 pg/mL de $\text{IFN-}\gamma$ para a tuberculose.⁽¹¹⁾

CITOLOGIA

Citologia inflamatória: as lâminas para leitura de citologia inflamatória devem ser feitas de preferência utilizando uma citocentrífuga. A contagem global de leucócitos pode ser processada em câmara de Neubauer ou em aparelho automatizado desde que sejam descontadas as células nucleadas que não os leucócitos. A coloração é realizada com os corantes habitualmente usados na hematologia. A contagem diferencial de leucócitos num líquido pleural infectado apresenta valor limitado, pois revela o estágio atual de uma infecção. Uma neutrofilia demonstra uma infecção bacteriana ou viral na fase inicial e até mesmo tuberculose aguda. A neutrofilia pode também sinalizar doenças inflamatórias, porém não infecciosas. Por outro lado a linfocitose indica as condições subaguda ou crônica da doença e devem ser diferenciadas de tuberculose, malignidade e doença viral.⁽¹⁶⁾ Citologia oncótica: o procedimento para a preservação do líquido para a realização da citologia oncótica é questionável. O álcool a 90° ou formol podem prejudicar a observação da morfologia celular. A refrigeração da amostra (8°C) por até cinco dias após a coleta, sem qualquer conservante, parece ser o procedimento mais adequado.^(1,25) A descoberta de células neoplásicas pela toracocentese ou pela biópsia da pleura parietal é uma indicação de metástase ou tumor local. A variação da eficácia da citologia oncótica (40% a 87%) reportada na literatura é atribuída a diversos fatores como: tipo histológico do tumor, capacidade de esfoliação das células, técnica usada no processamento da amostra, número de lâminas examinadas, perícia do citologista e a extensão da doença.^(21,26) A imunocitoquímica com anticorpos marcadores tumorais e a análise cromossômica são auxiliares diagnósticos, porém apresentam baixa sensibilidade e especificidade. A identificação destes marcadores tem a utilidade de diferenciar mesoteliomas de adenocarcinomas metastáticos. O advento de novas tecnologias como a citometria de fluxo tem contribuído para um estudo mais aprimorado de células em suspensão tanto no sangue como nos líquidos cavitários. Uma variedade enorme de corantes fluorescentes e anticorpos são utilizados para marcar as células a serem pesquisadas nas suspensões através da citometria de fluxo. Populações de células são marcadas e

quantificadas automaticamente através de um estudo multiparamétrico.⁽¹⁾

MICROBIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR

Diversos tipos de micro-organismos entre bactérias e fungos podem infectar cavidades do corpo e quanto maior o volume do material encaminhado para a cultura melhor o índice de positividade já que a concentração de micro-organismos na amostra pode ser muito baixa. Nos empiemas pleurais encontramos bacilos Gram negativos diversos, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella spp.* e *Mycobacterium tuberculosis*.⁽¹⁰⁾ A discrepância entre culturas negativas e bactérias visualizadas pela coloração de Gram pode ser explicada pela existência de micro-organismos exigentes como anaeróbios e micobactérias ou mesmo pelo uso concomitante de antimicrobianos. Recomenda-se a elaboração da coloração de Gram no líquido centrifugado como diagnóstico prévio. O crescimento em meios de cultura sem a visualização de bactérias na coloração prévia pelo Gram seria devido à baixa concentração de micro-organismos na amostra.⁽²⁷⁾ A semeadura deve ser feita dentro de duas horas após a coleta. Para a conservação da amostra antes da semeadura, recomenda-se a temperatura ambiente de 20 a 25°C.^(10,25) Sugere-se que a amostra seja inoculada em meios para hemocultura (aeróbios, anaeróbios, micobactérias e fungos). A falha no isolamento de microrganismos em líquidos cavitários pode ser pela defesa imunológica eficiente do hospedeiro, baixa concentração de micro-organismos, semeaduras em meios de cultura inadequados ou a não utilização de meios e condições para anaeróbios, fungos e ou micobactérias além do uso de antibióticos antes da coleta para cultura.^(27,28) Cerca de 10% a 20% dos derrames têm causas indefinidas, e a cultura para anaeróbios e fungos nos empiemas crônicos de difícil resolução é imperativa.⁽²⁸⁾ A infecção pelo *Streptococcus pneumoniae* é a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo, originando meningites, pneumonia adquirida na comunidade, bacteriemia e otite média aguda.^(25,29) Uma vez feito o diagnóstico clínico de pneumonia, o laboratório pode ajudar com a definição do agente e da terapia adequada.⁽³⁰⁾ Há a necessidade da detecção, identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos frente ao *Streptococcus pneumoniae*, devido às taxas crescentes de resistência.^(31,32)

Um outro agente de pneumonia bacteriana é a *Legionella pneumophila*. Semelhanças sintomatológicas com a pneumonia pneumocócica tornam a cultura essencial na diferenciação de um micro-organismo do outro.⁽³³⁾ Entre as raras infecções fúngicas do espaço pleural relatadas na literatura temos a zigomicose por *Rhizopus spp.*, muito frequente em pacientes imunocomprometidos e associada a alguns fatores predisponentes como *diabetes mellitus*, cetoacidose, distúrbios metabólicos e uso de imunossupressores.⁽³⁴⁾ As infecções por *Coccidioides immitis* quando limitadas ao pulmão apresentam uma forte resposta inflamatória e, conseqüentemente, um intenso extravasamento de líquido pleural. Pacientes com coccidioidomicose disseminada têm menor resposta inflamatória e menor produção de líquido pleural.⁽³⁵⁾ O derra-

me pleural tuberculoso representa o processo inflamatório de hipersensibilidade celular tardia onde há bacilos ou antígenos no espaço pleural. O rendimento da baciloscopia direta do líquido pleural tem sido próximo de zero e a positividade de cultura em Löwenstein-Jensen de 10% a 35%.⁽³⁶⁾ Acredita-se que a incidência da doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas apresente-se subestimada devido ao fato da não identificação rotineira do micro-organismo ou porque esteja sendo tratada como *Mycobacterium tuberculosis*. A doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas (o complexo *Mycobacterium avium* e o *Mycobacterium kansasii*) ocorre geralmente em pacientes imunossuprimidos (portadores de HIV, doenças linfoproliferativas ou pós-transplantes), assim como em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, pneumoconioses, bronquiectasias ou história pregressa de tuberculose.^(36,37) Métodos moleculares podem ser utilizados no diagnóstico etiológico do derrame pleural para a tuberculose, entretanto as discrepâncias quanto à sensibilidade e especificidade entre diversos métodos utilizados como o PCR estão relacionadas às concentrações de bacilos existentes, aos métodos de extração de DNA e na adequação da escolha dos "primers" (sondas de ácido nucleico).^(17,38)

DISCUSSÃO

O estudo do líquido pleural fornece um grande auxílio diagnóstico para o médico além de ser de baixo risco e pouco invasivo para o paciente. Algumas dosagens bioquímicas podem esclarecer as causas dos derrames: as dosagens de LDH e proteínas no líquido pleural e no soro definem os derrames como transudatos ou exsudatos orientando a necessidade de pesquisa mais aprofundada da etiologia das doenças. A dosagem de ADA surge como um exame promissor para o diagnóstico da tuberculose assim como a biologia molecular. Marcadores tumorais diversos podem ser usados para o acompanhamento da evolução e tratamento de neoplasias. Culturas para anaeróbios e fungos são indicadas quando há fracasso no tratamento ou quando há forte suspeita clínica destas infecções. Culturas para micobactérias são sugeridas onde há grande prevalência destas doenças na população. A execução de bacterioscopia (Gram) e de baciloscopia (Ziehl-Neelsen) são, apesar de baixa sensibilidade e especificidade, auxiliares no diagnóstico, mas não excluem as culturas. A citologia oncótica pode definir a presença e o tipo de neoplasia, sendo menos invasiva que a biópsia de pleura. A citometria de fluxo aprimora o estudo citológico e caracteriza diversas populações celulares. A citologia inflamatória ajuda na caracterização do tipo e da evolução do derrame, principalmente aqueles de origem infecciosa.

CONCLUSÃO

O exame do líquido pleural pode fornecer inúmeras informações a respeito da etiologia e da evolução do quadro clínico do paciente. Aliado a outros protocolos de diagnóstico laboratorial é uma ferramenta importante na elucidação de patologia pulmonares.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Esp. João Lycio Conceição Filho pela orientação e cuidadosa revisão deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Bibbo M, Longatto A. Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derrames Cavitários: Conduta terapêutica e avaliações diagnósticas e prognósticas. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- Strasinger SK. Uroanálise e fluidos biológicos: texto auto-instrucional. 2a. ed. São Paulo: Panamericana, 1991.
- Gourgoulis KI, Hatzoglou C, Molyvdas PA. Functional similarities between pleura and the renal proximal tubule-membrane and cellular considerations. Med Hypotheses. 2005;64(1):83-5.
- Miller O, Pecego GF, Penteado JF, Alves JMR, Gonçalves RR. Laboratório para o clínico, 8a. ed. São Paulo: Atheneu, 1995.
- Atalay F, Ernam D, Hasanoglu HC, Karalezli A, Kaplan Ö. Pleural adenosine deaminase in the separation of transudative and exudative pleural effusions. Clin Biochem. 2005;38(12):1066-7.
- Porcel JM, Peña JM, Vicente de Vera C, Esquerda A, Vives M, Light RW. Bayesian analysis using continuous likelihood ratios for identifying pleural exudates. Respir Med. 2006;100(11):1960-5.
- Maranhão B, Silva-Jr CT, Cardoso G P. Critérios bioquímicos para classificar transudatos e exsudatos pleurais. Pulmão RJ. 2005 14(4):315-20.
- Sales R, Onishi R. Toracocentese e biópsia pleural. J Bras Pneumol. 2006;32(Supl 4): S170-S173.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica. Módulo III, 2004.
- Oplustil C, et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2a. ed., São Paulo: Sarvier, 2004.
- Burgess LJ. Biochemical analysis of pleural, peritoneal and pericardial effusions. Clin Chim Acta. 2004;343(1-2):61-84.
- Henry JB, et al. Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais, Todd, Sanford & Davidsohn, 16a. ed. São Paulo: Manole, 1982, v.1.
- Sahn SA. Pleural effusions of extravascular origin. Clin Chest Med. 2006;27(2):285-308.
- Vaz MA, Fernandes PR. Quilotórax. J Bras Pneumol. 2006; 32(Supl 4):S197-S203.
- Coitinho C, San Martín R, Mier C, Rodríguez R, Zunino ST, Rivas C. Utilidad de la dosificación de adenosindesamina em el diagnóstico de la tuberculosis pleural: primera experiencia nacional. Revista Medica Uruguaya. 2007;23 (1):19-24.
- Segura RM. Useful clinical biological markers in diagnosis of pleural effusions in children. Paediatr Respir Rev. 2004;5(Suppl A):S205-12.
- Valdés L, Pose A, San José E, Vázquez JM. Tuberculous pleural effusions. Eur J Intern Med. 2003 Mar;14(2):77-88.
- Kaisemann MC, Kristski AL, Pereira MFC, Trajman A. Dosagem da atividade da adenosina deaminase no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose pleural. J Bras Pneumol. 2004; 30(6):549-56.
- Neves DD, Silva-Jr CT, Preza PC, Morisson P. Dosagem da atividade da adenosina desaminase (ADA) / Adenosine deaminase activity (ADA) measurement. Pulmão RJ. 2004;13(3):182-9.
- Almeida JR, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TR, Carvalho VH, Cardoso AA. Marcadores tumorais: revisão de literatura. Revista Brasileira de Cancerologia. 2007;53(3):305-16.
- Teixeira LR, Pinto JA, Marchi E. J Bras Pneumol. 2006;32(Suppl 4):S182-9. [Portuguese].
- Wagner IC, Guimaraes MJ, Silva LK, et al. Avaliação dos valores sérico e pleural dos marcadores tumorais CEA, CYFRA21-1 e CA 15-3 em portadores de derrame pleural. J Bras Pneumol. 2007; 33(2): p.185-91.
- Wong CF, Yew WW, Leung SK, Chan CY, Hui M, Au-Yeang C, et al. Assay of pleural fluid interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in the diagnosis and outcome correlation of tuberculous effusion. Respir Med. 2003.97(12):1289-95.
- Janeway-Jr, CA, et al. Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- Antonangelo L, Capelozzi VL. Coleta e preservação do líquido pleural e biópsia pleural. J Bras Pneumol. 2006;32(Supl 4):S163-S169.
- Antonangelo L, Vargas FS, Seiscento M, Bombarda S, Teixeira L, Sales RK. Clinical and laboratory parameters in the differential diagnosis of pleural effusion secondary to tuberculosis or cancer. Clinics. 2007;62(5):585-90.
- Daur AV, Cogo LL, Botão GD, Dalla Costa LM, Klimak-Jr F, Monteiro CL. Sensibilidade da coloração de Gram no diagnóstico prévio das infecções em sítios corporais estéreis. Visão Acadêmica, Curitiba. 2004;5(2):91-4.

28. Genofre E, Chibante AMS, Macedo AG. Derrame pleural de origem indeterminada. *J Bras Pneumol.* 2006;32(Supl 4):S204-210.
29. Mantese OC, Paula A, Moraes AB, Moreira TA, Guerra ML, Brandileone MC. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas de *Streptococcus pneumoniae*. *J Pediatr (Rio J).* 2003;79(6): 537-42.
30. Winn-Jr. WC, et al. Konemann, Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido, 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
31. Rossi F, Andraezzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.
32. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis.* 2000;182(2):490-6.
33. Godet C, Frat JP, Le Moal G, Roblot F, Michalakis G, Cabon E, et al. Legionnaire's pneumonia: Is there really an interstitial disease? *Eur J Radiol.* 2007;61(1):150-3.
34. Lewejohann J, Muhl E, Birth M, Kujath P, Bruch HP. Pulmonary zygomycosis - a rare angioinvasive fungal infection. *Mycoses.* 2005;48(Suppl 1):99-107. German.
35. Merchant M, Romero AO, Libke RD, Joseph J. Pleura effusion in hospitalized patients with *Coccidioidomycosis*. *Respir Med.* 2008; 102(4):537-40.
36. Seiscento M, Conde MB, Dalcomo MM. Tuberculous pleural effusions. *J Bras Pneumol.* 2006;32(Supl 4):S174-S181.
37. Seiscento M, Bombarda S, Carvalho AC, Campos JR, Teixeira L. Pleural effusion caused by nontuberculous mycobacteria. *J Bras Pneumol.* 2005;31(5):459-63.
38. Shibuya Y, Shiozaki T, Hayashi M, Sugiyama Y. Efficacy of Amplicor PCR for the diagnosis of tuberculosis in respiratory specimens other than sputum. *Tuber Lung Dis.* 2000;80(4-5):209-15.
39. Light RW, Mcgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exsudates. *Ann Intern Med.* 1972;77(4):507-13.
40. Kuralay F, Tokgöz Z, Cömlekci A. Diagnostic usefulness of tumor marker levels in pleural effusions of malignant and benign origin. *Clin Chim Acta.* 2000;300(1-2):43-55.
41. Marchi E, Lundgren F, Mussi R. Parapneumonic effusion and empyema. *J Bras Pneumol.* 2006;32(Supl 4):S190-6. [Portuguese].
42. Paganini H, Guiñazú JR, Hernández C, Lopardo H, Gonzalez F, Berberian G. Comparative analysis of outcome and clinical features in children with pleural empyema caused by penicilin-nonsusceptible and penicilin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Infect Dis.* 2001;5(2):86-8.

Autor correspondente

Luiz Fernando de Almeida Fonseca

Rua Barros Falcão, 60 – Matatu

40255-370 – Salvador, BA

Fone: (071) 3381-3281

labfonsecaltda@ig.com.br

Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas

Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples of Curitiba and metropolitan region (Paraná, Brazil), and susceptibility antifungal testing

Mauricio Cichon¹, Vânia Aparecida Vicente¹, Marisol Domingues Muro², Gisele Pesquero Fernandes Bordignon³, Flávio de Queiroz-Telles^{1,3}

Resumo: Criptococose é uma doença causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, está intimamente ligada a pessoas imunodeprimidas, quer seja por drogas imunossupressoras administradas pós-transplantes ou por doenças imunodepressoras como a SIDA. A doença origina-se pela penetração do fungo através das vias aéreas superiores, seguindo para os pulmões, acometendo o paciente com uma pneumonia criptocócica, com posterior disseminação do microrganismo pela via hematogênica, chegando ao sistema nervoso central e até as meninges, originando uma meningite criptocócica. As amostras analisadas neste estudo são provenientes de restos vegetais, areia de galinheiros, fezes de morcegos, restos vegetais de eucaliptos como folhas e caules, e, principalmente, fezes de pombos. A análise de 88 amostras de diferentes materiais orgânicos resultou em 11 amostras positivas para o desenvolvimento da levedura. Os 11 isolados foram testados quanto à sensibilidade frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol. *C. neoformans* não apresentou resistência às drogas testadas e as concentrações mínimas inibitórias encontradas foram: CIM de 0,03 a 1 µg/mL para anfotericina B (média de 0,515 µg/mL), CIM de 0,125 µg/mL para fluconazol e CIM de 0,03 µg/mL para itraconazol.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*; Pombos; Isolamento ambiental; Antifúngicos

Abstract: Cryptococcosis is a fungal disease caused by *Cryptococcus neoformans* is closely with the immunodepressed people, as for immunodeletion drugs managed after-transplants as immunosuppressives diseases, the illness where originates for the inoculation of fungus through the superior airways, in the lung causes the patient with a cryptococcal pneumonia, and follow dissemination of the microorganism for the hematogênica way arriving at the central nervous system and until meninges, originating a cryptococcal meningitis. The samples analyzed in this study are proceeding from vegetal remaining portions, sand of poulterer, excrements of bats, vegetal remaining portions of eucalyptus as leaves and stem. The analysis of 88 samples of different organic materials resulted in 11 positive samples for the development of the yeast. The 11 isolated ones had been tested to sensitivity antifungal for amphotericin B, fluconazole and itraconazole. *C. neoformans* did not present resistance to the tested drugs: the minimum inhibitory concentrations was founded: MIC of 0,03 to 1 µg/mL for amphotericin B (average of 0,515 µg/mL), CIM of 0,125 µg/mL for fluconazole and CIM of 0,03 µg/mL for itraconazole.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; Pigeon; Isolation; Antifungal

INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, que apresenta tropismo pelo sistema nervoso central (SNC).⁽¹⁾

C. neoformans foi usualmente classificado dentro de três variedades, sendo elas: *C. neoformans* variedade *neoformans*, *C. neoformans* variedade *gattii* e *C. neoformans* variedade *grubii*. Entretanto, estudos baseados em análise molecular indicam que essas três variedades devem ser reconhecidas como espécies distintas.^(2,3,4)

Filiu et al.⁽⁵⁾ desenvolveram na cidade de Campo Grande um trabalho demonstrando a presença do *C. neoformans* em excretas secas e envelhecidas de pombos presentes em ambientes urbanos, assim, como de aves em cativeiro. Silva

et al.⁽⁶⁾ em Ribeirão Preto, e Reolon et al.⁽¹⁾, em Porto Alegre, isolaram *Cryptococcus* sp. e *C. neoformans* de excretas de pombo, respectivamente. Baroni et al.⁽²⁾ encontraram 37,8% de amostras positivas para o desenvolvimento do *C. neoformans* em excretas de pombos abrigadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro.^(1,2,5-9)

Lazéra et al.⁽¹⁰⁾ analisaram 32 ocos de árvores e isolaram 123 colônias de *C. neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Costa et al.⁽¹¹⁾ obtiveram isolamento ambiental de ambas as espécies em oco de *Senna siamea* na cidade de Belém. Estes estudos sugerem que estes locais sejam possíveis nichos ecológicos para estas espécies.^(10,11)

Cryptococcus gattii é conhecido por sua associação com matéria orgânica viva, normalmente esta espécie prefere regiões com clima tropical e subtropical.⁽¹²⁾ Por outro lado,

¹Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

²Laboratório de Micologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

³Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Ribeiro et al. e outros autores sugerem sua associação também a regiões de clima temperado.^(9,13,14,15) Na Austrália, sua presença foi inicialmente associada à matéria orgânica do *Eucalyptus camaldulensis*.⁽¹³⁾ No Brasil, *C. gattii* foi isolado de oco de árvores tropicais como o oiti (*Moquilea tomentosa*), cássia rosa (*Cassia grandis*) e a figueira (*Ficus microcarpa*).⁽¹⁵⁾

Kobayashi et al., em seu estudo, demonstraram que fezes de pombos desidratadas favorecem o desenvolvimento do *C. neoformans*, uma vez que o microrganismo é resistente a esta condição. Neste trabalho, a espécie *Cryptococcus grubii* foi a mais encontrada.⁽¹⁶⁾ Kobayashi et al.⁽¹⁶⁾ e Rezende et al.⁽¹⁷⁾ explicam que fezes de pombos coletadas em ambientes úmidos não apresentam o desenvolvimento do *C. neoformans*, já que este ambiente favorece o desenvolvimento de bactérias que alcalinizam as fezes inibindo o desenvolvimento do *C. neoformans*.

Em pombos, devido à alta temperatura corporal destas aves, a criptococose clínica é raramente observada, porém, o trato digestivo dos pombos pode estar colonizado por *C. neoformans* e, quando estes são excretados, apresentam-se viáveis junto com as fezes. Sugere-se também que a excreta de pombos enriqueça nutricionalmente o solo, fornecendo nutrientes para o desenvolvimento do *C. neoformans* presente no ambiente.^(17,18)

O gênero *Cryptococcus* normalmente tem apresentado baixa resistência *in vitro* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluocitocina.^(19,20,21)

MATERIAL E MÉTODOS

Período de coleta, amostras coletadas e população estudada

O período de coleta das amostras durou 13 meses, iniciando-se em setembro de 2004. As amostras foram obtidas nas cidades de Curitiba e Pinhais (região Metropolitana). Os locais de coleta apresentavam acúmulo de fezes, grande população de pombos e materiais vegetais (Quadro 1). Foram coletadas amostras de fezes de pombos e morcegos, terra e areia com excrementos e materiais orgânicos. As amostras selecionadas continham aproximadamente 30 gramas e foram coletadas com auxílio de espátulas de madeira e acondi-

Quadro 1. Relação entre o local de realização da coleta e amostra coletada

Local de coleta	Amostra coletada
Centro esportivo	Fezes de pombos
Campus universitário	Fragmentos de eucaliptos
Condomínio residencial	Fezes de pombos
Galinheiros	Areia e terra
Hospital Universitário e arredores	Fezes de pombos
Centro de distribuição de alimentos	Fezes de pombos
Parque 01	Material vegetal
Parque 02	Fezes de pombos
Praça 01	Fezes de pombos
Praça 02	Fezes de pombos
Praça 03	Fezes de pombos
Moinho de trigo (Pinhais)	Fezes de pombos
Prédio residencial	Fezes de morcegos

cionadas em coletores plásticos esterilizados. O processamento foi realizado no laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

Procedimentos de isolamento e identificação do *C. neoformans*

Para o isolamento foi utilizado o método de Staib modificado, que consiste em diluir 30 gramas da amostra coletada em 40 mL de solução salina esterilizada. Após decantação do material, 100 µL do sobrenadante foi semeado em placas de petri contendo o meio de cultivo ágar Níger (cada amostra em triplicata), o qual possui extrato da semente de Níger (*Guizotia abyssinica*). A placa semeada foi incubada a 30°C por uma semana, o crescimento foi monitorado diariamente.^(17,22,23) A identificação dos isolados foi realizada por métodos morfológicos e fisiológicos. Dentre os testes fisiológicos, pesquisou-se a ação da urease, capacidade de assimilação de carboidratos (auxanograma), além da pesquisa da enzima fenol-oxidase feita inicialmente no ágar de isolamento.^(4,5,11,14,15,18,24,25)

Para identificação presuntiva de *C. gattii*, os isolados foram semeados em ágar CGB (Cavanina, Glicina e azul de bromotimol). Este meio permite a determinação da espécie de *Cryptococcus* isolado, já que o *C. neoformans* não consegue crescer na presença de L-Cavanina; por outro lado, o *C. gattii*, converte este aminoácido em um metabólito não tóxico.^(5,10,14,19,26-28)

Testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas

Este trabalho utilizou a metodologia recomendada pelo CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute), documento M27 A2.^(20,25,29-32)

Os isolados foram testados quanto à sua sensibilidade frente a antifúngicos utilizando-se o método de microdiluição em meio de cultivo celular RPMI 1640 (Sigma) tamponado com MOPS (ácido 3 (N-morfolino) propanosulfônico). A determinação de concentração mínima inibitória para cada droga avaliada foi baseada no documento acima citado, onde é adotado para anfotericina B (Cristália-Brasil) o escore 0 (oticamente claro) e para fluconazol (Merk-4148) e itraconazol (Merk-5266) o escore 2 (levemente turvo). A leitura dos resultados foi realizada após 48 horas, tempo padronizado e que apresenta resultados confiáveis e pontos de leitura mais visíveis. O ponto de corte para este trabalho foi o mesmo adotado por Soares⁽²¹⁾, ou seja, isolados de *C. neoformans* foram considerados sensíveis às drogas testadas de acordo com o seguinte padrão: anfotericina B concentração mínima inibitória (CMI) ≥ 2 µg/mL, fluconazol CMI ≥ 16 µg/mL e para itraconazol CMI ≥ 1 µg/ML.^(4,21,25,30,33,34)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 88 amostras coletadas, 11 apresentaram positividade para o desenvolvimento do *C. neoformans*, e 77 amostras apresentaram resultado negativo para o desenvolvimento do *C. neoformans*. (Tabela 1). Os materiais biológicos analisados que não apresentaram positividade para o de-

envolvimento do *C. neoformans* foram fragmentos de eucalipto, areia coletada de galinheiros, material proveniente de árvores em decomposição, fezes de morcegos e, principalmente, fezes de pombos úmidas ou em pequena quantidade. As amostras positivas neste estudo foram provenientes de locais com grande concentração de pombos protegidos das intempéries e ao abrigo da luz solar, fornecendo como substrato fezes secas em grande quantidade (Quadro 2). A recuperação de isolados a partir deste tipo de substrato ocorre devido à capacidade de adaptação do *C. neoformans* a ambientes desidratados e ricos em matéria orgânica, o que caracteriza uma pressão seletiva, já que outros microrganismos não sobrevivem em tais situações de adversidade.^(2,16)

Entre as amostras coletadas no Hospital de Clínicas de Curitiba e arredores, foram recuperados isolados de *C. neoformans* a partir de cinco amostras. Trata-se de amostras de fezes de pombos abundantes, secas e protegidas das intempéries e da luz solar. Na Central de Abastecimento de Alimentos do Paraná (Ceasa), em Curitiba, obteve-se positividade em seis amostras coletadas, também apresentando as características das amostras anteriores. As amostras coletadas na área coberta do centro esportivo encontravam-se umedecidas e não apresentaram desenvolvimento do fungo, o que, segundo Kobayashi et al.,⁽¹⁶⁾ ocorre porque amostras

Tabela 1. Análise dos resultados positivos e negativos para o desenvolvimento de *Cryptococcus neoformans* nas diferentes amostras coletadas

Tipos de amostras coletadas	Amostras positivas	Amostras negativas	Total (%)
Fezes de pombos	11	46	57 (64,78)
Fezes de morcego	-	01	01 (1,14)
Fragmentos de eucalipto	-	10	10 (11,36)
Fragmentos vegetais	-	10	10 (11,36)
Areia e terra de galinheiros	-	10	10 (11,36)
Total de amostras coletadas (%)	11 (12,5)	77 (87,5)	88 (100)

Quadro 2. Relação das amostras positivas com referência a local e data da coleta

Identificação da amostra	Local de coleta	Data de coleta
02	Janela - Fisioterapia / HC	21/09/04
39	Canaleta I de Manutenção - HC	19/02/05
44	Rampa de acesso - HC	09/04/05
45	Canaleta II de Manutenção - HC	09/04/05
47	Parede interna do prédio de Manutenção - HC	09/04/05
56	1° escada - CEASA	11/06/05
57	2° escada - CEASA	11/06/05
75	Parede interna do prédio desativado - CEASA	30/07/05
77	Vigas de madeira do prédio desativado - CEASA	30/07/05
80	Telhado do estacionamento - CEASA	07/08/05
81	2° prédio desativado - CEASA	07/08/05

apresentando alto grau de umidade proporcionam um ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias, que alcalinizam a amostra e inibem o desenvolvimento do *C. neoformans*.⁽¹⁶⁾ Os 11 isolados foram caracterizados como *C. neoformans* por meio de testes fenotípicos pelos métodos do auxanograma, teste da urease e ágar Canavanina Glicina e Azul de Bromotimol.^(5,11,29) Não foi constatada resistência por parte dos isolados ambientais frente aos antifúngicos testados. Horta et al.⁽³⁰⁾ e Souza et al.⁽³²⁾ colocaram frente a anfotericina B, itraconazol e fluconazol isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans* e encontraram concentrações inibitórias mínimas de 0,0625 a 0,5 µg/mL para anfotericina B, 0,125 a 8 µg/mL para fluconazol e 0,031 a 0,25 µg/mL para itraconazol, concentrações comparáveis aos encontrados em nossa pesquisa. Os resultados do teste de suscetibilidade estão representados no Quadro 3.

Quadro 3. Relação das amostras positivas e CMI das respectivas drogas antifúngicas

Identificação da Amostra	CMI Anfotericina (µg/mL)	CMI Fluconazol (µg/mL)	CMI Itraconazol (µg/mL)
02	0,03	0,125	0,03
39	0,5	0,125	0,03
44	0,5	0,125	0,03
45	0,5	0,125	0,03
47	0,03	0,125	0,03
56	0,5	0,125	0,03
57	0,03	0,125	0,03
73	0,03	0,125	0,03
74	0,03	0,125	0,03
80	0,5	0,125	0,03
81	0,03	0,125	0,03

Com base nos resultados alcançados neste trabalho, conclui-se que foram encontradas fontes saprofitas nos locais pesquisados para o desenvolvimento do *Cryptococcus neoformans*, uma vez que 12,5% das amostras ambientais coletadas apresentaram positividade para o desenvolvimento do fungo em questão. O método utilizado para o isolamento do fungo foi eficaz para as amostras ambientais. O acúmulo de fezes secas e protegidas das intempéries propiciaram condições para o isolamento do *C. neoformans*, fato demonstrado também por Kobayashi et al.⁽¹⁶⁾ Os isolados de *C. neoformans* obtidos de amostras ambientais pesquisadas neste trabalho apresentaram suscetibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol reproduzindo os dados da literatura estudada.^(21,30,32)

REFERÊNCIAS

- Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* em pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. J Bras Patol Med Lab. [online]. 2004, 40(5): 293-8.
- Baroni Fde A, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera IN, Oliveira MT et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. Rev Inst Med trop Sao Paulo. 2006;48(2):71-5.
- Know-Chung K, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). TAXON. 2002;51: 804-6.

4. Barreto de Oliveira MT, Boekhout T, Theelen B, Hagen F, Baroni FA, Lazera MS, et al. Source *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1356-9.
5. Filiú WF, Wanke B, Aguenta SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazera M. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(6): 591-5.
6. Silva J, Capuano DML. Ocorrência de *cryptococcus* spp e parasitas de interesse em saúde pública nos excretas de pombo na cidade de Ribeirão Preto, São paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2008;67(2):137-41.
7. Baldasso AB, Táparo CV, Ribeiro MM, Colombo G, Marinho M. Potencial zoonótico da microbiota fúngica de excretas de pombos da cidade de Araçatuba, São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987;44(1,2):6-9.
8. Machado CC, Amaral AA, Severo LC. *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* isolado do solo. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 1993;35(1):77-9.
9. Ribeiro MA, Nagamskulrungraj P. Caracterização molecular de cepas ambientais de *Cryptococcus neoformans* isoladas de Vitória, ES, Brasil. *Rev Inst Med trop S Paulo [online]*. 2008;50(6):315-20.
10. Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*. 2000;38(5):379-83.
11. Costa S, Lazera M, Santos W, Morales B, Bezerra C, Nishikawa M, et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in city of Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(4):662-4. Comment in: *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(6):781; author reply 781-2.
12. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*. 1990;28(7):1642-4.
13. Baltazar LM, Ribeiro MA. Primeiro isolamento de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop*. [online]. 2008;41(5):449-53.
14. Duarte A, Ordoñez NE, Castañeda E. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* com espécies de *Eucaliptus* em Santafé de Bogotá. *Rev Inst Med trop Sao Paulo*. 1994;36(2):125-30. [Spanish].
15. Padhye AA, Chakrabarti A, Chander J, Kaufman L. *Cryptococcus neoformans* vari *gattii* in the Índia. *J Med Vet Mycol*. 1993;31(2):165-8.
16. Kobayashi CC, Souza LK, Fernandes Ode F, Brito SC, Silva AC, Sousa ED, et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás state, Brazil. *Rev Inst Med trop Sao Paulo*. 2005;47(4):203-7.
17. Rezende CA, Munhoz CJM, Almeida GG. Investigação ambiental de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Votuporanga - São Paulo. *Newslab*. 2008;87:
18. Malik R, Krockenberger MB, Cross G, Doneley R, Madill DN, Black D et al. Avian cryptococcosis. *Med Mycol*. 2003;41(2):115-24.
19. Calvo MB, Colombo AL, Fishman O, Santiago A, Thompson ML, Queiroz-Telles F, et al. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile and Venezuela. *J Clin Microbiol*. 2001;39(6):2348-50.
20. NCCLS. Método de referência para testes de diluição antifúngica das leveduras norma aprovada-segunda edição. Norma M27-A2 do NCCLS. 940 West Valley (Road Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
21. Soares MC, Paula CR, Dias AL, Caseiro MM, Costa SO. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005;47(1):31-6
22. Staib F, Schuultz-Dieterjch J. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages—Control of *Cr. neoformans* habitats. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*. 1984;179(2):179-86.
23. Tay ST, Chai HC, Na SL, Hamimah H, Rohani MY, Soo-Hoo TS. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. *Mycopathologia*. 2005;159(4):509-13.
24. Campos FL, Baroni FA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus leurentii* produtores de protease e fosfolipase. *Revista de Patologia Tropical*. 2010;39 (2):83-9.
25. Silva PR, Rabelo RA, Terra APS, Teixeira P.N. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes em Hospital Universitário. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(2):158-62.
26. Andreu CF, Machin GM, Bernal LPA, Morales RR, Herrera CA. *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* isolated in Havana City. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):245.
27. Rubio M, De Vroey C, Chalon E, Swinne D. An improved medium for the isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeons droppings. *Sabouraudia*. 1984;22(4):345-6.
28. Escandón P, Quintero E, Granados D, Huérfano S, Ruiz A, Castañeda E. Isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B from detritus of *Eucalyptus* trees in Colombia. *Biomedica*. 2005;25(3): 390-7. [Spanish].
29. Favalessa OC, Ribeiro LC, Tadamo T, Fontes CJF, Dias FB, Coelho BP, et al. Primeira descrição da caracterização fenotípica e suscetibilidade "in vitro" a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. Isoladas de pacientes HIV positivos e begativos, estado do Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6): 661-5.
30. Horta JA, Faganello J, Rosa e Silva LK, Oliveira LT, Santurio JM, Vainstein MH, et al. Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated from *Eucaliptus* spp in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005;36:1-6.
31. Pedrosa RS, Ferreira JC, Candido RC. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. Isolated in city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):239-43.
32. Souza LKH, Fernandes OFL, Kobayashi CCBA, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia City, Goiás, Brazil. *Rev Inst Med Trop. Sao Paulo*. 2005; 47(5): 253-6 .
33. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med Mycol*. 2000.38(5):385-90.
34. Silva ME, Paula LA. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columbia livia*) em Salvador, Bahia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1963;5:9-11.

Autor correspondente

Mauricio Cichon

Rua Estrada da Graciosa, 1081 – Bairro Atuba
82840-360 – Curitiba, PR

Neoplasias intraepiteliais cervicais: faixa etária no momento do diagnóstico citológico

Cervical intraepithelial neoplasia: age group in the moment of the cytological diagnosis

Narriman Kennia da Silva Barros¹, Megmar Aparecida Santos Carneiro², Suelene Brito do Nascimento Tavares¹, Nadja Lindany Alves de Souza¹, Maria de Lourdes Siqueira¹, Daniel Fernandes de Oliveira¹, Mara Cristina Nolasco Sampaio¹, Sílvia Helena Rabelo dos Santos¹

Resumo: Objetivo: Avaliar a distribuição dos diagnósticos citológicos de NIC (neoplasia intraepitelial cervical), considerando a idade das mulheres incluídas. **Material e Métodos:** Os resultados citológicos de mulheres com NIC 1 (721), NIC 2(218) e NIC 3 (84) foram analisados em um modelo estratificado por faixa etária. **Resultados e Conclusão:** As prevalências encontradas foram de 70,48% (721/1023) para NIC 1, 21,31% (218/1023) para NIC 2 e 8,21% (84/1023) para NIC 3. Os diagnósticos citológicos de NIC 1 foram observados com maior frequência em mulheres com menos de 40 anos (88,35% 637/721). Os diagnósticos citológicos de NIC 2 também foram mais frequentes em mulheres com menos de 40 anos com uma prevalência de 43,6% (95/218) observada na faixa etária de 20-30 anos e de 22,5% (49/218) em mulheres de 31-40 anos. Os diagnósticos de NIC 3 foram mais frequentes em mulheres com mais de 30 anos (83,3% 70/84). Há uma maior prevalência de NIC 1 e NIC 2 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 tem prevalência maior em mulheres com mais de 30 anos. É possível que a história natural da NIC 2 seja mais próxima à de NIC 1 quando comparada à de NIC 3.

Palavras-chave: Neoplasia intraepitelial cervical (NIC); Prevalência; Faixa etária

Abstract: Objective: To evaluate the distribution of the cytological diagnoses of CIN (cervical intraepithelial neoplasia) considering the included women's age group. **Material and Methods:** The cytological results of woman with CIN 1 (721), CIN 2(218) and CIN 3 (84) were analyzed in a stratified model by age group. **Results and Conclusion:** The total prevalences founded were 70.48% (721/1023) for CIN 1, 21.31% (218/1023) for CIN 2 and 8.21% (84/1023) for CIN 3. The cytologic diagnosis of CIN 1 were observed more frequently in women under the age of 40 (88.35% 637/721). The cytologic diagnosis of CIN 2 were also more frequent in women under 40 years of age with a prevalence of 43.6% (95/218) observed in the age group of 20-30 years and 22.5% (49/218) in women of 31-40 years. The diagnosis of CIN 3 were more frequent in women over 30 years (83.3% 70/84). There is a higher prevalence of CIN 1 and CIN 2 in women aged 20 to 30 years while CIN 3 prevalence is higher in women over 30 years. It is possible that the natural history of CIN 2 is closer to CIN 1 when compared to CIN 3.

Keywords: Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN); Prevalence; Age group

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o segundo tipo mais frequente em mulheres, precedido apenas pelo câncer de mama.⁽¹⁾ As últimas estimativas do Instituto Nacional do Câncer indicam 18.680 novos casos de câncer cervical.⁽²⁾ Este câncer evolui a partir de lesões precursoras, chamadas de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). Estas lesões, classificadas histologicamente com base na atipia progressiva das células epiteliais,⁽³⁾ são usualmente pequenas e frequentemente aparecem como focos de células atípicas que se misturam ao tecido normal, mas sem constituir uma massa tumoral bem definida.⁽⁴⁾

As NIC são caracterizadas pela perda gradual de funções celulares básicas como divisão e diferenciação. As células anormais perdem gradualmente as funções de controle de crescimento normal, não se diferenciam adequadamente e, como consequência, há proliferação desordenada. Se a anormalidade progride, as células perdem gradativamente a

sua capacidade de diferenciação até que toda a espessura do epitélio seja composta por células indiferenciadas.^(4,5)

A NIC 1 é caracterizada por atipia nuclear mínima, alterações celulares restritas ao terço inferior do epitélio cervical, baixos índices de mitoses e ausência de mitoses bizarras ou anormais. As NIC 2 e NIC 3 são caracterizadas por pleomorfismo e hiper cromasia mais intensa, pode haver arranjos de células paraceratóticas com núcleos anormais. Além disto, as atipias chegam até o terço médio do epitélio cervical no caso das NIC 2, ou ocupam o terço superior do epitélio cervical nas NIC3.⁽⁴⁾

As NIC podem ser diagnosticadas em exame citopatológico de células cervicais esfoliadas e confirmadas por exame histológico de material cervical.⁽⁶⁾ Para os exames citopatológicos é utilizada a classificação de Bethesda, que foi criada para reduzir as categorias de diagnóstico e melhorar a concordância entre observadores, principalmente relacionada à classificação de NIC, até então, também, utilizada para exames citopatológicos. O sistema de

Trabalho realizado no Departamento de Citologia Clínica da Faculdade de Farmácia – UFG

¹Departamento de Citologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil

²Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil

Bethesda adotou o termo lesão intraepitelial escamosa (SIL), que são divididas em SIL de baixo grau (LSIL) e SIL de alto grau (HSIL).⁽⁷⁾ O diagnóstico de LSIL inclui os diagnósticos de NIC 1, e o diagnóstico citopatológico de HSIL do sistema de Bethesda corresponde à NIC 2 e NIC 3.^(8,9) A junção entre NIC 2 e NIC 3, na categoria HSIL, foi questionada já que uma lesão do tipo NIC 2 sem tratamento se aproxima mais da NIC 1 que da NIC 3; porém, a distinção de NIC 2 e NIC 3 é pouco reprodutível.⁽⁷⁾

Estudos têm demonstrado que existe uma grande variação na faixa etária em relação aos diagnósticos citopatológicos.^(8,10) De fato, lesões menos graves do tipo NIC 1 ou LSIL são mais comuns em mulheres mais jovens. Por outro lado, lesões mais severas do tipo HSIL têm padrão mais variado. Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi analisar a distribuição dos diagnósticos citológicos de NIC considerando a faixa etária das mulheres incluídas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados resultados de exames citopatológicos de mulheres com idade entre 13 e 83 anos provenientes de unidades básicas de saúde da cidade de Goiânia e entorno e analisados no Laboratório Rômulo Rocha, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, no período de janeiro de 2002 a novembro de 2007. Antes da entrada na rotina do Laboratório Rômulo Rocha, todos os esfregaços têm a identificação da lâmina e o preenchimento da ficha de requisição verificada para identificação das não conformidades. Todos os esfregaços positivos são avaliados por, pelo menos, dois observadores e as discordâncias são estabelecidas por consenso. Critério de exclusão era resultado citopatológico negativo.

Foram incluídas as mulheres com resultados de exames citopatológicos com diagnóstico sugestivo de NIC, totalizando 1.023 casos, dos quais 721 foram qualificados como NIC 1, 218 qualificados como NIC 2 e 84 qualificados como NIC 3. Para análise dos dados, estratificou-se a variável idade nas seguintes faixas-etárias < 20 anos, 20-30 anos, 31-40, 41- 50 anos e > 50 anos. A análise estatística foi realizada no programa Epi Info versão 3.4.3.

RESULTADOS

Considerando os 1.023 resultados de exames citopatológicos incluídos, as NIC 1 representaram 70,48% (721/1.023) dos casos, NIC 2 ocorreram em 21,31% (218/1.023) e NIC 3 foram diagnosticadas em 8,21% (84/1.023) dos casos.

A análise realizada por faixa etária evidenciou uma menor frequência das NIC em mulheres com menos de 20 anos. De fato, NIC 3 não foi diagnosticada em nenhuma mulher nessa faixa etária. Os diagnósticos citológicos de NIC 1 foram observados com maior frequência em mulheres com menos de 40 anos (88,35% 637/721), sendo a faixa etária de maior prevalência a de 20-30 anos (51,7% 373/721). Este diagnóstico foi observado com menor frequência em mulheres com mais de 40 anos (11,65% 84/721). Os

diagnósticos citológicos de NIC 2 também foram mais frequentes em mulheres com menos de 40 anos com uma prevalência de 43,6% (95/218) observada na faixa etária de 20-30 anos e de 22,5% (49/218) em mulheres de 31-40 anos. A frequência de NIC1 e NIC 2 foi semelhante em todas as faixas etárias, enquanto que os diagnósticos de NIC 3 foram mais frequentes em mulheres com mais de 30 anos (83,3% 70/84) (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência de NIC por faixas etárias

Faixa etária	NIC 1%	NIC 2%	NIC 3%	Total
<20	131 18,2%	23 10,6%	0 0%	154
20 a 30	373 51,7%	95 43,6%	14 16,6%	482
31 a 40	133 18,4%	49 22,5%	22 26,2%	204
41 a 50	65 9,0%	34 15,6%	23 27,4%	122
> 50	19 2,6%	17 7,8%	25 29,8%	61
Total	721	218	84	1.023

DISCUSSÃO

Houve maior prevalência dos diagnósticos citopatológicos de NIC 1 e NIC 2 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos, enquanto o diagnóstico citopatológico de NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 30 anos.

Giannopoulos et al.⁽¹¹⁾ 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. Silveira et al.⁽¹²⁾ observaram uma maior prevalência de NIC1 e NIC 2 em mulheres na faixa etária de 31 a 40 anos, enquanto que NIC 3 foi mais frequentemente observada em mulheres de 51 a 60 anos. Estes autores ainda observaram que, na faixa etária de 21 a 50 anos, não houve diferença estatística na prevalência das lesões, embora se observe aumento do número de casos de neoplasias mais severas com o avançar da idade.

Massad et al.⁽¹³⁾ realizaram um estudo no qual a frequência de NIC 1 e NIC 2 foi mais comum em mulheres mais jovens, com menos de 35 anos, e NIC 3 em mulheres mais velhas, com mais de 50 anos. Estes resultados reforçam a teoria de que mulheres mais velhas tendem a apresentar lesões progressivas com maior frequência do que mulheres mais jovens, o que poderia ser explicado pelo caráter transitório das infecções pelo HPV em mulheres mais jovens. Segundo Zeferino & Derchain,⁽¹⁴⁾ a taxa de NIC 1, em mulheres com menos de 25 anos, é alta, e a maioria dessas lesões regride espontaneamente num período de dois anos.

Zeferino et al.⁽¹⁵⁾ observaram que a idade média para o diagnóstico de NIC1 e NIC 2 é semelhante, o que pode ser explicado pelo fato de que NIC 1 e NIC 2 podem derivar-se diretamente da infecção por HPV. Neste estudo, a faixa-etária de maior prevalência tanto de NIC 1 como NIC 2 também foi semelhante, reforçando ainda mais esta hipótese. Estes autores estabelecem ainda que, mesmo que os fatores que determinam a expressão das lesões ainda não estejam suficientemente esclarecidos, a progressão de uma NIC 1

em NIC 2 não parece ser a via preferencial de evolução, e mesmo que se toda NIC 2 passasse pelo estágio de NIC 1 esta passagem provavelmente seria muito rápida.

Freitas et al.⁽¹⁰⁾ encontraram uma prevalência de 72,5% (287/396) de LSIL em mulheres com idade menor de 30 anos, Em relação às HSIL, a prevalência em mulheres com idade menor de 30 anos foi de 52,5% (109/206), enquanto que em mulheres com mais de 30 anos foi de 47,09% (97/206). Sabendo que a classificação LSIL corresponde a NIC1 e que a HSIL agrupa NIC2 e NIC3, pode-se concluir que os resultados daquele estudo são semelhantes aos deste e que provavelmente a alta prevalência de HSIL em mulheres mais jovens provavelmente corresponde à alta prevalência de NIC 2 nessa faixa-etária.

De fato, a prevalência das lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) é alta na mulher jovem e diminui progressivamente à medida que a idade aumenta. A prevalência de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) tem padrão mais variado. Herrero et al.⁽¹⁶⁾ observaram em estudo realizado na população rural da Costa Rica que a prevalência de HSIL apresentou dois picos, o primeiro por volta de 30 anos, provavelmente devido à NIC 2, e um segundo por volta dos 65 anos de idade, possivelmente devido a NIC 3. Portanto, quando há diagnóstico de HSIL em mulheres mais jovens, provavelmente trata-se de uma NIC 2 e, quando diagnosticado em mulheres com mais de 50 anos, provavelmente trata-se de uma NIC 3. Outro aspecto importante é que, em geral, mulheres com diagnóstico citopatológico das NIC 2 são cerca de 10 anos mais jovens do que mulheres com diagnóstico citopatológico das NIC 3.⁽⁸⁾

Em resumo, os resultados obtidos nesse estudo reforçam a teoria de que a história natural da NIC 2 se aproxima mais da NIC 1 do que da NIC 3 e que os casos de HSIL diagnosticados em mulheres mais jovens provavelmente são devido às NIC 2.

REFERÊNCIAS

1. Freitas TP, Carmo BB, Paula FD, Rodrigues LF, Fernandes AP, Fernandes PA. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49 (5):297-301.
2. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 06/01/2009.
3. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*. 2005;32 (Suppl 1):S25-33.
4. Crum CP, Cibas ES, Lee KR. *Pathology of early cervical neoplasia*. New York, Churchill Livingstone, 1997.
5. Demay RM. The Pap smear. In: *The art and the science of cytopathology*. Chicago: ASCP Press: 61-185; 1993.
6. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11-22.
7. Solomon D, Nayar R. *Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal*. Revinter. 2ª ed., 2004. p.89-90.
8. D'ottaviano-Morelli MG, Zeferino L, Cecatti JG, Terrabuio DR, Martinez EZ. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma based on cytological screening in the region of Campinas, São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 2004;20(1): 153-9.
9. Kurman RR, Solomon D. *The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses*. New York: Springer-Verlag; 1994
10. Freitas RA, Carvasan GA, Morais SS, Zeferino LC. Prevalência das lesões neoplásicas do colo de útero: resultados de rastreamento citológico realizado em Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Ciênc Méd*. 2006;15 (4): 307-14.

11. Giannopoulos T, Butler-Manuel S, Taylor A, Demetriou E, Daborn L. Prevalence of high-grade CIN following mild dyskaryotic smears in different age groups. *Cytopathology*. 2005;16(6):277-80.
12. Silveira LM, Silva AH, Pereira IP, Pinheiro VM. Critérios citomorfológicos para o diagnóstico de HPV e sua relação com a gravidade da neoplasia intraepitelial cervical. 2005; RBAC;37(2): 127-32.
13. Massad LS, Behbakht K, Collins YC, Cejtin HE. Histologic findings from the cervix among older women with abnormal cervical cytology. *Gynecol Oncol*. 2003.;88(3):340-4.
14. Zeferino LC, Derchain SF. Cervical cancer in the developing world. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;20(3):339-54.
15. Zeferino LC, Bedone AJ, Faúndes A, Oyakawa N. Duração da neoplasia intra-epitelial e do carcinoma invasor do colo uterino: Estudo Epidemiológico. RBGO. 1998;20(10): 565-9.
16. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*. 2000.;92(6):464-74.

Autor correspondente

Silvia Helena Rabelo dos Santos

Faculdade de Farmácia - UFG

1ª avenida S/N, setor universitário

74605-220, Goiânia, GO, Brasil

Telefone: +55 62 3209-6457; Fax: + 55 62 3209-6044

E-mail: silvia.rabelo@pesquisador.cnpq.br

O uso dos biomarcadores p16 e Ki-67 em citologia cérvico-vaginal: revisão de estudos

The use of biomarkers p16 and Ki-67 in cervix-vaginal cytology: studies review

Patrícia Borges da Silveira de Mello

Resumo: O Papilomavirus humano- HPV possui diversas variáveis, algumas delas, classificadas como de alto risco, estão envolvidas na etiologia das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. Isto se dá pela integração das oncoproteínas virais E6 e E7 ao DNA da célula infectada, desestabilizando seu ciclo celular. Os biomarcadores moleculares possuem um importante papel preditivo nas doenças. Dentre muitos pode-se destacar a proteína Ki-67, um marcador de proliferação celular e a proteína supressora tumoral p16, que tem sido muito estudada em casos de lesões de colo uterino por sua possível função como marcadora prognóstica. O objetivo deste artigo é comparar os resultados dos estudos quanto à associação da expressão dos biomarcadores em diferentes diagnósticos de citologia cérvico-vaginal.

Palavras-chave: HPV; Lesões de colo uterino; Proteína p16; Proteína Ki-67

Abstract: The human papillomavirus-HPV has many variables, and some of them are classified as high risk. HPV are involved in the aetiology of pre-neoplastic and neoplastic lesions of the cervix. This is due to integration of viral oncoproteins E6 and E7 DNA of the infected cell disrupting the cell cycle. The molecular biomarkers have an important predictive role in diseases. The Ki-67 protein is used as marker of cell proliferation, and the tumor suppressor p16 protein has been studied in cases of cervix lesions for its possible role as a prognostic marker. The aim of this paper is to compare the results of studies regarding the association of expression of biomarkers in different diagnoses of cervicovaginal cytology.

Keywords: HPV, cervix lesions, p16 protein, Ki-67 protein

INTRODUÇÃO

Vários tipos de Papilomavírus humano podem infectar o epitélio cervical, já que são conhecidas aproximadamente 120 variáveis. Eles são classificados em HPV alto risco e HPV baixo risco.⁽¹⁾ Os HPV de alto risco ou oncogênicos somam 15 tipos e são classificados desta forma pelo potencial de malignidade, sendo frequentemente detectados em displasias (lesões intraepiteliais pré-neoplásicas) e carcinomas do colo uterino.⁽²⁾

Segundo o Instituto Nacional de Câncer – INCA, já se sabe que o surgimento do câncer de colo uterino depende primariamente da infecção por um dos tipos oncogênicos do vírus HPV. Ainda segundo o INCA, são registrados aproximadamente 230 mil óbitos de mulheres por ano, no mundo, por esta doença.⁽³⁾

Os oncogenes virais E6 e E7 interferem nos mecanismos de regulação do ciclo celular, alterando a expressão das proteínas que gerenciam seu bloqueio ou progressão. O processo neoplásico inicia-se com a ligação das oncoproteínas virais E6 e E7 às proteínas supressoras tumorais p53 e pRb (proteína do retinoblastoma), respectivamente.⁽⁴⁾ Como resultado da associação E6/p53, células com alteração em seu DNA não sofrem apoptose, proliferando-se de forma desregulada. A proteína do retinoblastoma - pRb que forma um

complexo com o fator de transcrição E2F é desativada pela oncoproteína viral E7, liberando assim o E2F ativado que sinaliza a continuação no ciclo celular.

Este progresso anormal resulta no aumento da produção da p16, uma proteína supressora tumoral, responsável por bloquear o ciclo na fase G1 quando há anomalias no DNA, aparecendo de forma superexpressa nas displasias de alto grau e nos carcinomas cervicais.^(5,6)

A proteína Ki-67 está presente nas células durante todas as fases do ciclo, exceto em G0, quando as células estão em repouso.⁽⁷⁾ Está relacionada à proliferação celular e é expressa no núcleo. Portanto nas anomalias citológicas, como na infecção pelo vírus HPV, pode ser utilizada como biomarcador auxiliando na investigação e prognóstico da doença.⁽⁸⁾

Como exposto, a superexpressão das proteínas p16 e Ki-67 pode evidenciar uma possível infecção por HPV. Desta forma, sua avaliação em testes de imunocitoquímica e imunohistoquímica, as torna biomarcadores para anormalidades celulares resultantes da ação viral, pois são expressos preferencialmente na neoplasia cervical.^(9,10,11)

Os biomarcadores já são amplamente utilizados em medicina, podendo-se citar como exemplos o antígeno prostático solúvel para o câncer de próstata, o CA 15.3 para o câncer de mama e o CA 125 para câncer de ovário.⁽¹²⁾

MATERIAL E MÉTODO

A metodologia de pesquisa adotada é teórica, classificada no tipo exploratória onde os instrumentos de coleta são artigos científicos extraídos da base de dados Medline e SciELO, de janeiro de 2001 a fevereiro de 2008, que relataram estudos utilizando os biomarcadores moleculares p16 e Ki-67, relacionando sua superexpressão nas lesões neoplásicas e pré-neoplásicas do colo uterino.

Os artigos selecionados são de pesquisas realizadas no Brasil, Estados Unidos e África.

A partir de uma lista contendo vinte e oito artigos que relacionavam a expressão de biomarcadores moleculares nas lesões de colo uterino, foram selecionados sete que, especificamente, utilizam as proteínas p16 e Ki-67.

Os artigos selecionados utilizam métodos de imunohistoquímica, imunocitoquímica e técnicas de biologia molecular associadas, para avaliar a expressão das proteínas em questão.

REVISÃO DOS ESTUDOS

Um estudo realizado no ano de 2007, no Brasil, verificou a existência de associações entre a carga viral do vírus HPV e a expressão da proteína P16 em mulheres com lesões intraepiteliais. Foram analisadas 109 amostras de biópsias de colo uterino, sendo 57 de tecido normal, 26 de lesões intraepiteliais de baixo grau e 26 de lesões intraepiteliais de alto grau. A determinação da presença do HPV foi feita por biologia molecular. Os testes para avaliar a expressão da proteína p16 foram feitos por método imuno-histoquímico. Os autores relataram que não houve expressão da p16 nos tecidos sem lesão intraepitelial. A expressão foi positiva em 15,4% dos casos de lesão intraepitelial de baixo grau e em 84,6% dos casos de lesão intraepitelial de alto grau.⁽¹³⁾

Outro estudo brasileiro, realizado no ano de 2008, objetivou demonstrar a expressão de biomarcadores através de imunohistoquímica, em tecidos saudáveis e lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. Foram avaliadas 187 biópsias de colo uterino obtidas a partir de 47 casos com diagnóstico de lesão intraepitelial de baixo grau, 46 casos de lesão intraepitelial de alto grau, 49 casos de carcinoma epidermoide e 45 casos controle negativo para lesão. Como resultado, os autores obtiveram positividade para a expressão da proteína p16 em 56% dos casos controles, 92% das lesões intraepiteliais de baixo grau, 94% nas lesões intraepiteliais de alto grau e 98% para casos de câncer de colo uterino, observando assim, um aumento progressivo nas taxas de reatividade para esta proteína, de acordo com a severidade das lesões.⁽¹⁴⁾

Ainda autores brasileiros avaliaram, no ano de 2005, a expressão da proteína Ki-67 em pacientes com diagnóstico de carcinoma invasor de colo uterino, visando determinar possíveis fatores prognósticos. Foram obtidas amostras de lesão tumoral de 36 pacientes, 29 delas com carcinoma de células escamosas e 7 com adenocarcinoma, marcadas por imunohistoquímica para p53 e Ki-67. O resultado obtido foi

um alto índice de proliferação celular (expressão da proteína Ki-67 em mais de 25% das células) em 26 pacientes (72,2%). A expressão da proteína Ki-67 correlacionou-se significativamente com o tamanho tumoral, disseminação linfática e sobrevida livre da doença, mas não com o grau de diferenciação tumoral.⁽⁸⁾

Com a finalidade de avaliar a positividade das expressões imunocitoquímicas das proteínas p16 e Ki-67 e sua distribuição celular, outra autora brasileira, no ano de 2007, utilizou 199 amostras citológicas de base líquida de casos com diagnóstico negativo e ASC-US com testes de HPV alto risco positivos. A reação imunocitoquímica mostrou positividade para p16 em 71 das 101 amostras negativas e em 12 das 16 amostras com diagnóstico de ASC-US, ambas positivas para o vírus HPV tipo alto risco. Já para a proteína Ki-67 ela obteve positividade para sua expressão em 76 dos 101 casos negativos e em 12 dos 16 casos com diagnóstico para ASC-US, ambas positivas para o vírus HPV tipo alto risco.⁽²⁾

O estudo realizado na Universidade do Cairo, no ano de 2007, investigou o envolvimento de reguladores do ciclo celular no processo de associação do vírus HPV e carcinoma cervical. Foi aplicada a técnica imunohistoquímica em 130 cortes histológicos, sendo estes oriundos de 43 casos de carcinoma invasivo, 38 casos de carcinoma *in situ* CIN III, 11 casos de carcinoma *in situ* CIN II e 18 casos de carcinoma *in situ* CIN I. Foram utilizadas ainda 20 amostras negativas para malignidade. Os autores relatam a superexpressão da proteína p16 nos estágios iniciais da carcinogênese cervical e significativo aumento na expressão da proteína Ki-67 e da p16 conforme a progressão tumoral.⁽¹⁵⁾

Em um estudo realizado nos Estados Unidos, no ano de 2005, os autores utilizaram a técnica de imunocitoquímica para localizar células que expressam a p16 em amostras de citologia de base líquida, para estabelecer, um score ou contagem nuclear, baseando-se em vários critérios morfológicos, para a interpretação do grau de anormalidade destas células. Foram utilizados 108 casos negativos para malignidade, 52 casos com diagnóstico de lesão intraepitelial de baixo grau e 50 casos com diagnóstico de lesão intraepitelial de alto grau. Das 108 amostras normais, positividade para p16 foi observada em 13 delas (12%). Das 52 amostras com lesão intraepitelial de baixo-grau, 19 foram positivas para expressão de p16 (37%), e das 50 amostras com lesão intraepitelial de alto grau, 49 apresentaram positividade para p16 (98%), sendo classificadas como anormais. Com este estudo, foi possível localizar e identificar os tipos celulares potencialmente anormais nas amostras de citologia de base líquida, através da contagem de núcleos que expressam a proteína p16.⁽¹⁶⁾

Em sua tese de doutorado, um autor brasileiro investigou a expressão da proteína p16 no carcinoma cervical e sua relação com a transformação de carcinoma *in situ* em invasor, bem como seu papel na recorrência das lesões cervicais. Foram selecionados 90 casos com diagnóstico de carcinoma cervical, sendo 49 com lesão *in situ* e 41 com lesão invasora, aplicando a técnica de imunohistoquímica para revelar a expressão proteica. Como resultado, obteve 87,9% das

pacientes com lesão invasora exibindo superexpressão da p16 em comparação com 37,6% daquelas com lesão *in situ*, concluindo que a superexpressão da p16 é um fator determinante de risco para a invasão da membrana basal por células displásicas.⁽¹⁷⁾

CONCLUSÃO

Existem vários estudos recentes que avaliam o papel das proteínas p16 e Ki-67 nas neoplasias cervicais.

Com base nesta pequena amostra de resultados obtidos nos estudos revisados, pode-se verificar a estreita relação entre as lesões de colo uterino e a expressão das proteínas p16 e Ki-67. Contudo é preciso estabelecer parâmetros específicos para sua utilização como testes complementares em rotinas laboratoriais, já que a proteína p16 pode ser inativada nas neoplasias e a proteína Ki-67 é expressa também em células saudáveis, sendo indispensável na proliferação celular.

Os biomarcadores poderão ser utilizados na prevenção e no monitoramento das pacientes com maior risco para desenvolvimento de lesões cervicais, quando técnicas protocoladas e com alto grau de precisão (score nuclear) forem empregadas;

Outros biomarcadores moleculares podem entrar nos painéis de estudo, tais como as ciclinas, proteína p53 e pRb.

REFERÊNCIAS

1. Carestiatto FN, Silva KC, Dimetz T, Oliveira LH, Cavalcanti SM Prevalence of Human Papillomavirus infection in the genital tract determined by hybrid capture assay. *Braz J Infect Dis.* 2006;10(5):331-6.
2. Namiyama, G.M. Avaliação das expressões imunocitoquímicas das proteínas p16INK4a e Ki-67 em esfregaços cérvico-vaginais colhidos em base líquida, com diagnóstico citológico negativo e ASC-US, com captura híbrida 2 e/ou PCR positivos para HPV de alto risco. Tese. São Paulo. Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa de Pós-Graduação em Ciências para obtenção do grau de Mestre. 2007.
3. Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil- Síntese de resultados e comentários. Rio de Janeiro: INCA; 2008. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.
4. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. Validation of p16 ink4a as a marker of oncogenic Human Papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based Cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(8):1355-60.
5. Albets B, Johnson A, Walter P, et al. *Biologia Molecular da Célula.* 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
6. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92(2):276-84.
7. Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry.* Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002.
8. Silva-Filho AL, Bruno BN, Silva LB, Traiman P, Silva JGC, Triginelli S A. Associação entre a expressão das proteínas p53 e Ki-67 e os achados clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma invasor de colo uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria.* 2005;27(5): 243-7.
9. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. CP Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(7):884-91.
10. Sahebali S, Depuydt CE, Segers K, Vereecken AJ, Van Marck E, Bogers JJ. Ki-67 immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: useful as an adjunctive tool? *J Clin Pathol.* 2003;56(9):681-6.
11. Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, Longacre TA. P16 ink4a Immunohistochemistry is superior to HPV *in situ* hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(1):33-43.
12. Schriefer A, Carvalho EM. Biomarcadores em Medicina. *Gazeta Médica da Bahia.* 2008;(1):47-51.
13. Eleutério J Jr. Associação entre a carga viral de HPV de alto risco, expressão de p16 ink4a e lesões intraepiteliais escamosas do colo uterino. *Rev Assoc Med Bras.* 2007; 53(6): 530-5.
14. Salcedo MMBP, Silveira GPG, Zettler CG. A expressão da proteína p16 e herpes simples vírus tipo 2 em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria.* 2008; 30(2).
15. Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep processo f HPV- associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2007 May 24;7:4. Available from www.biomedcentral.com/1472-6890/7/4.
16. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer.* 2005; 105(6):461-7. Disponível em: www.interscience.wiley.com
17. Anschau F. Do carcinoma cervical is situ ao invasor: o papel da expressão da p16^{ink4a} na progressão e na recorrência. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria.* 2008; 30(11): 583.

Autor correspondente

Patricia Borges da Silveira de Mello

Rua Margarida Fogiatto Cavagnari, nº 131 apto 201

Bairro Tingui

82620-400 – Curitiba, PR

Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de ralos e pias de enfermarias hospitalares em Santa Catarina, Brasil

Antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from sinks and drains in hospital wards in Santa Catarina, Brazil

Clédina de Oliveira¹, Patrícia da Silva Malheiros², Marília Montagner³, Eliandra Mirlei Rossi⁴, Adriano Brandelli⁵

Resumo: *Pseudomonas aeruginosa* é um micro-organismo oportunista que contribui para ocorrência de infecções hospitalares. A ocorrência desta bactéria foi investigada em 104 amostras isoladas de pias e ralos de enfermarias de dois hospitais de Santa Catarina. *P. aeruginosa* foi identificada em 47% das amostras. A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada através do teste de difusão em agar, segundo recomendações do Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI). Observou-se elevada resistência para cefalotina (100%), seguida pelo imipenem (34,7%), gentamicina (26,5%) e ceftriaxona (18,3%). As linhagens isoladas apresentaram elevada sensibilidade à ciprofloxacina e norfloxacina, 100% e 95,9%, respectivamente. Cerca de 40% das linhagens apresentaram multirresistência. Os resultados de resistência foram correlacionados com os principais antimicrobianos utilizados nos hospitais. Esses resultados indicam que pias e ralos em enfermarias hospitalares representam um risco potencial para a saúde pública, por apresentarem bactérias com elevada resistência a antimicrobianos, demonstrando a necessidade do uso racional de antibióticos nos hospitais e desinfecção adequada desses locais

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; Resistência; Antimicrobianos; Enfermarias

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic microorganism that contribute to the occurrence of hospital infections. The occurrence of this bacterium was investigated in 104 samples isolated from sinks and drains of two hospitals in Santa Catarina. *P. aeruginosa* was identified in 47% of the samples. The antimicrobial susceptibility was evaluated by the agar diffusion test, according to recommendations of the Committee for Clinical Laboratory Standard (CLSI). It was observed a high resistance to cefalotin (100%), followed by imipenem (34.7%), gentamycin (26.5%) and ceftriaxone (18.3%). The strains showed elevated sensitivity to ciprofloxacin and norfloxacin, 100% and 95.9%, respectively. Multidrug resistance was observed in about 40% of strains. The results for antimicrobial resistance correlate with the major antimicrobial agents used in the hospitals. These results indicate that sinks and drains in hospital wards represent a potential hazard to public health, to present potentially dangerous bacteria with resistance to antibiotics, demonstrating the need for rational use of antibiotics in hospitals and disinfection of those locations.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Resistance; Antibiotics; Hospital wards

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria oportunista amplamente distribuída no ambiente, particularmente em áreas úmidas. É adquirida do ambiente, sendo que, raramente, ocorre transmissão entre pessoas.⁽¹⁾ A presença deste micro-organismo em ralos e pias em enfermarias hospitalares pode contribuir para a ocorrência de infecções, uma vez que, além de excretas de pacientes, materiais utilizados para se efetuarem diversos procedimentos (resíduos de antibióticos, desinfetantes, detergentes, entre outros) são lançados continuamente por ralos e pias para a rede de

esgoto. Esses fatores podem favorecer o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos nestes micro-organismos.

No Brasil, o elevado índice de infecção hospitalar decorre em parte do uso indiscriminado e geralmente inadequado de antibióticos, favorecendo o aparecimento de linhagens resistentes que conseqüentemente afetam a eficiência da antibioticoterapia.⁽²⁾ Bactérias resistentes podem ser disseminadas e tornar-se um grande problema no controle de infecções, não somente dentro da instituição hospitalar, mas em toda a comunidade. Além disso, o custo para o tratamento de pacientes infectados com bactérias multirresistentes é

Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, São Miguel do Oeste, Brasil

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

^{1,3}Bióloga, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC

²Farmacêutica-Bioquímica pela UFSM, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFRGS e doutoranda em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS

⁴Bióloga, Especialização em Tecnologia e Controle de Qualidade de Alimentos, Mestranda em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- UFRGS

⁵Químico pela UFRGS, doutor em Ciências Químicas, Universidad de Buenos Aires

maior, gerando um grande impacto econômico para o hospital e para os sistemas de saúde pública.⁽³⁾

P. aeruginosa é a maior causa de infecções oportunistas entre indivíduos imunocomprometidos. A disseminação desse micro-organismo é difícil de ser controlada devido a múltiplos mecanismos intrínsecos ou adquiridos de resistência a antimicrobianos.^(3,4,5) Infecções por *P. aeruginosa* multirresistente a drogas estão aumentando em todo o mundo.^(6,7,8) Embora a definição de multirresistência seja variável, frequentemente associa-se à resistência a fluorquinolonas, cefalosporinas de amplo espectro, carbapenêmicos e aminoglicosídeos.⁽⁶⁾

Dados relacionados à redução da suscetibilidade de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos vêm sendo descritos no Brasil,^(4,9-11) destacando-se a diminuição de sensibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação, como os carbapenêmicos.^(10,12) A resistência a fluorquinolonas, como norfloxacino e ciprofloxacino, também foi observada no País.^(9,13) Devido à multirresistência frequentemente observada em linhagens de *P. aeruginosa*, torna-se de grande importância o levantamento de dados sobre o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de linhagens provenientes do ambiente hospitalar.

Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de linhagens de *P. aeruginosa* isoladas de ralos e pias de enfermarias de dois hospitais da região oeste de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram coletadas 104 amostras de ralos e pias de enfermarias de dois hospitais da região oeste de Santa Catarina, sendo 52 em cada hospital. Em cada hospital coletaram-se 26 amostras em ralos e 26 amostras em pias. As coletas foram efetuadas com o auxílio de um *swab* e armazenadas em solução salina estéril (0,8% NaCl). Em seguida, foram acondicionadas em caixa isotérmica e encaminhadas ao laboratório de Pesquisa e Diagnóstico de Microbiologia onde foi realizada a inoculação e identificação dos micro-organismos.

Isolamento e identificação

As amostras foram inoculadas em caldo nutriente (CN) (Merck) a 36°C por 24 horas. Em seguida foram estriadas em placas contendo Agar Cetrimide (Merck). As colônias características foram repicadas para Agar Infusão Cérebro Coração (BHI, Merck) e incubadas a 36°C por 24 horas. Primeiramente, as amostras foram submetidas à coloração de Gram⁽¹⁴⁾ com a finalidade de diferenciar as bactérias baseado na estrutura da parede celular e morfologia. Após, realizaram-se testes bioquímicos para identificação de *P. aeruginosa* utilizando-se as seguintes provas: catalase, citocromo-oxidase, produção de piocianina, crescimento a 42°C, redução de nitrato a nitrito, prova oxidação-fermentação, motilidade, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e indol.^(14,15)

Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Os antibiogramas foram realizados pelo método de difusão em discos⁽¹⁶⁾ segundo as recomendações do Committee for Clinical Laboratory Standard (CLSI). As linhagens identificadas como *P. aeruginosa* foram cultivadas novamente em caldo BHI por seis horas a 37°C. Como controle foi utilizado *P. aeruginosa* ATCC 15442. Após incubação, a densidade da suspensão foi comparada e ajustada com o padrão 0,5 de MacFarland. Em seguida, essa suspensão foi semeada na superfície de placas de Agar Müller-Hinton (Merck), onde foram aplicados os discos de antibióticos. Foram utilizados os seguintes antibióticos: gentamicina 10 µg, amicacina 30 µg, imipenem 10 µg, ceftriaxona 30 µg, ceftazidima 30 µg, cefalotina 30 µg, ciprofloxacina 5 µg e norfloxacina 10 µg. A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos. As medidas dos diâmetros das zonas de inibição permitiram definir três categorias de linhagens: sensível, moderadamente sensível e resistente.

Levantamento de dados

Foi aplicado um questionário aos hospitais envolvidos neste estudo, enfatizando sobre a utilização de antimicrobianos, destino dos antimicrobianos vencidos, controle da infecção hospitalar e desinfecção de pias e ralos (Quadro 1). As perguntas foram aplicadas após validação do questionário por especialistas na área.

1. Quais dos antibióticos abaixo são utilizados neste hospital? Qual deles é o mais utilizado?
 Ciprofloxacina Norfloxacina
 Gentamicina Amicacina
 Ceftazidima Ceftriaxona
 Cefalotina Imipenem
2. No caso de uma infecção bacteriana, qual o procedimento efetuado antes da utilização de um antibiótico?
3. Como é feita a desinfecção de pias e ralos? Quais produtos são utilizados?
4. Quais os procedimentos utilizados para controle da infecção hospitalar nas enfermarias hospitalares?
5. A limpeza das enfermarias é efetuada em que circunstâncias? Após a alta de um paciente qual o procedimento?
6. Qual o destino dos antimicrobianos vencidos?

Quadro 1 – Questionário aplicado aos hospitais participantes do estudo

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*

Das 104 amostras coletadas de ralos e pias, 49 (47%) foram positivas para *P. aeruginosa*. O Hospital B apresentou maior frequência de linhagens positivas (Figura 2). A presença de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar em locais úmidos foi diagnosticado por Widmer⁽¹⁷⁾ e Santos,⁽¹⁸⁾ mas não foi encontrada nenhuma pesquisa específica sobre a presença de *P. aeruginosa* em ralos e pias, havendo uma escassez de

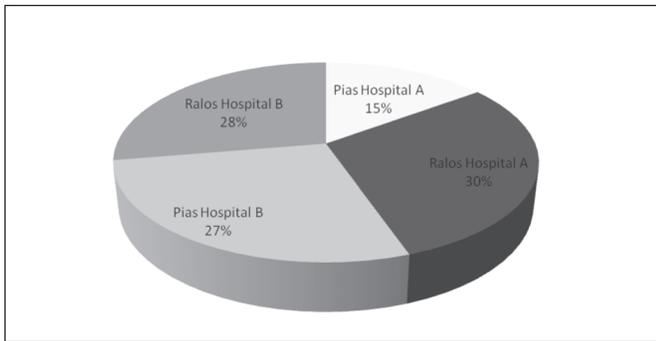


Figura 2 – Frequência das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas nos hospitais em estudo.

dados para comparação. Os veículos de transmissão mais reportados são equipamentos respiratórios contaminados, soluções de limpeza, cateteres, e até mesmo sabonetes.^(19,20)

Suscetibilidade aos antimicrobianos

Das 49 linhagens de *P. aeruginosa* coletadas em ralos e pias de enfermarias hospitalares, todas mostraram-se resistentes para a cefalotina, enquanto que para ciprofloxacina observou-se elevada sensibilidade (Figura 3).

Resultados semelhantes foram descritos por Araújo, Schreiner & Guerra,⁽²¹⁾ que encontraram 100% de resistência a esta mesma droga, destacando que *P. aeruginosa* apresentou baixo percentual de sensibilidade às cefalosporinas de primeira geração. A resistência a esta cefalosporina verificada no presente estudo poderia estar relacionada ao uso exagerado deste antibiótico, uma vez que foi relatado que a cefalotina é o antibiótico mais utilizado em ambos os hospitais.

A resistência observada para cefalosporinas de terceira geração utilizadas neste estudo – ceftriaxona e ceftazidima – foi de 18,4% e 10,2% respectivamente. Uma porcentagem superior de linhagens resistentes a ceftriaxona (65,4%) foi descrita para hospitais de Niterói, RJ.⁽²²⁾ Essa diferença pode

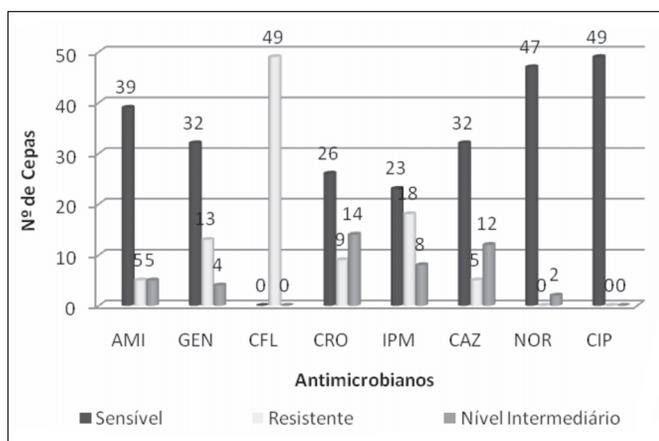


Figura 3 – Perfil de resistência de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pias e ralos de enfermarias hospitalares aos antimicrobianos amicacina (AMI), gentamicina (GEN), cefalotina (CFL), ceftriaxona (CRO), imipenem (IPM), ceftazidima (CAZ), norfloxacina (NOR) e ciprofloxacina (CIP)

estar relacionada ao fato de que os antimicrobianos ceftriaxona e ceftazidima são utilizados em apenas um hospital do presente estudo e em pequena escala.

Fristche, Sader & Jones⁽²³⁾ e Menezes et al⁽¹³⁾ relataram resistência ao imipenem de 15,4% e 50%, respectivamente. No presente estudo, a resistência a este antimicrobiano foi de 36,7%, semelhante ao perfil de suscetibilidade encontrado por Soares,⁽²²⁾ onde 35,8% das linhagens foram resistentes.

Entre os aminoglicosídeos testados neste estudo – gentamicina e amicacina – a resistência encontrada foi de 26,5% e 10,2% respectivamente. Menezes et al⁽¹³⁾ encontraram resistência de 83,4% para gentamicina e 76,6% para amicacina em um Hospital Geral de Fortaleza, CE. Em um estudo realizado em UTIs do Canadá foram isoladas 419 linhagens de *P. aeruginosa*, entre as quais observou-se uma baixa resistência para esses antibióticos, 4% para amicacina e 32% para gentamicina.⁽²⁴⁾

Para ciprofloxacina e norfloxacina foi encontrada elevada sensibilidade, 100% e 95,9%, respectivamente. Estas fluorquinolonas não são utilizadas nos hospitais em estudo, por isso pode-se explicar a baixa resistência e diferenças substanciais deste resultado com outros autores que relatam alta resistência como 76,6% para ciprofloxacina⁽¹³⁾ e 58,3% para norfloxacina.⁽²¹⁾ *P. aeruginosa* isoladas de infecções do trato respiratório e de pele em hospitais do Egito mostraram-se altamente sensíveis a norfloxacina, representando 64% e 71% das amostras, respectivamente.⁽²⁵⁾ No Canadá, 70,4% das amostras isoladas de UTIs foram sensíveis para ciprofloxacina.⁽²⁴⁾

P. aeruginosa é um micro-organismo resistente a muitas classes de antimicrobianos, tornando-se dominante e importante quando bactérias mais suscetíveis da microbiota normal são suprimidas, caracterizando-se assim como típico de infecções hospitalares.⁽²⁶⁾ Nesta pesquisa observaram-se diferenças quanto à resistência nos hospitais em estudo, sendo que o hospital A apresentou mais linhagens resistentes para o imipenem, gentamicina e amicacina (Figura 4) enquanto que o hospital B apresentou mais linhagens resistentes para a cefalotina, ceftriaxona e ceftazidima, sendo que os dois últimos antibióticos são utilizados somente neste hospital. Das 49 linhagens isoladas, 20 (40,8%) foram resistentes a pelo menos três antibióticos, ou seja, apresentaram multirresistência.⁽⁶⁾ As amostras coletadas em ralos do hospital A foram as que apresentam maior multirresistência (Figura 5). Jane-castilho et al.⁽²⁷⁾ encontraram multirresistência em 58,3% das linhagens isoladas em um hospital da Cidade do México. Nos Estados Unidos observou-se um aumento progressivo de *P. aeruginosa* multirresistente (resistência para três ou mais antibióticos) sendo que, em 2001, foram observadas 7,1% e, em 2003, foram isoladas 9,9% de linhagens com essa característica.^(28,29)

Teixeira et al⁽³⁰⁾ relataram que 56,2% dos casos de pneumonia são causados por linhagens multirresistentes de *P. aeruginosa*, demonstrando como a presença desta bactéria, principalmente as linhagens portadoras de resistência, são perigosas no ambiente hospitalar. *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a um número elevado de agentes

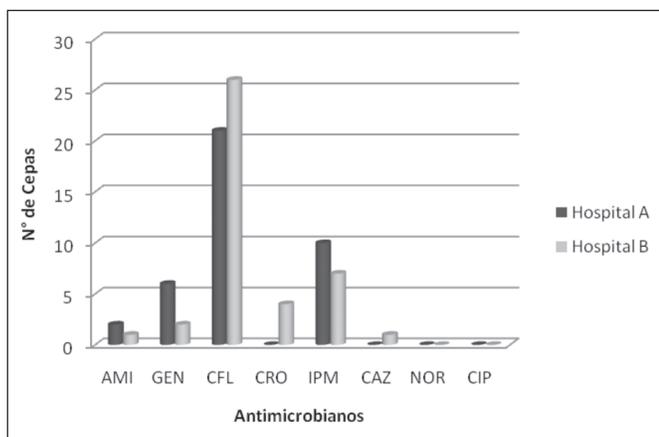


Figura 4 – Frequência de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes nos hospitais em estudo. Amicacina (AMI), gentamicina (GEN), cefalotina (CFL), ceftriaxona (CRO), imipenem (IPM), ceftazidima (CAZ), norfloxacina (NOR) e ciprofloxacina (CIP)

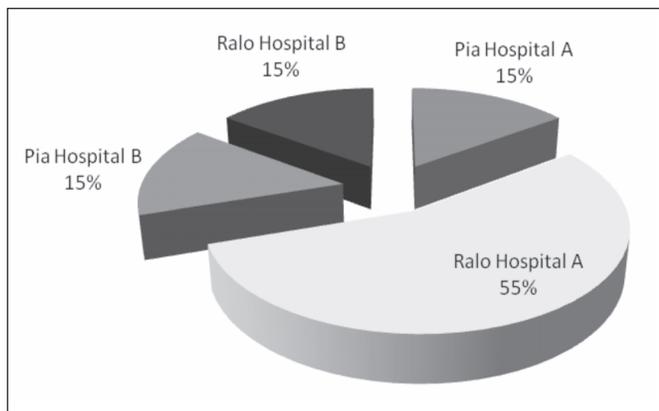


Figura 5 – *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes nos hospitais em estudos

antimicrobianos incluindo múltiplas classe.^(31,6) Este estudo confirmou esta multirresistência, demonstrando resistência a antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas de 1º e 3º geração, indicando que apenas fluorquinolonas apresentam-se eficientes contra *P. aeruginosa*.

Dados do questionário

Com base nas respostas do questionário aplicado (Figura 1) observa-se que ciprofloxacina e norfloxacina não são utilizadas nos hospitais em estudo. Cefalotina, imipenem, gentamicina e amicacina são usadas em ambos os hospitais e ceftazidima e ceftriaxona usadas somente no hospital B. A partir destes dados, é possível inferir que os antibióticos mais usados foram os que apresentaram maior resistência em comparação aos que não eram utilizados pelos hospitais.

O controle de infecções é um dos maiores desafios encontrados pela maioria dos hospitais. Assim, perguntou-se aos hospitais em estudo quais os procedimentos para controle da infecção nas enfermarias, já que nestes locais encontram-se muitos pacientes com o sistema imunológico afetado. Ambos os hospitais relataram que, para controlar a

infecção hospitalar, utiliza-se a limpeza como procedimento regular.

Para o desenvolvimento das ações de prestação de assistência à saúde, além de outros fatores, é necessário um ambiente seguro, higiênico e com asseio. A limpeza concorrente deve ser feita diariamente quando o paciente ainda se encontra na unidade, ou de acordo com as necessidades e tem por finalidade a manutenção da limpeza e a organização do ambiente.⁽³²⁾ Todo o material usado para a limpeza deverá ser lavado, desinfetado diariamente e guardado em local apropriado. No presente estudo, ambos os hospitais relataram realizar a limpeza concorrente e guardar o material de limpeza em local apropriado.

Já a limpeza terminal deve ser realizada após alta, óbito ou transferência do paciente da unidade, tendo por finalidade a redução da contaminação do ambiente. Deve haver rigorosa limpeza do teto, do piso e das paredes.⁽³²⁾ Neste estudo não houve relato por parte dos hospitais quanto à limpeza terminal sempre que um paciente recebe alta, porque nas enfermarias hospitalares há grande número de pessoas e somente quando todos os pacientes ganham alta é que se realiza tal procedimento.

A higienização é um dos elementos primários e eficazes nas medidas de controle para romper a cadeia epidemiológica das infecções.⁽⁶⁾ Sendo a limpeza o principal procedimento relatado pelos hospitais, perguntou-se como era efetuada a desinfecção de pias e ralos. O hospital A afirmou utilizar apenas hipoclorito de sódio e o hospital B hipoclorito de sódio e detergente comum.

Foi perguntado aos hospitais em estudo qual o procedimento efetuado no caso de uma infecção hospitalar antes da utilização de um antibiótico. Ambos os hospitais relataram identificar o micro-organismo causador da infecção, entretanto nenhum deles mencionou a utilização do teste de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) antes da utilização do antibiótico, sendo, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (2005), a principal forma de identificar o antibiótico mais eficaz para combater uma infecção nosocomial.

Perguntou-se também qual o destino dos antimicrobianos vencidos. Ambos os hospitais afirmaram eliminar pelos ralos e o hospital B relatou queimar quando possível. Desta forma, o desenvolvimento de resistência observado pela bactéria *P. aeruginosa* isoladas de ralos e pias destes hospitais pode estar relacionado a este fato, pois o contato com os antibióticos pode induzir a resistência. As drogas atuam como agentes seletivos, favorecendo bactérias resistentes presentes na população. Isso, juntamente com o uso abusivo dos antimicrobianos contribui para aumentar a pressão seletiva dessas drogas, criando ambiente muito favorável às bactérias resistentes.

CONCLUSÃO

Assim, a partir dos resultados obtidos conclui-se que ralos e pias em enfermarias hospitalares representam um risco potencial para a saúde pública, pois comportam micro-organismos potencialmente perigosos e carreadores de

resistência. Neste estudo isolou-se *P. aeruginosa* apresentando altos níveis de resistência. Os antibióticos para os quais as cepas de *P. aeruginosa* apresentaram resistência são os mais utilizados pelos hospitais, conforme relatado nos questionários. Portanto, é extremamente importante o monitoramento local da eficácia dos agentes antimicrobianos, sendo útil para uma escolha adequada na terapia empírica, antes que seja conhecido o resultado microbiológico.

Considerando que as alternativas de tratamento para infecções por *P. aeruginosa* são escassas, principalmente pela ocorrência de resistência intrínseca a muitos dos antimicrobianos de emprego clínico, a melhor opção é a implantação de programas para o uso racional de antibióticos, a fim de reduzir a ocorrência desses fenômenos no ambiente hospitalar.

REFERÊNCIAS

- Anthony M, Rose B, Pegler MB, Elkins M, Service H, Thamotherspillai K, et al. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(8):2772-8.
- Meirelles-Pereira F, Pereira AM, Silva MC, Gonçalves VD, Brum PR, Castro EA, et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz J Microbiol.* 2002;33(4):287-93.
- Mcgowan JE Jr. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):286-92.
- Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(3):216-24.
- Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006;119(6 Suppl 1):S3-10.
- Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(5): 436-40.
- Raja NS, Singh NN. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007;40(1):45-9
- Van Eldere J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(2):347-52.
- Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1): 140-1.
- Figueiredo EA, Ramos H, Maciel MA, Vilar MC, Loureiro NG, Pereira RG. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2007;19 (4):421-7.
- Zavascki AP, Goldani LZ, Gonçalves AL, Martins AF, Barth AL. High prevalence of metallo-beta-lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. *Epidemiol Infect.* 2007;135(2):343-5.
- Gales AC, Torres PL, Vilarinho DS, Melo RS, Silva CF, Cereda RF. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(4):267-71.
- Menezes EA, Silveira LA, Cunha FA, Cavalcante MS, Teixeira AB, Oliveira IR, et al. Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Pseudomonas* isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. *Rev Bras Anál Clín.* 2003;35(4): 177-80.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido. 5a ed. Medsi: Rio de Janeiro, 2001. 1465p.
- Macfaddin JF. Biochemical tests for identifications of medical bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.
- Collins CH, Lyne PM. Métodos microbiológicos. Acribia: Zaragoza, 1989. 359p.
- Widmer AF, Wenzel RP, Trilla A, Bale MJ, Jones RN, Doebbeling BN. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of a health care worker. *Clin Infect Dis.* 1993;16(3):372-6.
- Santos FL, Santos IB, Assis AL, Menezes LC. Determinação da produção de metalo-β-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J Bras Patol Med Laborat.* 2002;38(4):291-6.
- Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of ceftipime-mikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2072-8.
- Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2587-615.
- Araújo PR, Schreiner FJ, Guerra IF. Perfil de suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* isolada no Hospital Geral de Caxias do Sul. Livro de Resumos do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Rio de Janeiro, 1997.
- Soares MC. Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói - RJ. 2005. 78f. Dissertação (Pós-Graduação em Patologia) - Universidade Fluminense, Niterói, 2005.
- Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftobiprole, a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, tested against contemporary pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2005-2006). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61(1):86-95.
- Walky A, Decorby M, Nichol K, Mulvey MR, Hoban D, Zhanel G; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients in Canadian intensive care units as part of the Canadian National Intensive Care Unit study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61(2):217-21.
- Gad GF, el-Domany RA, Ashour HM. Antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt. *J Urol.* 2008;180(1):176-81
- Blatt JM, Miranda MC. Perfil dos organismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. *Rev Panamer Infect.* 2005;4(7):10-4.
- Jane-Castilho V, Ribas-Aparicio RM, Osorio-Caranza L, Aparicio G. Linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar multiresistentes a 21 antibióticos. *Rev Bioquím.* 2006;31(2):41-8.
- Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(6):630-6.
- Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18(4):306-13.
- Teixeira PJ, Hertz FT, Cruz DB, Caraver F, Hallal RC, Moreira J S. Pneumonia associada a ventilação mecânica: impacto da multiresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. *J Bras Pneumol.* 2004;6(30):540-8.
- de Freitas AL, Barth AF. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. *Braz J Infect Dis.* 2002;6 (1):1-7.
- Pereira MS, Junior JPS, Tanaki GM. Eliminação de resistência a drogas por fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. *Pesq Vet Bras.* 2004;1(24):11-4.

Autor correspondente

Eliandra Mirlei Rossi

Rua Oiapoc, 211 – Bairro Agostini
89900-000 – São Miguel do Oeste, SC

Perfil dos pacientes diabéticos Tipo 2 atendidos no laboratório do Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso - Minas Gerais

Profile of diabetics patients type 2 attended in the laboratory of Asilo de Caridade (Santa Casa) in Bom Sucesso – Minas Gerais

Lubiana Aparecida Souza Almeida¹, Maria Ruth Gonçalves Gaede Carrilho², Núncio Antonio de Araújo Sób³,
Maria Claudia Feres Monteiro de Castro⁴, Angélica Alves Lima²

Resumo: O conhecimento do perfil dos diabéticos do município de Bom Sucesso, que registrou, nos últimos anos, uma porcentagem significativa de óbitos hospitalares por diabetes, é importante para o desenvolvimento de estratégias visando prevenção e controle da doença. Neste trabalho, foi realizado um estudo descritivo com 77 indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2, atendidos no Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso, selecionados aleatoriamente, no período de julho de 2005 a janeiro de 2006. Observamos que 58% dos pacientes eram do sexo feminino, 79% estavam na faixa etária ≥ 45 anos, 83% tinham baixo grau de escolaridade e 12% descobriram ser portadores de diabetes após internação por complicações. Observou-se, no grupo, uma alta taxa de sedentarismo (65%), hipertensão (58%) e sobrepeso/obesidade (63%). Por outro lado, encontramos taxas menores, mas não ideais, de tabagismo (13%), etilismo (16%) e ausência de dietoterapia (23%). Foi observado desconhecimento dos indivíduos quanto a complicações crônicas, controle glicêmico e perfil lipídico. Uma porcentagem alta (26%) dos indivíduos apresentou alteração na filtração glomerular pela equação MDRD, apesar da creatinina normal. Os dados obtidos apontam a necessidade de um programa no município, visando a detecção de novos casos antes do aparecimento de complicações e a orientação dos diabéticos já diagnosticados acerca do controle, tratamento e prevenção da doença.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Controle; Prevenção

Abstract: The knowledge of the profile of diabetics from the city of Bom Sucesso in the State of Minas Gerais, which registered in the last years significant percentage of death by diabetics complications, is important for the implementation of strategies for preventing and controlling the disease. This paper was carried out with 77 subjects suffering from diabetes mellitus type 2. They had been attended in the laboratory of Asilo de Caridade (Santa Casa) from Bom Sucesso (MG). They were randomly selected from July 2005 to January 2006. 58% of the subjects were female, 79% were greater than 45 years old, 83% had low education and 12% found out they were diabetic after staying in hospital due to complications. The results showed high level of sedentary habits (65%), high blood pressure (58%) and overweight/obesity (63%). On the other hand, the study showed smaller levels, but not ideal, of smoking (13%), alcohol addiction (16%) and absence of diet therapy (23%). It was also observed subjects lack of knowledge as regards chronic complications, glicemic control and lipidic profile. A high percentage (26%) of the subjects showed changes in glomerular filtration rate through the equation MDRD, in spite of the creatinine level were normal. The data shed light on the necessity of a program aiming at detecting new cases before the complications start and the diabetic orientation, regarding the disease control, treatment and prevention.

Keywords: Diabetes mellitus; Control; Prevention

INTRODUÇÃO

A prevalência de diabetes mellitus (DM), especialmente tipo 2, e de situações de morbidade relacionadas a esta condição patológica, está aumentando de forma exponencial e adquirindo características epidêmicas em vários países independentemente do estágio de desenvolvimento econômico-social, mas adquirindo um destaque particular nos países em desenvolvimento.⁽¹⁻⁴⁾ Estimativa da OMS, realizada em 2000, apresentava uma prevalência de 177 milhões de pessoas com diabetes no mundo.⁽⁵⁾ Este aumento vem acontecendo em decorrência de vários fatores, tais como: aumento na taxa de urbanização, aumento da expectativa de vida,

industrialização, dietas hipercalóricas e ricas em hidratos de carbono de absorção rápida, deslocamento da população para zonas urbanas à procura de melhores condições de trabalho, mudanças de estilo de vida, inatividade física e obesidade.^(6,7)

No Brasil, um estudo multicêntrico de base populacional realizado no ano de 1988 em nove capitais demonstrou que a prevalência de DM e de tolerância à glicose diminuída na população urbana, entre 30 e 69 anos, foi de 7,6% a 7,8%, respectivamente, sendo que 46% dos diabéticos desconheciam sua condição, e, dos já diagnosticados, 22,3% não tinham nenhum tipo de assistência médica.⁽⁸⁾ As cidades das regiões Sul e Sudeste, consideradas de maior desenvolvimento econômico, apresentam as maiores prevalências de

¹Laboratório do Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso, MG

²Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto

³Centro de Saúde da Universidade Federal de Ouro Preto

⁴Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto

DM. Calcula-se que, em 2025, possa existir cerca de 11 milhões de diabéticos no Brasil, o que representa um aumento de mais de 100% em relação aos atuais 5 milhões detectados até o ano 2000.⁽⁵⁾

Os dados de morbidade e mortalidade hospitalar da população residente no município de Bom Sucesso, Minas Gerais, no período de 1998 a 2005, mostram uma queda proporcional da morbidade, não acompanhada de queda de mortalidade, o que pode significar a ocorrência de casos de maior gravidade. A porcentagem mais alta de mortalidade por DM no município está na faixa etária de 15 a 39 anos, o que representa grande impacto social por atingir indivíduos em idade produtiva.⁽⁹⁾

Esta situação demonstra a necessidade dos serviços de saúde pública do município reverem suas práticas, com a implantação de medidas de prevenção e controle da doença, visando reduzir os índices de morbi-mortalidade relacionados ao DM. Diversos estudos fornecem evidências sobre a eficácia da intervenção no estilo de vida, com ênfase na alimentação saudável e prática de atividades físicas na redução do risco para desenvolvimento do diabetes.⁽¹⁰⁻¹²⁾ Além disso, o controle da pressão arterial do portador de DM reduz os riscos de acidente vascular cerebral em 80%, de amputação de membros em 60%, de nefropatia em 50% e de problemas coronarianos em 40%.⁽¹³⁾ Neste mesmo sentido, as orientações do Ministério da Saúde⁽¹⁴⁾ são para se efetuarem intervenções antes das manifestações dos fenômenos patológicos. Assim, são recomendadas medidas preventivas a fim de minimizar o aparecimento dos fatores de risco ou reduzir a oportunidade de exposição das pessoas a eles. Estas medidas de prevenção e controle da doença devem levar em consideração que o DM é uma doença crônica e incurável que requer diagnóstico precoce assim como tratamento eficaz e permanente.

Apesar dos grandes avanços tecnológicos em relação ao diagnóstico e tratamento, a aderência dos pacientes ao preconizado é baixa. Alguns não buscam assistência médica adequada e, assim, desconhecem a doença e as complicações de saúde decorrentes da falta ou inadequação do tratamento. Outros encontram dificuldades de compreensão quanto à orientação recebida para o tratamento adequado ao seu quadro clínico.

Portanto, é de fundamental importância o conhecimento das características do grupo de diabéticos para o planejamento e desenvolvimento de atividades educacionais adequadas que beneficiem o portador de DM, oferecendo-lhe condições para realizar o controle e o tratamento.

Neste trabalho, descrevemos um grupo de portadores de *Diabetes Mellitus* atendidos no Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso, MG, e correlacionamos a avaliação laboratorial com o perfil dos diabéticos, visando melhor conhecimento do grupo e futuras ações para prevenção e controle da doença no município.

MÉTODOS

A área de abrangência deste trabalho foi o município de Bom Sucesso e seus distritos, situado na região do Rio

Verde, estado de Minas Gerais, com área territorial de 706 km² e 17.064 habitantes.

Foi realizado um estudo descritivo de amostra aleatória da população de Bom Sucesso portadora de DM tipo 2.

Foram entrevistados 77 indivíduos, cientes de sua condição de portadores de DM tipo 2, atendidos no Laboratório do Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso, ou que estiveram internados neste hospital, no período de julho de 2005 a janeiro de 2006, com solicitação para realização de exames de glicemia, independente do tipo de atendimento a eles prestado (Sistema Único de Saúde, outros convênios ou particular). Estes indivíduos foram informados sobre os objetivos do trabalho, o protocolo e os procedimentos a serem realizados. Aqueles que concordaram em participar do projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídos do estudo gestantes, pacientes com idade inferior a 16 anos e portadores de DM tipo 1.

A entrevista foi realizada imediatamente após a coleta de sangue, utilizando-se um questionário padronizado, dividido em três partes: Dados Gerais, Fatores Intervenientes no Controle da Doença e Complicações Agudas e Crônicas do DM. A abordagem foi de fácil compreensão para o entrevistado, respeitando sua idade e suas limitações pessoais, como nível de escolaridade.

A entrevista foi previamente aplicada a cinco portadores de DM tipo 2, sob a forma de estudo piloto. Desta forma, o instrumento foi julgado quanto à clareza e à facilidade de compreensão, não sendo necessária qualquer mudança ou adaptação.

Foram realizados exames de glicemia de jejum, colesterol total e fracionado, triglicerídeos e creatinina. As dosagens de lípides e creatinina foram realizadas no soro e a avaliação da glicemia de jejum em plasma fluoretado.

As determinações de glicose, colesterol total (CT), HDL-c, triglicerídeos (TG) e creatinina foram realizadas por métodos enzimático-colorimétricos no equipamento Labquest, usando o conjunto diagnóstico Gold Analisa. O LDL-c foi calculado usando a equação de Friedwald para os pacientes com TG < 400 mg/dL.

Para avaliação do perfil glicêmico dos pacientes foram utilizados os novos parâmetros de classificação propostos pela Associação Americana de Diabetes – ADA.⁽¹⁵⁾ Os valores de referência para o colesterol e triglicerídeos usados para análise correspondem aos estabelecidos na III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias.⁽¹⁶⁾

Os dados foram analisados através do programa SPSS 12.0 for Windows.

RESULTADOS

Neste trabalho, avaliamos o perfil dos pacientes diabéticos tipo 2, que realizaram glicemia de jejum por solicitação médica, no laboratório do Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso, internos e externos. A Tabela 1 apresenta uma descrição dos diabéticos estudados.

Observamos que a população avaliada tem um predomínio de pacientes do sexo feminino (58%) e que a faixa etária

≥ 45 anos foi a mais prevalente (79%) (Tabela 1). Quando analisamos os parâmetros sexo e idade, notamos que a porcentagem de indivíduos do sexo masculino é maior na faixa etária de 16 a 45 anos quando comparada com a população feminina. Entretanto, esta diferença não foi significativa.

Dos pacientes avaliados, 21% estavam internados e 79% não. A porcentagem de internos foi alta e sua avaliação mostrou que 44% têm idade entre 16 e 45 anos com predomínio do sexo masculino (88%). Dentre as características dos internos vale ressaltar também que 44% estavam com sobrepeso ou obesos e 25% eram fumantes.

A Tabela 1 também mostra que a maioria dos diabéticos avaliados apresentava história familiar para a doença (62%).

Quanto ao estado civil, 60% dos pacientes estavam casados e 40% solteiros, viúvos ou separados. Analisando apenas os pacientes internados, observamos que a porcentagem de solteiros e viúvos sobe para 50%.

Tabela 1. Distribuição numérica e percentual da amostra estudada no Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso quanto aos aspectos gerais

Parâmetros avaliados	N	%
Sexo		
Masculino	32	42
Feminino	45	58
Idade		
16 a 45 anos	16	21
≥ 45 anos	61	79
Atendimento		
Interno	16	21
Externo	61	79
História familiar de DM		
Não	28	37
Sim	48	62
Não soube informar	1	1
Estado civil		
Solteiro	16	21
Casado	46	60
Viúvo	14	18
Separado	1	1
Grau de escolaridade		
Baixa	64	83
Outros	12	16
Não soube informar	1	1
Tempo de convivência com DM		
0 a 5 anos	24	31
6 a 10 anos	24	31
11 a 15 anos	11	14
Acima de 15 anos	18	24
Local de realização do primeiro diagnóstico		
Consulta de nível básico	28	36
Exames de rotina	36	47
Internação por complicações	9	12
Não soube informar	4	5

Os dados apontaram que 83% dos diabéticos entrevistados têm baixo grau de escolaridade.

Outro parâmetro avaliado foi o tempo de convivência dos diabéticos com a doença. A maioria dos entrevistados relatou conviver com a doença há menos de 11 anos (62%). Entretanto, uma porcentagem considerável afirma conviver com a doença há mais de 15 anos (24%).

Observamos que 83% dos entrevistados relataram que o seu diagnóstico foi realizado em consultas de nível básico e exames de rotina, e uma porcentagem consideravelmente alta (12%) afirmou que descobriu ser portador de DM tipo 2 após internação por complicações.

A entrevista realizada com os diabéticos também mostrou que a maioria dos indivíduos afirmou seguir a dieta alimentar (77%), não consumir bebidas alcoólicas (84%) e não fumar (87%), fatores considerados satisfatórios para o controle e evolução da doença. Uma porcentagem alta de indivíduos (65%) relatou não praticar atividades físicas. Observamos que 58% dos indivíduos relataram ser hipertensos. A avaliação da obesidade mostrou que apenas 36% dos diabéticos estavam com o índice de massa corporal (IMC) normal, 42% estavam com sobrepeso e 21% eram obesos. Quanto aos estados depressivos, foram relatados por uma porcentagem considerável do grupo (23%).

Outro parâmetro analisado foi o uso de medicamentos. Observamos que 71% dos indivíduos usam hipoglicemiantes, 58% utilizam anti-hipertensivos, 10% usam hipolipemiantes e 23% antidepressivos. Os hipoglicemiantes usados pelos indivíduos em estudo foram: insulina, glibenclâmida, metformina, glicazida, glimepirida.

Avaliamos a presença ou não de complicações agudas e crônicas relatadas pelos diabéticos (Tabela 2).

A presença de complicações agudas foi relatada por 48% dos diabéticos. Quando avaliamos as complicações crônicas observamos que 64% dos indivíduos não sabiam informar se tinham ou não complicação macrovascular e 57% microvascular. Esta alta porcentagem de desconhecimento dificultou a nossa avaliação das alterações macro e microvasculares.

Considerando apenas os diabéticos que afirmaram apresentar complicações macrovasculares (Figura 1A), observamos que a maioria relatava doença coronariana (32%) e doença vascular periférica (25%). É importante ressaltar que 11% dos diabéticos analisados afirmaram ter doença coronariana, doença vascular periférica e doença cerebrovascular, sugerindo falta de controle.

Quanto às complicações microvasculares (Figura 1B), a porcentagem de diabéticos com retinopatia (30%), nefropatia (24%) ou neuropatia (19%) foi bastante significativa.

Os resultados dos exames laboratoriais (glicemia de jejum, perfil lipídico e creatinina) dos diabéticos participantes deste estudo estão mostrados na Tabela 3. A média das variáveis e o máximo e mínimo obtidos mostraram valores não ideais de glicose, colesterol total, triglicérides e LDL, considerando a população em estudo. Apenas os valores médios de creatinina estavam na faixa de normalidade, com baixo desvio padrão. Estes resultados apontam um descontrole na

Tabela 2. Distribuição numérica e percentual da amostra estudada no Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso quanto às complicações agudas e crônicas

	N	%
Complicações Agudas		
Sim	37	48
Não	37	48
Não soube informar	3	4
Complicações Crônicas		
Macrovasculares		
Doença coronariana (DC)	9	12
Doença cerebrovascular (DCV)	4	5
Doença vascular periférica (DVP)	7	9
DC, DCV e DVP	3	5
DC e DVP	4	3
DCV e DVP	1	1
Não soube informar	49	64
Microvasculares		
Retinopatia (RET)	10	13
Nefropatia (NEF)	8	10
Neuropatia (NEU)	6	8
RET, NEF, NEU	3	4
RET e NEU	2	3
NEF e NEU	1	1
RET e NEF	3	4
Não soube informar	44	57
Dermatológicas		
Ausente	67	87
Presente	7	9
Não soube informar	3	4

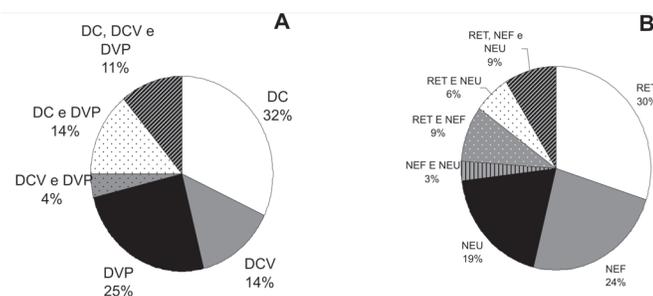


Figura 1 – Porcentagem de diabéticos que apresentam complicações macrovasculares (A) e microvasculares (B). (DC) doença coronariana, (DCV) doença cerebrovascular, (DVP) doença vascular periférica, (RET) retinopatia, (NEF) nefropatia, (NEU) neuropatia

glicemia de jejum e no perfil lipídico da maioria dos diabéticos do grupo.

A análise da glicemia de jejum mostrou que a maioria dos indivíduos apresentou valores alterados (≥ 100 mg/dL), caracterizando controle insatisfatório ou ausente. Apenas 10% dos diabéticos deste estudo estavam com a glicose na faixa normal (70 a 99 mg/dL). Quanto ao sexo, observamos que o percentual de homens com glicemia normal é maior. No que diz respeito à faixa etária, nossos resultados apontam mais

Tabela 3. Análise estatística dos exames bioquímicos dos pacientes DM tipo 2 participantes do estudo. Valores em mg/dL

Variáveis	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Glicose	77	168,96	145,00	80,62	71,00	441,00
TG	77	184,5	172,00	104,7	18,00	566,00
CT	77	233,94	233,00	48,06	136,00	357,00
HDL	76	51,75	48,50	16,65	22,00	98,00
LDL	72	145,94	147,00	41,55	51,00	227,00
Creatinina	76	0,6974	0,7000	0,1855	0,4000	1,4000

TG = Triglicerídeos, CT = Colesterol total, HDL = Lipoproteína de densidade alta, LDL = Lipoproteína de densidade baixa

Tabela 4. Correlação entre o controle glicêmico obtido na entrevista e a glicemia de jejum obtida por dosagem

Controle glicêmico Entrevista	Glicemia de jejum (mg/dL)		
	Normal	Alterada	Total
Não	2 (7%)	26 (93%)	28 (100%)
Sim	6 (12%)	43 (88%)	49 (100%)
Total	8 (10%)	69 (90%)	77 (100%)

descontrole na população mais jovem, pois a porcentagem de glicemia alterada na faixa de 16 a 45 anos foi maior. Entretanto, estas diferenças de glicemia em relação ao sexo e à faixa etária não foram significativas.

Os resultados do perfil lipídico apontam na mesma direção. A maioria dos diabéticos apresenta perfil lipídico fora do padrão ideal para a patologia (86%), estando o colesterol total alterado em 78% dos diabéticos; os triglicerídeos em 55%, o HDL em 76% e o LDL em 85%.

Quanto ao sexo, observamos que o percentual de homens com triglicerídeos e LDL alterado é maior. A população feminina apresentou maior alteração de colesterol total e HDL. Quanto à faixa etária, os resultados mostraram que a porcentagem de triglicerídeos e colesterol total alterada na faixa etária mais jovem foi maior que na faixa > 45 anos e o HDL estava mais alterado na população mais idosa. Entretanto, como na glicemia, estas diferenças no perfil lipídico em relação ao sexo e a faixa etária não foram significativas.

A maioria dos entrevistados (64%) afirmou conseguir controle glicêmico, o que não foi verificado pela análise laboratorial. A Tabela 4 relaciona o dado de controle glicêmico obtido na entrevista com os resultados da glicemia de jejum dos diabéticos. Dentre os indivíduos que disseram não ter controle glicêmico, 93% realmente apresentaram glicemia de jejum alterada (GJA). Entretanto, encontramos GJA em 88% dos diabéticos que afirmaram ter controle glicêmico satisfatório.

Resultado semelhante foi encontrado quando analisamos a dislipidemia (Tabela 5). Observamos alteração no perfil lipídico de 88% dos diabéticos que afirmaram não apresentar dislipidemia.

Estes dados mostram um desconhecimento dos indivíduos quanto à sua condição e a necessidade de um trabalho com este grupo visando uma maior conscientização e conhecimento acerca do DM, cuidados e complicações decorrentes desta patologia.

Tabela 5. Correlação entre a resposta a pergunta sobre presença ou não de dislipidemia obtida na entrevista e o perfil lipídico obtido por dosagem do colesterol total, triglicerídeos, HDL e cálculo de LDL. Consideramos Perfil Lipídico Normal quando todos os analitos se encontravam no valor de referência ideal e Perfil Lipídico Alterado quando pelo menos um dos testes apresentava valor não ideal.

Dislipidemia Entrevistada	Perfil lipídico		Total
	Normal	Alterada	
Não	8 (12%)	58 (88%)	66 (100%)
Sim	1 (13%)	7 (87%)	8 (100%)
Não informado	2 (67%)	1 (33%)	3 (100%)
Total	11 (14%)	66 (86%)	77 (100%)

Na avaliação laboratorial também fizemos a dosagem da creatinina sérica dos diabéticos no intuito de analisar a sua função renal. Observamos que 93% dos indivíduos apresentaram níveis normais de creatinina. A análise dos dados pela equação de Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD)⁽¹⁷⁾ mostrou que 26% dos diabéticos apresentaram insuficiência renal funcional ou leve apresentando um ritmo de filtração glomerular entre 60 e 89 mL/min/1,73m² e 4% insuficiência renal moderada, que corresponde ao ritmo de filtração glomerular compreendido entre 30 e 59 mL/min/1,73 m².⁽¹⁸⁾ Pode-se constatar que uma porcentagem consideravelmente alta dos indivíduos apresenta alteração na filtração glomerular, apesar da creatinina normal.

DISCUSSÃO

Nas características gerais do grupo, avaliamos sexo, idade, história familiar, estado civil, grau de escolaridade, tempo de convivência com a doença e local de realização do primeiro diagnóstico.

Observamos que a maioria dos diabéticos era do sexo feminino, estava na faixa etária acima de 45 anos e tinha história familiar para a doença. Por se tratar de DM tipo 2, a idade e a relação com história familiar eram esperadas.⁽¹⁹⁾ A amostra foi constituída por um maior número de mulheres, pois estas procuraram mais o laboratório no período do estudo.

Outro dado geral estudado foi o estado civil. Verificamos neste grupo que a porcentagem de solteiros e viúvos internados foi alta e alguns autores mostram que há uma frequente relação entre o estado civil e a morbidade e mortalidade, evidenciando o coeficiente mais elevado de mortalidade entre viúvos, divorciados e solteiros, com menor suporte familiar para enfrentar as situações adversas.^(7,20,21)

Observou-se ainda que 83% dos diabéticos entrevistados têm baixo grau de escolaridade. Este dado foi bastante relevante, uma vez que a baixa escolaridade pode dificultar o entendimento de orientações terapêuticas e, conseqüentemente, o seu seguimento. Está relacionada também com maiores taxas de sedentarismo e dificuldades de adequação à dieta alimentar requerida pela doença.⁽⁷⁾ Trabalhos educacionais com este grupo devem ser realizados com linguagem acessível e de forma interativa e gradual, buscando a compreensão e interesse.⁽²²⁻²⁴⁾

Outro parâmetro avaliado foi o tempo de convivência dos diabéticos com a doença. A maioria dos entrevistados relatou conviver com a doença há menos de 11 anos. Devemos considerar, entretanto, que, no DM tipo 2, o tempo de conhecimento da doença pode não expressar o tempo real de presença da patologia, devido ao desconhecimento do indivíduo de sua condição por meses ou anos, o que contribui para o surgimento mais precoce de complicações crônicas. A duração do DM está fortemente associada com a frequência e severidade das complicações.⁽²⁵⁾

Um dado interessante para a continuidade do trabalho com este grupo foi obtido com o levantamento do local onde se estabeleceu o primeiro diagnóstico. Uma porcentagem consideravelmente alta (12%) dos diabéticos afirmou que descobriu ser portador de DM tipo 2 após internação por complicações. Isto é preocupante e aponta a necessidade de campanhas de diabetes no município, visando detecção precoce e um maior conhecimento acerca da doença e de sua prevenção.

Os fatores relacionados ao DM analisados foram: dieta, tabagismo, etilismo, sedentarismo, hipertensão, obesidade e estados depressivos.

As porcentagens de indivíduos que afirmaram não seguir dieta alimentar (23%), fumantes (13%), consumidores de bebidas alcoólicas (16%), sedentários (65%), hipertensos (58%), em sobrepeso (42%) e obesos (21%), embora bastante distintas apontaram a necessidade de um trabalho educativo, visando a conscientização do grupo no sentido de melhorar estes parâmetros, interferindo no controle e evolução da doença.

Os estados depressivos foram relatados por 23% dos indivíduos. Esta porcentagem foi bem menor do que a encontrada por Moreira e colaboradores.⁽²¹⁾ Estes pesquisadores descreveram que o DM praticamente duplica o risco de depressão, e um em cada três pacientes diabéticos tem sintomas depressivos. Eles também discutiram que a prevalência de depressão varia sistematicamente em função do instrumento e da amostra utilizada. A discrepância entre os nossos resultados e os de Moreira e colaboradores pode ter sido ocasionada pelo critério usado por nós para classificar o indivíduo como portador de estado depressivo: afirmar ter depressão e usar medicamento específico para seu tratamento.

O terceiro ponto analisado foi relativo às complicações agudas e crônicas apresentadas pelo grupo estudado. Uma porcentagem significativa dos diabéticos (48%) relatou a presença de complicações agudas. Por outro lado, uma alta porcentagem dos indivíduos não sabia informar se tinha ou não complicação crônica. Este desconhecimento dificultou a avaliação das alterações macro e microvasculares. A participação do diabético em grupos educativos que informem e conscientizem de sua condição e de suas limitações é imprescindível para que ele possa participar ativamente no controle de sua doença, visto que portadores de diabetes são responsáveis por 95% de seus cuidados.⁽²³⁾ Para Lessa e Pousada,⁽²⁶⁾ uma boa assistência ao diabético deve ser integral, com ênfase em programas educativos para prevenção e controle

das complicações agudas e crônicas e na detecção precoce dessas.

O United Kingdom Prospective Diabetes Study – UKPDS⁽²⁷⁾ é um estudo que mostra que as complicações agudas e crônicas do DM tipo 2 não são um resultado inevitável da doença e que seus riscos podem ser reduzidos com uma terapia apropriada. A educação é, sem dúvida, a estratégia básica para a redução da morbi-mortalidade de DM, permitindo a plena integração do paciente na sociedade.

A avaliação laboratorial dos diabéticos participantes deste estudo mostrou valores não ideais de glicose, colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL. Apenas os valores médios de creatinina estavam na faixa de normalidade. Estes resultados apontam um descontrole na glicemia de jejum e no perfil lipídico da maioria dos indivíduos do grupo. A maioria dos entrevistados, quando questionados sobre o controle glicêmico e a presença de dislipidemia afirmou conseguir controle e não apresentar alterações de perfil lipídico, o que não foi verificado pela análise laboratorial. Este dado mostrou um desconhecimento dos indivíduos quanto à sua condição e a necessidade de um trabalho com este grupo visando uma maior conscientização e conhecimento acerca do DM.

Observou-se, também, que a maioria dos indivíduos apresentou níveis normais de creatinina (93%), apesar de muitos afirmarem ter nefropatia e os dados de controle e cuidados sugerirem um número maior de complicações renais. A determinação de creatinina sérica é atualmente largamente utilizada como marcador indireto da velocidade de filtração glomerular; entretanto, este parâmetro não é ideal por ser dependente da massa muscular e estar relacionado ao sexo e idade.⁽²⁸⁾

De acordo com Hoek e colaboradores,⁽²⁹⁾ a medida da creatinina C seria o parâmetro endógeno ideal para avaliação da velocidade de filtração glomerular, inclusive para o seguimento de alterações em pacientes diabéticos. No entanto, a dosagem da creatinina C apresenta alto custo limitando sua utilização. A National Kidney Foundation recomenda para o diagnóstico e estratificação das doenças renais crônicas o uso de equações preditivas para estimar a velocidade de filtração glomerular a partir dos valores de creatinina sérica e outras variáveis como idade, sexo, raça e peso corporal.⁽³⁰⁾ As equações propostas são a fórmula de Cockcroft-Gault,⁽³¹⁾ também recomendada pela Associação Americana de Diabetes,⁽³²⁾ e a equação de Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD).⁽¹⁷⁾

Mais recentemente, Rigalleau e colaboradores⁽³³⁾ mostraram que, embora ambas as equações ainda apresentem certas imperfeições, a equação MDRD é mais precisa para o diagnóstico e estratificação da falência renal em pacientes diabéticos.

A análise dos dados dos diabéticos deste estudo, pela equação de Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD), mostrou que 30% dos indivíduos apresentaram alteração na filtração glomerular, apesar da creatinina normal, e reforçou que um grupo de risco como este deve ter sua função renal não apenas monitorada pelos níveis de creatinina, mas também pelas equações anteriormente discutidas.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos apontam para a necessidade de implantação de um programa de controle e prevenção de diabetes no município de Bom Sucesso, MG. Este programa deve buscar a detecção de novos casos através de campanhas e orientar a população sobre hábitos de vida saudáveis que visem a prevenção de DM.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à diretoria do Asilo de Caridade (Santa Casa) de Bom Sucesso, representada por Doutor Waldir Vicente Vieira, pelo apoio para realização deste trabalho. Agradecemos também à Sônia Vilela pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

1. Pupo AA. Diabetes Mellitus na criança e adolescente. In: Setian N. (Coordenação). Endocrinologia Pediátrica: aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente. São Paulo, Savier, 1989.
2. Malerbi DA. Estudo da prevalência do Diabetes Mellitus no Brasil. São Paulo, 1991. 154p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1991.
3. Batista MC, Priore SE, Posado LE, Tinoco AL, Franceschini SC. Avaliação dos resultados da atenção multiprofissional sobre o controle glicêmico, perfil lipídico e estado nutricional de diabéticos atendidos em nível primário. Revista de Nutrição. 2005;18(2):228-9.
4. Oliveira CH, Berger K, Souza SC, Marui S, Khawali C, Hauache OM, et al. Monitorização contínua da glicose: análise crítica baseada em experiência ao longo de um ano. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica. 2005; 49(6):983-90.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Diabetes e Hipertensão Arterial. Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes Mellitus. Caderno 7. Brasília, 2001.
6. Ortis MC, Zanetti ML. Type 2 diabetes mellitus risk factors in a school in the health field. Revista Latino-Americana de Enfermagem. 2000;8(6):128-32.
7. Guimarães FP, Takayanagui AM. Advices received from health service by patients for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Revista de Nutrição. 2002;15(1):37-44.
8. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Diabetes Care. 1992;15(11):1509-16.
9. DATASUS Indicadores Municipais de Saúde. Disponível em <http://www.datasus.gov.br >. Acesso em 28 jan 2007.
10. Gomes MB, Fernandes LM, Fuks AG, Pontes CR, Castro SH, Affonso FS, et al. Variabilidade do controle glicêmico de pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 durante um ano de acompanhamento. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2001;4(2):141-7.
11. Ferreira SR, Almeida B, Siqueira AF, Khawali C. Interventions on the prevention of type 2 diabetes mellitus: is it feasible a population based program in our country? Arq Bras Endocrinol Metabol. 2005;49(4):479-83. [Portuguese].
12. Sartorelli DS, Franco LJ, Cardoso MA. Nutritional intervention and primary prevention of type 2 diabetes mellitus: a systematic review. Cad Saude Publica. 2006;22(1):7-18. [Article in Portuguese].
13. Sellì L, Papaleo LK, Meneguel SN, Torneros JZ. Education techniques in diabetes treatment. Cad Saude Publica. 2005;21(5):1366-72. [Spanish].
14. Brasil. Ministério da Saúde. Doenças crônico-degenerativas: evolução e tendências atuais. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 1988.
15. ADA - American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2004;27(1):S5-S10.
16. Santos RD. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2001;77(suplIII):1-48.
17. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation: Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med. 1999 Mar 16;130(6):461-70. Comment in: Ann Intern Med. 1999;131(8):629; author reply 630. Ann Intern Med. 2004;140(11):934; author reply 934-5.

18. Romão Júnior JE. DRC: definição, epidemiologia e classificação. *J Brás Nefrol.* 2004;XXVI(3): supl.1.
19. Hother-Nielsen O, Faber O, Sorensen NS, Beck-Nielsen H. Classification of newly diagnosed diabetic patients as insulin-requiring or non-insulin-requiring based on clinical and biochemical variables. *Diabetes Care.* 1988;11(7):531-7.
20. Martins IS, Coelho LT, Mazzilli RN, Singer Jda M, de Souza CU, Antonieto Júnior AE, et al. Atherosclerotic cardiovascular diseases, dyslipidemia, hypertension, obesity, and diabetes mellitus in a population of the metropolitan area of southeastern Brazil. I--Research methodology *Rev Saude Publica.* 1993;27(4):250-61. [Article in Portuguese].
21. Moreira RO, Papelbaum M, Appolinario JC, Matos AG, Coutinho WF, Meirelles RM, et al. Diabetes Mellitus e depressão: uma visão sistemática. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2003;47(1):19-29.
22. SBD. Consenso brasileiro de conceitos e condutas para o diabetes mellitus: recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes para a prática clínica. São Paulo, 1997. 56p.
23. IDF, International Diabetes Federation: Complicações do diabetes e educação. *Diabetes Clínica.* 2002;6(3):217-20.
24. Biral AM, Cardoso PM, Grunspan S. A importância do educador em diabetes mellitus. *Diabetes Clínica.* 2005;3:205-11.
25. Boelter MC, Azevedo MJ, Gross JL, Lavinsky J. Risk factors for diabetes retinopathy. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.* 2003; 66(2):239-47.
26. Lessa I, Pousada J, Fonseca J. Qualidade da assistência médica ao diabético. *Arq Bras Med.* 1988;62:459-63.
27. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998;352(9131):837-53. Erratum in: *Lancet* 1999;354(9178):602.
28. Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. *Annu Rev Med.* 1988;39:465-90.
29. Hoek FJ, Kemperman FA, Krediet RT. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18(10):2024-31.
30. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G; National Kidney Foundation. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med.* 2003;139(2):137-47. Comment in: *Ann Intern Med.* 2003; 139(2):136. *Ann Intern Med.* 2004;140(11):933-4; author reply 934-5.
31. Cockcroft DW, Gault HM. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976;16(1):31-41.
32. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2011;24:533-43.
33. Rigalleau V, Lasseur C, Perlemoine C, Barthe N, Raffaitin C, Liu C, et al. Estimation of glomerular filtration rate in diabetic subjects: Cockcroft formula or modification of Diet in Renal Disease study equation? *Diabetes Care.* 2005;28(4):838-43.

Autor correspondente
Maria Ruth Gaede Carrillo
Rua Itacolomi 814 - Vila dos Engenheiros
35400-000 – Ouro Preto, MG

Quantificação e identificação de *Candida* na cavidade oral de crianças

Quantification and identification of *Candida* in the oral cavity children

Ellen D. Dal Vesco¹, Bruna Ricci¹, Géssica A. Costa¹, Iliane R. D. Lamonato², Nádia M. R. Oliveira³, Sideney Becker Onofre⁴

Resumo: A identificação correta e precisa do agente causal de uma candidose é importante para a caracterização epidemiológica do tipo de infecção, como também para a escolha do tratamento. Os objetivos deste trabalho foram isolar, quantificar e identificar as leveduras do gênero *Candida*, presentes na cavidade oral de crianças de 2 a 4 anos de idade. Para a realização deste trabalho foram feitas coletas semanais em um grupo formado por dez crianças de 2 a 4 anos de idade, com o auxílio de swabs estéreis, friccionados na região periodontal. O material coletado foi inoculado em meio cromogênico, utilizando-se a técnica de esgotamento e incubado a 36°C. A quantificação e identificação seguiram a metodologia descrita por Gwendolyn. Os resultados mostraram que, em 2.256 colônias isoladas, a *C. albicans* foi a mais frequente com 70,00; 70,44 e 95,15%, seguido pela *C. tropicalis*, com 16,99; 13,85 e 4,65%, *C. glabrata* com 11,77; 4,98 e 0,20%, respectivamente para 2, 3 e 4 anos de idade. A espécie que apresentou menor frequência foi a *C. krusei* com 1,24 e 10,73%, para 2 e 3 anos. Em crianças de 4 anos, não se verificou a presença dessa espécie.

Palavras-chave: Candidoses; Fungo; *Candida sp*; *Candida albicans*

Abstract: The correct and precise identification of the causative agent of thrush is important for epidemiological characterization of the type of infection, but also for the choice of treatment. The objectives of this work was to isolate and quantify identify yeasts of the genus *Candida* in the oral cavity of children 2 to 4 years of age. For this work, samples were collected weekly in a group of ten children from 2 to 4 years old, and the samples were taken with sterile swabs, which were rubbed on the periodontal region. The collected material was inoculated on chromogenic medium, using the technique of exhaustion and incubated to 36 C. The quantification and identification followed the methodology described by Gwendolyn, (2005). The results showed that in 2256 isolated colonies, *C. albicans* was the most frequent with 70.00, 70.44 and 95.15%, followed by *C. tropicalis*, with 16.99, 13.85 and 4.65%, *C. glabrata* with 11.77, 4.98 and 0.20% respectively for 2, 3 and 4 years of age. The species that showed a lower frequency was *C. krusei* with 1.24 and 10.73% for 2 and 3 years. In children aged 4 years, there was the presence of this species.

Keywords: Candidosis; Fungus; *Candida sp*; *Candida albicans*

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* compreende um grupo de leveduras encontrado em diversos ecossistemas, inclusive na microbiota residente de humanos e animais.⁽¹⁾ No entanto, podem comportar-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que se manifestam clinicamente por lesões superficiais da pele e mucosas, ou, mesmo, sob determinadas circunstâncias, como candidoses disseminadas, muitas vezes severas ou letais.⁽²⁾ Nas últimas duas décadas, a literatura tem relatado uma ocorrência crescente de infecções por esses fungos, assim como a identificação de novas espécies patogênicas, principalmente em imunocomprometidos.⁽³⁻⁶⁾

Aproximadamente metade da população adulta saudável abriga essas espécies na cavidade bucal,⁽⁷⁾ sendo as superfícies mucosas consideradas o reservatório principal, mas elas podem ser encontradas também no biofilme dental, coagregadas a espécies bacterianas aí presentes, ou mesmo aderindo-se diretamente à película salivar.^(8,9,10) Os biofilmes contendo *C. albicans* podem ser importantes para a mani-

festação de candidoses mucosas e para o processo de colonização, tanto de cavidades de cárie como de bolsas periodontais.^(11,12)

Para diversos autores, a presença desses fungos em áreas subgingivais pode contribuir para a patogênese da doença periodontal, bem como determinar um risco aumentado de candidose sistêmica, em casos de depressão imune.^(10,13-18) Contudo, as espécies de *Candida* não têm recebido ainda o enfoque necessário à compreensão de seu papel como patógenos periodontais, embora já tenha sido reconhecida a sua capacidade de aderir ao epitélio, invadir o tecido conjuntivo gengival, produzir fatores de virulência e induzir reações inflamatórias.⁽¹⁸⁻²³⁾

Para colonizar, infectar e evadir-se das defesas do hospedeiro, *C. albicans* possui um repertório de fatores de virulência, que inclui uma variedade de enzimas, cujos principais representantes são as proteinases aspartil secretadas (Saps) e as fosfolipases. O estudo dessas enzimas como fatores de virulência é relativamente recente e está em rápida evolução. Futuramente, o estabelecimento de possíveis correlações

¹PIBIC/PIC/UNIPAR. Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Francisco Beltrão, PR

²PIBIC/UNIPAR. Acadêmica do Curso de Enfermagem da Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Francisco Beltrão, PR

³Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Francisco Beltrão, PR

⁴Biólogo, Professor Titular da Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Francisco Beltrão, PR

entre a atividade enzimática e as diferentes linhagens de *C. albicans*, assim como a compreensão mais aprofundada do papel desempenhado por essas enzimas durante os processos infecciosos, abrirá novas perspectivas de intervenções terapêuticas.^(21,24-27)

A candidose é considerada a mais frequente infecção fúngica bucal e *C. albicans* é a principal espécie relacionada, embora outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, dentre outras, também ocorram, especialmente em populações imunocomprometidas.^(28,29) A identificação de *Candida spp.* pode ser feita através da análise fenotípica dos caracteres morfológicos e fisiológicos exibidos pelas cepas. Entretanto, os cromogênicos e moleculares têm permitido um aprimoramento da identificação e caracterização desses micro-organismos,⁽³⁰⁻³⁴⁾ auxiliando a esclarecer o papel desempenhado por diferentes espécies e subespécies de *Candida* na colonização de diferentes grupos populacionais, bem como os fatores de risco associados à manifestação de infecção.^(15,35-37)

Entretanto, ainda é pequeno o conhecimento da distribuição ecológica destas leveduras em populações homogêneas saudáveis, não indicando, em que fase da vida ocorre essa colonização, pois a maioria dos estudos é feita com grupos de indivíduos imunocomprometidos.^(13,36)

Como, segundo alguns autores, a grande parte das infecções por *Candida spp.* origina-se de cepas comensais, que habitavam o meio-ambiente bucal anteriormente à infecção, a ocorrência desses fungos, mesmo como comensais, pode ter implicações médicas consideráveis.^(36,38,39)

Para colonizar as superfícies mucosas, *C. albicans* deve competir com a microbiota local pela aquisição de nutrientes, e adaptar-se às demais pressões seletivas ambientais, de modo a sobreviver em diferentes nichos ecológicos, que podem variar amplamente em relação a condições como a temperatura, disponibilidade de nutrientes, tensão de oxigênio e pH. Por exemplo, *C. albicans* pode sobreviver, através da expressão diferenciada de genes, em ambientes como a corrente sanguínea, cujo pH é neutro, assim como no canal vaginal, que possui pH ácido.⁽²⁴⁾

Os métodos disponíveis para a identificação de espécies de *Candida* são numerosos, e a escolha de um deles é determinada pelo nível de identificação requerida, aspectos clínicos, número total de amostras examinadas rotineiramente e recursos disponíveis no laboratório.⁽⁴⁰⁾ Além da identificação e caracterização, estes testes permitem avaliar o potencial de virulência, de produção de enzimas e de metabólitos. Meios cromogênicos, kits comerciais e caracterização dos fungos por análise de DNA também têm sido utilizados para identificação das diferentes espécies de cepas.⁽⁴¹⁻⁴³⁾

A maioria das leveduras cresce bem em temperaturas entre 30° e 37°C, quando cultivadas em meios de cultura artificiais. Entre as espécies do gênero *Candida*, as temperaturas de incubação que permitem crescimento satisfatório podem variar entre 20° e 38°C, sendo ideal entre 25° e 28°C.⁽⁴⁴⁾ A capacidade de crescimento em temperaturas elevadas é característica de algumas espécies, sendo uma das provas utilizadas para diferenciação entre a *Candida albicans* e *C.*

dubliniensis, as quais compartilham diversas características morfológicas e fisiológicas, o que dificulta a identificação diferencial entre estas duas espécies.^(34,45)

Devido ao relevante papel que as espécies de *Candida* desempenham na ecologia da cavidade bucal, e a importância de estudos sobre a distribuição dessas leveduras em diferentes grupos populacionais, faixas etárias, na elaboração de estratégias para a prevenção de candidoses, é que o presente estudo teve como objetivo isolar e identificar as leveduras presentes na cavidade oral de crianças entre 2 e 4 anos de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Paranaense, Campus de Francisco Beltrão. O presente estudo identificou *Candida spp.* em material coletado da cavidade oral de crianças com idade de 2 a 4 anos, que frequentam a Creche Municipal Delfo Fregonese da Cidade de Francisco Beltrão, PR. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Paranaense e os que participaram da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Coleta das amostras

As coletas foram realizadas em crianças de 2 a 4 anos de idade, seguindo os procedimentos padrões de forma que a amostra fosse representativa. Os grupos de levantamento, para cada idade, foram formados por dez crianças, sendo as coletas realizadas com o auxílio de *swab* estéril, umedecidos em água peptonada, os quais foram friccionados na mucosa da cavidade oral das crianças, dando ênfase à região peri-dental. Posteriormente, este material foi armazenado em tubos estéreis e transportado ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Paranaense – Unipar, para a quantificação e identificação.

Isolamento

O material foi semeado em placa contendo meio de cultivo cromogênico, apropriado para isolamento e identificação das leveduras do gênero *Candida*, fornecido pela Himedia do Brasil. A semeadura foi realizada através de inoculação por esgotamento do *swab* na placa de Petri contendo o meio de cultura. Posteriormente, essas placas foram incubadas a 36°C por uma semana, avaliada periodicamente após o terceiro dia. Após esse período de incubação foi realizada a contagem das colônias levando-se em consideração as características morfológicas de cada uma delas.

Identificação das cepas de *Candida*

As identificações das leveduras do gênero *Candida* foram realizadas seguindo a metodologia descrita.⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾ A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia e da pigmentação das colônias, sendo que a metodologia preconizada indica que a espécie *Candida albicans* apresenta coloração verde, a espécie

Candida tropicalis coloração azul, a *Candida krusei* com coloração rosa e a espécie de *Candida glabrata* aparece com coloração violeta.

Toda a metodologia utilizada neste trabalho foi baseada nas normas aprovadas pelo Clinical and Laboratory Standard Institute – CLSI⁽⁵⁰⁾ e pela normativa da Anvisa, Módulo VII – Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica.

Análise estatística

As análises de variância foram realizadas segundo normas da ANOVA e as diferenças significativas entre as médias determinadas pelo teste de Tukey a 1%. Todas as atividades foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas foram realizadas, em grupos de dez crianças, sendo que esses grupos foram de 2, 3 e 4 anos. Cada coleta foi realizada em triplicata com os grupos de crianças em suas respectivas idades. A cada vinte dias era realizada uma nova coleta com o mesmo grupo, repetindo-se os procedimentos até completar as três repetições propostas. Os resultados estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de colônias de *Candida* sp, identificadas na cavidade bucal de crianças de 2 a 4 anos, que frequentam na Creche Municipal Delfo Fregonese da Cidade de Francisco Beltrão - PR

Idade	Dados	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
2 anos	Total	1.579 ± 345aA*	383 ± 42bA	265 ± 36bA	28 ± 11cB
	(%)	70,00aB	16,99bA	11,77bA	1,24cB
3 anos	Total	932 ± 213aB	183 ± 45bB	66 ± 22cB	142 ± 26bA
	(%)	70,44aB	13,85bA	4,98c	10,73bA
4 anos	Total	962 ± 321aB	47 ± 21bC	2,00 ± 5cC	00
	(%)	95,15aA	4,65bB	0,20cC	00

*Médias seguidas de letras minúsculas na horizontal e maiúscula na vertical, em cada parâmetro, não diferem entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey

Após a análise dos dados presentes na Tabela 1, verificou-se que a espécie de levedura que predominou foi a *Candida albicans* em crianças de 2 anos de idade, num índice de 70% de um total de 1.579 colônias isoladas. Esse mesmo comportamento foi observado em crianças com 3 anos de idade, mostrando uma presença de 70,44% das 932 colônias isoladas e identificadas. Comportamento semelhante observou-se em crianças de 4 anos de idade, pois, das 962 colônias de candidas isoladas, 95,15% delas foram identificadas como *Candida albicans*.

Pôde-se verificar que, em crianças de 2 anos, a levedura predominante na cavidade oral foi a *Candida albicans*, com 70%, seguido de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, com 16,99, 11,77 e 1,24%, respectivamente, num número de 1.579, 383, 265 e 28 colônias isoladas.

Em crianças de 3 anos, verificou-se o mesmo comportamento, pois 70,44% das colônias foram de *Candida albicans*, seguido de 13,85% para *Candida tropicalis*, 4,98% para *Candida glabrata* e 10,73% para *Candida krusei*.

No grupo de crianças com 4 anos de idade não ocorreram diferenças significativas entre as espécies isoladas e

identificadas, em relação aos grupos de crianças com faixas etárias anteriores, pois, neste grupo, também a *C. albicans* foi a que predominou, apresentando índices de 95,15%, contra 4,65% para *C. tropicalis* e 0,20% para *C. glabrata*. Neste grupo, não foi detectada nenhuma colônia de *C. krusei*.

Na análise geral dos dados, observou-se que a maior frequência de *Candida albicans* foi em crianças da faixa etária de 2 anos de idade, seguido das crianças de 4 e 3 anos, respectivamente, com 1.579, 932 e 962 colônias isoladas. Para as espécies de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* verificou-se que foram mais frequentes em crianças de 2 anos, seguido de 3 e 4 anos, respectivamente. A espécie de *Candida krusei* desenvolveu-se em menor quantidade em relação às anteriores, porém com maior frequência em crianças de 3 anos, seguido das crianças de 2 anos de idade e ausência na faixa etária de 4 anos.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem no estudo das candidoses, sugerindo que as espécies isoladas são as responsáveis pelas infecções fúngicas presentes na cavidade bucal humana e que a *C. albicans* é a principal espécie relacionada, embora *C. tropicalis*, *C. krusei*, e *C. glabrata* também estejam se tornando comuns na população.⁽⁵¹⁾

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram, portanto, uma predominância de *C. albicans* sobre as outras espécies, concordando com os resultados, obtidos por Yucesoy e Marol,⁽⁵²⁾ em que, de 169 colônias de *Candidas* isoladas, 168 apresentaram colônias verde-claras utilizando o mesmo meio cromogênico, identificadas como *C. albicans*. Neste mesmo trabalho, de 33 colônias isoladas e identificadas por métodos tradicionais como *C. tropicalis*, 32 isolados se mostraram de cor azul, comprovando que a metodologia adotada neste trabalho coincide com os resultados de trabalhos anteriores.

A coloração rósea verificada neste estudo, nos 170 isolados de *C. krusei*, tem sido a mesma coloração encontrada por diferentes pesquisadores,^(53,54) corroborando com os dados obtidos neste trabalho. As colorações rosa e violeta, no entanto, podem ser comuns em diferentes espécies de *Candida* (*C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*), o que dificulta a interpretação do teste. Assim, foi necessário recorrer a outras características, tais como rugosidade e extensão das bordas das colônias, para orientar a identificação dessas espécies. Esta peculiaridade de rugosidade ao redor das colônias, como em *C. krusei*, foi citada por García-Martos et al.⁽⁵⁵⁾ A identificação de *C. krusei* é de grande importância, já que esta é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol.⁽⁵⁶⁾

A identificação das leveduras do gênero *Candida* em um curto espaço de tempo pode ser obtida quando se inoculam amostras biológicas nesse meio cromogênico de diferenciação.

Este meio também se mostra útil na detecção de leveduras em material biológico que contenha cultura mista de *Candidas*, cuja característica de crescimento em ágar Sabouraud dextrose não permite esta diferenciação.⁽⁵⁷⁾

A utilização do meio cromogênico mostrou neste estudo, sua capacidade de contribuir para um diagnóstico rápido da

colonização da cavidade oral de crianças de 2 a 4 anos de idade, podendo ser utilizados no diagnóstico de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, favorecendo a aplicação de uma terapia antifúngica precoce e adequada.

CONCLUSÃO

Após a realização deste trabalho, se conclui que, em 2.256 colônias isoladas, a *C. albicans* foi a mais frequente com 70%, 70,44% e 95,15%, seguido pela *C. tropicalis*, com 16,99%, 13,85% e 4,65%, *C. glabrata* com 11,77%, 4,98% e 0,20%, respectivamente para 2, 3 e 4 anos de idade.

A espécie que apresentou menor frequência foi a *C. krusei* com 1,24% e 10,73% respectivamente para 2 e 3 anos de idade, sendo que, em crianças de 4 anos, não foi possível verificar a presença dessa espécie. O grupo de crianças com 2 anos de idade foi o que apresentou maior número de colônias de *Candidas*, já as crianças de 4 anos de idade foram as que menos apresentaram esse microrganismo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Paranaense – Unipar, Unidade Campus de Francisco Beltrão, pelo apoio financeiro e a Creche Municipal Delfo Fregonese - Francisco Beltrão, PR.

REFERÊNCIAS

- Höfling JF, Rosa EA. Main techniques employed in the molecular epidemiology of *Candida* species. *Alpe Adria Microbiol J*. 1999;8 (1):5-23.
- Liu D, Coloe S, Jones SL, Baird R, Pedersen J. Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. FEMS Microbiol Lett*. 1996;145(1):23-6.
- Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: The promise of molecular typing. *Clin Infect Dis*. 1995;20(6):1535-9
- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5729-31.
- Pizzo G, Giuliana G, Milici ME, Giangreco R. Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. *New Microbiol*. 2000;23(1):63-71.
- Pizzo G, Barchiesi F, Falconi Di Francesco L, Giuliana G, Arzeni D, Milici ME, et al. Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival *Candida albicans* isolates. *Arch Oral Biol*. 2002;47(3):189-96.
- Arendorf T, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979;147(10):266-72.
- Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology*. 1995;141(Pt 1):213-9.
- Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol*. 1993;38(12):1057-63.
- Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent*. 1998;26(4):299-304.
- George KS, Falkler WA Jr Coaggregation studies of the Eubacterium species. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(5):285-90.
- Starr JR, White TC, Leroux BG, Luis HS, Bernardo M, Leitao J, et al. Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(5):304-10.
- Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C. Characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17 (1):44-9.
- Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol*. 1995;33(11): 3025-7.
- Hannula J, Dogan B, Slots J, Okte E, Asikainen S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16(2):113-8.
- Jabra-Rizk MA, Ferreira SM, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions. *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4520-2.
- Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontol Res*. 1999;34(1):25-33.
- Reynaud AH, Nygaard-Østby B, Bøygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 2001;28(9):860-4.
- de Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. *Infect Immun*. 2000;68(6):3172-9.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:78-111.
- Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001;147(Pt 8):1997-2005.
- Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis*. 2004;10(2):106-12.
- Robinson, P.G. Treatment of HIV-associated periodontal diseases. *Oral Dis*. 1997;3(Suppl 1):S238-40.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327-35.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):122-43.
- Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001;44(9-10):361-7.
- Ollert MW, Wende C, Görlich M, McMullan-Vogel CG, Borg-von Zepelin M, Vogel CW, et al. Increase expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol*. 1995;33(10):2543-9.
- Leung WK, Dassanayake RS, Yau JY, Jin LJ, Yam WC, Samaranayake LP. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *J Clin Microbiol*. 2000;38 (6):2219-26.
- Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):3835-43
- McCullough M, Ross B, Reade P. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 1995;33(3):696-700.
- McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 25(2):136-44.
- McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol*. 1999;37(2):417-21. Comment in: *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2710.
- Milan EP, de Laet Sant' Ana P, de Azevedo Melo AS, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D, et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;41(1-2):29-35.
- Sullivan DJ, Westermeng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995;141 (Pt 7):1507-21.
- Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(2):79-84.
- Kam AP, Xu J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43(1):19-28.
- Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res*. 1999;78(4):857-68.
- Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schröppel K, Srikantha T, Galask R, et al. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(6):1501-9.
- Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(2):189-93.
- Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis*. 2000;6(1):3-11.
- Ashman RB, Papadimitriou JM. What's new in the mechanism of host resistance to *Candida albicans* infection? *Pathol Res Pract*. 1990;186(4):527-34.
- Kindelan SA, Yeoman CM, Douglas CW, Franklin C, et al. A comparison of intraoral *Candida* carriage in Sjögren's syndrome patients with healthy xerostomic controls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(2):162-7.

43. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand.* 1990;48(1):27-36.
44. Odds FC. Ecology and epidemiology of *Candida* species. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1984;257(2):207-12.
45. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr Top Med Mycol.* 1997;8(1-2):15-25.
46. Gwendolyn BRW. *Microbiologia para as Ciências da Saúde.* 7a ed. Rio de Janeiro-RJ. Ed. Guanabara Koogan S.A. p 96-99. 2005.
47. Kreger-Van RIJ. *The Yeasts: a taxonomic study.* 3rd ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers. p.585-844. 1984.
48. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação - fungos, actinomicetos, algas - de interesse médico. Sarvier- Fapesp. São Paulo, Capítulo 2, p. 86-139. 1998.
49. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz.* São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.
50. CLSI/NCCLS. Clinical and Laboratory Standard Institute - National Committee For Clinical Laboratory Standards - Approved standard M2-A7: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Seventh edition. Wayne, PA. 2003.
51. Menezes EA, Cavalcante MS, Farias RB, Texeira AB, Pinheiro FG, Bezerra BP, et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans*, isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. *J Bras Patol Med Lab.* 2005;41(1):9-13.
52. Yucesoy M, Marol S. Performance of CHROMagar *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2003;2:8.
53. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(7):3622-7.
54. Merlino J, Tambosis E, Veal D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):1157-9.
55. García-Martos P, García-Agudo R, Hernández-Molina JM, Marín P, Tallero E, Mira J. Identificación de leveduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15(3):131-5. [Spanish].
56. Bouchara JP, Declerck P, Cimon B, Planchenault C, de Gentile L, Chabasse D. Routine use of CHROMagar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. *Clin Microbiol Infect.* 1996;2(3):202-8.
57. Fotedar R, al-Hedaithy SS. Identification of chlamydospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar *Candida* medium. *Mycoses.* 2003;46(3-4):96-103.

Autor correspondente
Sidney Becker Onofre
Universidade Paranaense – UNIPAR
Campus de Francisco Beltrão
Av. Julio Assis Cavalheiro, 2000
Bairro Industrial
85601-060 – Francisco Beltrão, PR
Telefone: (46) 3523-7015 e (46) 9973-9131
E-mail: sidney@unipar.br

Rastreabilidade das causas de não conformidades em meios de cultura

Traceability of the causes of non-compliance in culture media

Elizabeth El Hajjar Droppa¹, Thali Leal Sampaio², Marcelo Pilonetto³, Rosiane Nickel⁴

Resumo: O processo de produção de meios de cultura deve garantir a liberação do produto dentro das especificações requeridas em normas e legislações. Quando o produto apresentar resultado não conforme com as especificações, deve-se buscar a causa raiz do problema e implantar ações corretivas. A rastreabilidade das causas de não conformidades deve ser uma etapa de decisão rápida. Objetivando elaborar ferramentas da qualidade voltadas a esta rastreabilidade e verificar a sua aplicabilidade em estudos de casos, foram analisados manuais e registros de produção e controle dos produtos. Foi aplicada a metodologia de *Brainstorming*, a produção e o controle foram mapeados e com o Diagrama de Causa e Efeito foi possível estabelecer os pontos críticos. As ferramentas da qualidade propostas foram Fluxogramas e Folhas de Verificação de Processos, cuja aplicabilidade foi avaliada em lotes de meios de cultura não conformes. Os resultados mostraram que as ferramentas foram capazes de indicar, localizar e confirmar as não conformidades e as suas origens. Porém, para a investigação aprofundada da causa torna-se necessário, além destas ferramentas, o conhecimento técnico em microbiologia, a pesquisa em literaturas e *Brainstorming* permanente, possibilitando tomada de decisão confiável em desvios da qualidade dos meios de cultura.

Palavras-chave: Meios de cultura; Controle de qualidade; Rastreabilidade.

Abstract: The process of production of culture media should ensure the release of the product within the specifications required by rules and laws. When the product does not produce results consistent with the specifications, you should seek the root cause of the problem and implement corrective actions. The traceability of the causes of non-conformities should be a stage of rapid decision. Aiming at producing quality tools focussed on traceability and verifying its applicability in case studies, manuals and records were analyzed for the production and control of products. The methodology of *Brainstorming* was used, the production and control have been mapped and, with the Diagram of Cause and Effect, it was possible to establish the critical points. The quality tools proposed were flow charts and Verification Process sheets, whose applicability was evaluated in batches of non-compliant culture media. The results showed that the tools were able to indicate, locate and confirm the non-conformities and their origins. However, for a detailed case investigation, besides these tools, technical knowledge in microbiology, research in different literature and permanent *Brainstorming*, are necessary thus enabling reliable decision making related to gaps in the quality of culture media.

Keywords: Culture media; Quality control; Traceability

INTRODUÇÃO

Os meios de cultura podem ser adquiridos prontos para uso, oriundos de fabricantes de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* ou o laboratório pode optar em produzi-los utilizando meios desidratados ou formulando as preparações. Nos dois casos, a produção de meios de cultura deve respeitar a Portaria N° 686/98 do Ministério da Saúde,⁽¹⁾ que diz respeito às Boas Práticas de Fabricação e Controle para Produtos Diagnósticos de Uso "In Vitro".

A produção de meios de cultura envolve várias etapas, tais como, escolha das matérias primas, qualidade da água reagente, boas condições dos equipamentos, qualificação dos técnicos, registros das etapas do preparo, além do controle de qualidade do produto acabado, que é de extrema importância, pois só a partir dele o lote produzido poderá ser liberado para uso. Mesmo todos os procedimentos da produção sendo cumpridos dentro das especificações, sem o controle de qualidade do produto final, não há como assegurar que efetivamente o meio de cultura esteja adequado ao uso.

Local de realização da pesquisa: Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR). Seção de Meios de Cultura e Reativos, São José dos Pinhais, PR, Brasil

¹Farmacêutica e Bioquímica. Especialista em Saúde Pública. Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR), Seção de Meios de Cultura e Reativos, São José dos Pinhais, PR, Brasil

²Médica Veterinária. Especialista em Microbiologia (PUCPR). Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR), Seção de Meios de Cultura e Reativos, São José dos Pinhais, PR, Brasil

³Farmacêutico e Bioquímico. Mestre em Ciências Farmacêuticas (UFPR). Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Departamento de Microbiologia Clínica, Curitiba, PR, BR. Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR), Diretor Geral. Curitiba/São José dos Pinhais, PR, Brasil

⁴Farmacêutica Industrial. Mestre em Tecnologia em Saúde (PUCPR). Especialista em Saúde Pública Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR), Seção de Medicamentos. Curitiba, PR, Brasil

Desta forma, cada lote de meio preparado deve ser submetido a um programa mínimo de testes que assegure sua aceitabilidade e demonstre desempenho bacteriano típico.⁽²⁾ O controle de qualidade específico do produto preparado envolve avaliação de aspecto, de pH, de esterilidade e de desempenho. Porém, o processo deve estar garantido desde a qualidade da matéria-prima até à rastreabilidade de causas de não conformidades nos procedimentos de produção, bem como na própria metodologia do controle de qualidade, estabelecendo ações corretivas e preventivas. Quando o produto analisado apresentar um resultado não conforme com as especificações esperadas, deve-se buscar a causa raiz do problema e implantar ações corretivas.⁽³⁾ Os procedimentos de busca deverão ser realizados em toda a cadeia de produção, tentando localizar em qual processo surgiu a não conformidade, para poder interferir pró-ativamente com o intuito de solucionar o problema.

O Controle de Qualidade é o conjunto de medidas elaboradas para assegurar e verificar, a qualquer momento, que os lotes de produção atendem a uma qualidade pré-estabelecida.⁽¹⁾ Sua função não deve estar limitada somente às operações de laboratório, mas a todas as atividades e decisões que possam afetar a qualidade do produto, sendo a melhor maneira de garantir os resultados, monitorar e evidenciar falhas durante o processo de produção.

A importância de se conhecer, controlar e melhorar os processos pode ser atribuída a uma visão moderna de gerenciamento, em que a estrutura da empresa deve ser adaptada aos processos de forma a melhor atendê-los. Um processo é cliente do processo anterior e fornecedor do posterior. Os problemas existentes na execução dos subprocessos podem estar relacionados com falhas na definição dos processos, defeitos nos produtos ou serviços, desperdícios e outras ocorrências que caracterizam a não qualidade.⁽⁴⁾

A rastreabilidade das causas das não conformidades faz parte do conjunto de ações de um controle de qualidade, devendo ser uma etapa de decisão rápida. Porém, muitas vezes, não se visualiza de imediato o ponto de partida para as medidas corretivas, pois a causa raiz do desvio da qualidade pode estar relacionada a um ou mais subprocessos. Faz-se importante, neste momento, a existência de uma ferramenta estratégica na forma de roteiro, para estabelecer prioridades, definir direções, facilitar a investigação das causas dos desvios da qualidade e entendimento dos processos.⁽⁵⁾

Portanto, mediante as exigências legais das Boas Práticas de Fabricação e Controle para Produtos Diagnósticos de Uso "In Vitro", da Norma NBR ISO/IEC 17025:2005⁽³⁾ e da necessidade da rápida identificação da causa de uma não conformidade no produto acabado, tornou-se evidente a importância da elaboração de um roteiro indicativo para a direção a ser tomada na análise de problemas e nas decisões.

Este trabalho teve como objetivo elaborar ferramentas da qualidade voltadas à rastreabilidade de causas de não conformidades nos produtos rejeitados pelo Controle de

Qualidade e verificar a sua aplicabilidade em estudos de casos de produtos não conformes.

Este trabalho foi desenvolvido em um Laboratório de Saúde Pública, no setor de produção de meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODO

Para o desenvolvimento desta pesquisa a fim de se elaborarem as ferramentas da qualidade, foram analisados os manuais de bancada, manuais dos fabricantes de meios de cultura desidratados e fórmulas mestras utilizadas para o preparo dos produtos. A partir desta análise, os processos de produção e de controle de qualidade foram detalhados e tiveram os seus fluxos mapeados, sendo, na sequência, feito o levantamento de critérios de produtos conformes e não conformes.

A seguir os funcionários envolvidos na produção dos meios de cultura foram observados durante os procedimentos de rotina e as suas atividades conferidas, particularmente pelo mapeamento da produção anteriormente estabelecido, sobretudo a fim de verificar algum passo não relatado nos manuais de bancada. Simultaneamente a esta observação os funcionários foram estimulados a relatar suas experiências e conhecimento na área por meio da metodologia de *Brainstorming*. Desta maneira, a partir do levantamento de prováveis causas de não conformidades no produto acabado foi possível estabelecer pontos críticos no processo de produção e controle, visualizando-os com o auxílio da ferramenta Diagrama de Causa e Efeito, sendo eles: mão de obra, maquinário, método, materiais e meio ambiente.

Na etapa seguinte, foram elaboradas as ferramentas da qualidade voltadas à rastreabilidade de causas de não conformidades nos meios de cultura. Foram desenvolvidos Fluxogramas e Folhas de Verificação de Processos.

A fim de avaliar a aplicabilidade das ferramentas propostas, foi feito o levantamento dos lotes não conformes evidenciados pelo Controle de Qualidade no ano de 2008. Para isto foram utilizadas as Planilhas de Registros: dos Dados da Produção; de Uso dos Equipamentos e do Controle de Qualidade.

Para o ano estudado foram produzidos 1229 lotes sendo 21 lotes não conformes que corresponderam a 1,7% da produção do ano. Entre os 21 lotes não conformes analisados, 14,3% (n=3) foram devidos a desempenho, 28,6% (n=6) quanto à esterilidade e 57,1% (n=12) quanto ao aspecto, mostrados no Quadro 1. Não houve ocorrência de não conformidade para a avaliação de pH no ano estudado.⁽³⁾

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Ferramentas da Qualidade Desenvolvidas

Com a análise dos manuais dos fabricantes de meios de cultura desidratados, dos manuais de bancada e das fórmulas mestras utilizadas para o preparo dos diversos meios, as similaridades ou não nos processos de produção foram estabelecidas. Assim, o processo de produção foi

Quadro 1 - Distribuição das não conformidades e lotes selecionados para a aplicação das ferramentas da qualidade desenvolvidas

Não conformidades	Lotes não conformes		Lotes selecionados
	n	%	
Desempenho	3	14,3	Solução de Arabinose a 20% Ágar CTBA Caldo Acetamida Ágar Leite
Esterilidade	6	28,6	Caldo Selenito Cistina (caso 1) Caldo Selenito Cistina (caso 2)
pH	0	0	-
Aspecto	12	57,1	
Cor	3	14,3	Sulfato Ferroso Amoniacal a 1%
Consistência	7	33,4	Meio de Middlebrook com OADC
Profundidade de Envase	1	4,7	Ágar SS
Presença de Sedimentos	1	4,7	Caldo Selenito Cistina (caso 2)
TOTAL	21	100	9 Lotes Selecionados

Fonte: Laboratório de Saúde Pública/Setor de Produção de Meios de Cultura - 2008

dividido em duas metodologias principais de preparo de meios designadas como Envase Asséptico e Envase Séptico.

Para Envase Asséptico foi estabelecido o procedimento de pesar, hidratar, homogeneizar, verificar o pH a frio (pH inicial), esterilizar e distribuir em Cabine de Segurança Biológica o produto estéril na embalagem final também estéril. Neste processo asséptico, quando da necessidade de adição de suplementos, a base resfriada em torno de 55°C era suplementada, sendo em seguida distribuída. Para Envase Séptico foi estabelecido o procedimento de pesar, hidratar, homogeneizar, verificar o pH a frio (pH inicial), dissolver completamente o produto com auxílio de Banho Maria ou Vapor Fluente, conforme a metodologia do produto, distribuí-lo na embalagem final e esterilizar.

Durante a etapa de mapeamento do processo de produção de meios de cultura observou-se que o surgimento de não conformidade no produto gerava as seguintes ações: reter o lote, comunicar ao solicitante esta ocorrência e produzir novo lote. A causa, na maioria das vezes, ficava no campo da suposição, até porque a rotina de produção apresentava-se acelerada e em grande quantidade. A razão da ocorrência do produto não conforme ficava delegado ao segundo plano. Grande volume de solicitações e falta de tempo mostraram-se os maiores motivos da não rastreabilidade da causa de não conformidades.

Com o processo de produção mapeado, passou-se ao estabelecimento dos critérios de produto acabado conforme e não conforme, pois a partir da evidência de algum destes critérios não atingido satisfatoriamente é que foram aplicadas as ferramentas da qualidade desenvolvidas.

Os critérios para produto conforme, em relação ao aspecto no produto acabado e do pH final foram definidos baseados nas descrições citadas nos manuais dos fabricantes de meios de cultura desidratados ou nas metodologias

dos manuais de bancada do setor em estudo. Para aspecto foram avaliados: cor, consistência, profundidade atingida após o envase, ausência de artefatos, de sedimentos, de turbidez, de hemólise, de bolhas e de água de condensação.⁽⁶⁾ O critério para produto conforme, em relação à esterilidade no produto final, foi definido como o não crescimento microbiológico após a incubação em estufa.⁽²⁾ Quanto ao desempenho do produto final, foi definido que está conforme quando frente a cepas padrões conhecidas de procedência confiável ou da bacterioteca/fungiteca do próprio laboratório, for demonstrado desempenho microbiano típico, respectivo a cada meio de cultura.⁽⁷⁾ O não cumprimento de um ou mais critérios descritos foi caracterizado como produto não conforme.

No desenvolvimento do estudo, detalhou-se cada uma das etapas dos processos de produção e controle e procurou-se sensibilizar e motivar os técnicos do setor a participarem da pesquisa, uma vez que são a fonte primária de informações.

Envolver e sensibilizar a equipe de técnicos da seção mostrou-se um desafio, pois seria necessário aproveitar o conhecimento tácito dos funcionários, transformando esta fonte em conhecimento explícito que poderia fornecer informações importantes para a orientação das decisões que precisariam ser tomadas. Baseando-se no preconizado de que uma das melhores ferramentas da qualidade são a experiência das pessoas, a criação das ideias e os conhecimentos em discussão,⁽⁴⁾ os funcionários foram questionados sobre as etapas do que produziam e por que faziam certos procedimentos. Para capturar o conhecimento tácito foi solicitado que relacionassem, a partir de suas experiências profissionais, todas as possibilidades de eventos que poderiam resultar em um produto acabado não conforme, nas várias etapas de produção, bem como no Controle de Qualidade.

Verificou-se que as não conformidades poderiam ser provocadas pela ação do manipulador, pelos diversos equipamentos envolvidos na produção e no controle de qualidade, pelas técnicas específicas do preparo de cada meio de cultura mal interpretadas ou mal elaboradas, bem como pelas técnicas específicas do controle de qualidade, pelos meios de cultura em pó, água, insumos, sais, soluções, cepas de micro-organismos e vidrarias utilizados na produção e no controle de qualidade, pela ação do ambiente de trabalho, como temperatura, umidade, incidência de luz solar, ar ou superfícies contaminadas, reações cruzadas por impurezas, correntes de ar e quedas de energia.

Com a visualização dos fluxos similares dos processos de fabricação dos produtos, nos quais foram mapeados os passos da produção, e tendo como diretrizes as duas metodologias de preparo – Envase Séptico e Envase Asséptico – a partir das variáveis avaliadas pelo Controle de Qualidade criaram-se quatro Fluxogramas e suas respectivas Folhas de Verificação de Processos, que são: Controle de Aspecto (Anexos 1 e 5), de Esterilidade (Anexos 2 e 6), de Desempenho (Anexos 3 e 7) e de pH (Anexos 4 e 8). Estes Fluxogramas e os Anexos encontram-se no final deste artigo.

As Folhas de Verificação de Processos no formato de formulários foram respondidas com as alternativas Sim, Não e Não se Aplica, sempre que se evidenciou um meio de cultura não conforme. A alternativa Não se Aplica foi utilizada quando o item questionado não era específico da metodologia ou a seção não efetuava o procedimento. A cada formulário respondido, no final, preencheu-se um Relatório de Rastreabilidade (Anexo 9), comum a todas as Folhas de Verificação, com a conclusão das respostas obtidas.

Estas ferramentas da qualidade foram aplicadas na rotina da produção e/ou no controle de qualidade. Os questionários das Folhas de Verificação foram respondidos pelos funcionários e as respostas comprovadas através das Planilhas de Registro de Dados da Produção, de Registro de Uso dos Equipamentos e de Registro do Controle de Qualidade e pela observação *in loco* dos procedimentos. Foram observados e conferidos todos os subprocessos envolvidos no produto não conforme.

As ferramentas propostas eram complementares. Para cada verificação a que o lote produzido foi submetido, o Fluxograma correspondente foi aplicado, sendo que duas tomadas de decisão foram encontradas. Para o Preparo Conforme, o lote produzido seria liberado, e para o Preparo Não Conforme os Fluxogramas orientavam se o lote seria desprezado na totalidade e feito um novo lote ou se havia alternativa de aproveitamento de parte do mesmo. Simultaneamente, orientava a utilizar a Folha de Verificação de Processos para rastrear as causas de não conformidades. Desta maneira, a área de produção não paralisava seus procedimentos enquanto a área de controle de qualidade verificava todos os subprocessos envolvidos naquele preparo não conforme.

2. Aplicação das ferramentas desenvolvidas em estudos de casos de produtos não conformes

As ferramentas desenvolvidas, Fluxogramas e Folhas de Verificação de Processos, foram aplicadas nos registros referentes aos 21 lotes não conformes evidenciados pelo controle de qualidade. Devido às similaridades das ocorrências das não conformidades foram selecionados 3 lotes por processos para a demonstração da aplicabilidade das ferramentas, conforme ilustrado no Quadro 1.

3. Produtos Não Conformes devido ao Desempenho

Em um dos casos analisados quanto à verificação de desempenho, ao se aplicarem as ferramentas verificou-se que nenhum dado analisado pôde ser concluído porque o produto não apresentou o resultado esperado. O fato ocorreu quando houve a solicitação para uma Solução de Arabinose a 20% a ser utilizada na pesquisa de *Aeromonas* sp. Como foi proposto que, para todas as respostas obtidas, os subprocessos seriam conferidos, observou-se que, na solicitação e na fórmula mestra de preparo deste produto, somente mencionavam Arabinose sem especificar a atividade ótica deste carboidrato.⁽⁶⁾ Logo, este dado chamou a atenção como o único fato conflitante nos procedimentos. Como no estoque de produtos da seção havia disponível L-Arabinose e D-Arabinose, foi proposto preparar soluções com os dois

produtos em concentrações de 20% e de 40%. Verificou-se que as concentrações neste caso não alteraram os resultados, mas somente a L-Arabinose para a pesquisa de *Aeromonas* sp. mostrou resultado satisfatório. Observando-se os dados do produto na Planilha de Registro de Dados da Produção, verificou-se que foi utilizado D-Arabinose e que este produto foi retirado do armário aleatoriamente para o preparo.

Neste caso, pôde-se observar que a aplicação das Folhas de Verificação elucidou uma ocorrência não conforme e que foi decisiva para demonstrar o quanto o conhecimento científico é importante na busca de causas de não conformidades. Verificou-se também que solicitações e fórmulas mestras mal elaboradas e não minuciosas podem incorrer em erros dificilmente detectáveis.

Nos outros dois casos referentes ao desempenho, verificou-se a ausência de componentes das fórmulas mestras. As solicitações eram para preparo de Ágar CTBA (Cistine Tryptose Blood Agar) e Caldo Acetamida. Nestes dois casos houve a coincidência de serem produtos totalmente formulados no laboratório, um deles devendo ser suplementado depois da esterilização. Como os dados dos produtos utilizados na preparação do meio de cultura foram registrados na Planilha de Dados da Produção, ao se fazer a verificação frente à pergunta “De acordo com a fórmula mestra” e verificando-se os componentes da fórmula no manual de bancada e os que foram registrados no momento do preparo, evidenciou-se a não utilização de um ou outro ingrediente das fórmulas. Para o Caldo Acetamida não havia o registro do acréscimo da Acetamida, e para o Ágar CTBA, os suplementos Telurito de Potássio a 1% e L-Cistina a 1% não foram registrados e, portanto, não foram adicionados ao meio.

Para os casos de avaliação de desempenho não conforme todos os produtos tiveram os lotes cancelados, retidos e eliminados. Novos lotes foram produzidos. O Fluxograma para esta avaliação demonstrou, para a equipe de funcionários, as tomadas de decisões rapidamente, e a Folha de Verificação de Processos - Avaliação de Desempenho evidenciou as não conformidades.

A rastreabilidade de causas de não conformidades visa melhorar os processos para que os desvios da qualidade não se repitam. Uma não conformidade referente a desempenho resulta na eliminação de um lote todo e isto gera um custo considerável, sendo que se perde matéria-prima, energia, hora de mão de obra e a confiança dos usuários, pois ao se eliminar um lote de produção haverá desperdício de tempo e prazos não cumpridos.

A atuação de técnicos e profissionais capacitados e com conhecimento profundo em microbiologia baliza a decisão de se cancelar um lote produzido devido à falha no desempenho. Somente um microbiologista poderá garantir que as cepas utilizadas no controle de desempenho estão dentro das especificações, com pureza e desenvolvimento adequados e que o dano no produto é oriundo da área de produção e/ou da área de controle de qualidade. Uma equipe técnica atuando na avaliação de desempenho necessita, portanto, do papel do microbiologista para garantir, com o conhecimento técnico, a tomada de decisão.

4. Produtos Não Conformes devido à Esterilidade

A avaliação de esterilidade, em um dos casos, evidenciou a contaminação do produto Ágar Leite devido à não esterilidade das placas de vidro utilizadas para o envase. Este produto é envasado em placas de maneira asséptica. A avaliação demonstrou crescimento *pour plate*, e quando ocorrer este tipo de desenvolvimento microbiológico é porque as placas estão contaminadas. Aplicando-se a Folha de Verificação correspondente constatou-se que, para este envase, as placas supostamente estéreis estavam estocadas e que o registro do Controle do Indicador Biológico quando da esterilização deste material indicava não conformidade no procedimento de autoclavagem.

Este mesmo fato ocorreu em outro lote analisado. A solicitação foi de Caldo Selenito Cistina (caso 1), que também teve envase de maneira asséptica. O produto, após a avaliação de esterilidade, mostrou-se não conforme, sendo que a turvação no caldo foi confirmada como contaminação após semeadura em Ágar Sangue.

Com a aplicação das ferramentas localizou-se a não conformidade no procedimento de esterilização dos tubos de vidro para envase. Aparentemente, a causa estaria elucidada, como falta de insumos no caso de desempenho e vidraria de envase não estéril no caso de esterilidade. A aplicação das ferramentas propostas permitiu a detecção e/ou confirmação das não conformidades e em qual subprocesso foram originadas. A causa, porém, seria verificar por que não se adicionaram os insumos ou por que se utilizaram vidrarias sem verificação dos controles de esterilidade.

Para o Caldo Selenito Cistina (caso 2), observou-se que o problema era persistente e que, em outros lotes, o Controle do Indicador Biológico para o processo de esterilização estava conforme. Passou-se então, a monitorar a metodologia de preparo bem como a manipulação do produto *in loco*. Com a aplicação de todos os Fluxogramas e Folhas de Verificação, para tentar cobrir todas as hipóteses do surgimento da não conformidade, que, no caso, era sedimentação após a incubação em estufa, verificou-se que a falha no procedimento era o sobreaquecimento do produto. Na realidade, a sedimentação era resultado da oxidação dos componentes do produto com posterior precipitação e turvação do meio e não contaminação.

O Caldo Selenito Cistina não deve ser esterilizado por autoclavagem, como orienta o fabricante. O rótulo do produto referia-se a vapor fluente e, assim, o produto era processado. Porém a metodologia empregada era com a elevação da temperatura da autoclave a 110°C, com válvula fechada e ao atingir esta graduação, abria-se a válvula e deixava-se o vapor fluir livremente por ela.

Segundo Bier,⁽⁹⁾ vapor fluente é a esterilização por calor úmido a 100°C, sem pressão. Foi feito contato com a assessoria científica do fabricante que definiu para este produto, após envase asséptico em tubos, a exposição em água fervente por 20 minutos, portanto, água a 100°C. Após conferência da discrepância de informações entre o rótulo do produto e a orientação da assessoria científica do fabricante, pôde-se evidenciar rotulagem errada do produto. De fato, os

dados eram do Caldo Selenito Cistina, porém as informações referentes ao preparo eram de outro produto. Com a aplicação das ferramentas pôde-se, neste caso, além de rastrear a causa da não conformidade, modificar-se a metodologia de preparo, melhorar o processo e estabelecer critérios para uso das informações contidas em rótulos de produtos, fazendo sempre a conferência das informações com os manuais dos fabricantes, e, se necessário, com a assessoria científica das empresas.

Em casos como este, em que não se evidenciou a causa da obtenção de um produto não conforme, se fez necessário utilizar todas as Folhas de Verificação que, aliadas ao conhecimento técnico e científico, demonstraram que fontes de informações externas à área de produção podem ser verificadas na rastreabilidade de causas de não conformidades. Desta maneira, foi possível melhorar os processos e resultar na diminuição dos gastos por perdas de lotes, que poderiam ser descartados como falsos positivos em relação à contaminação. O setor de controle de qualidade pôde estabelecer seus critérios de eliminação de lotes relacionados à avaliação de esterilidade tendo em mãos as ferramentas para descartar falsos resultados decorrentes de outros motivos na cadeia produtiva.

5. Produtos Não Conformes devido ao Aspecto

O Fluxograma para o Processo de Avaliação de Aspecto levou em consideração a necessidade de se ter flexibilidade ao se tomarem decisões sobre o destino do lote produzido não conforme. Nesta ferramenta ficou evidente a iniciativa de se avaliar para quais aspectos o lote não conforme deveria ser desprezado na totalidade e para quais aspectos o lote poderia ser julgado ponderadamente, desprezando parte do lote no qual a não conformidade se apresentou ou até mesmo contornando-a. As decisões a serem tomadas de acordo com a variável avaliada relacionada ao tipo de produto estão mostradas nesta ferramenta. Mesmo com a salvaguarda de parte do lote, a causa raiz do evento deveria ser investigada com a aplicação da Folha de Verificação para este processo.

Em relação à avaliação de aspecto, este foi o processo que apresentou um maior número de lotes não conformes (57,1% dos casos analisados) e pôde-se constatar que foi onde se evidenciou, fortemente, o fator humano como interferente.

Com a aplicação das ferramentas foi possível rastrear em qual parte do processo houve a deficiência. A não conformidade foi facilmente rastreada e confirmada, porém a causa desta seria estimada, uma vez que as falhas aconteceram por ação do manipulador. Verificar que as falhas nos produtos, nestes casos, estavam relacionadas diretamente à ação dos técnicos foi simples. Definir porque o técnico falhou é uma investigação mais delicada e que envolve tempo e intimidade com a equipe e com a instituição.

Ao rastrear causas de não conformidades, deve-se ter o cuidado de não se fazer apenas uma investigação superficial, somente com ações de correção, sem levar em conta a possibilidade da repetição do evento. Quando forem detectados

problemas com manipulação se estará delineando o caminho de que a causa raiz da não conformidade é mais estrutural e organizacional do que simplesmente uma variável do processo da produção em si.

Em um dos casos analisados, por exemplo, a solicitação de Solução de Sulfato Ferroso Amoniacal a 1%, que apresentou cor alterada com a aplicação das ferramentas, chegou-se à constatação de que o produto deveria ser protegido da luz imediatamente após o preparo. Esta foi a não conformidade detectada. Mas se esta informação estava constando na fórmula mestra do preparo, por que não foi executada? A causa raiz, neste caso, é descobrir por que o funcionário não fez a leitura do modo de preparo antes dos procedimentos. Seria necessário investigar se foi por falta de tempo, excesso de solicitações, falta de capacitação e/ou entendimento do modo de preparo e, até mesmo, superestimativa dos conhecimentos e aplicar-se-iam ações corretivas efetivas, para certamente não haver recorrência da não leitura dos procedimentos e, conseqüentemente, a obtenção de produtos conformes.

À primeira vista, pareceu que a causa raiz deste produto com alteração de cor estava no fato da não proteção à luz e da não leitura deste procedimento. Mesmo orientando o funcionário que seria necessário a leitura prévia das fórmulas mestras e que o produto precisaria de proteção à luz, não se estaria impedindo a recorrência do fato.

Em outro caso, a solicitação de Meio de Middlebrook com OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex) teve alteração no aspecto de consistência. Com a aplicação das ferramentas pôde-se verificar erro na pesagem, e este fato não estava vinculado aos equipamentos e sim ao cálculo errado de proporção para o produto. De novo, à primeira vista, poder-se-ia estabelecer como a causa raiz da consistência inadequada, o cálculo errado e, conseqüentemente, a pesagem. Esta é uma conclusão superficial e, mesmo explicando-se como calcular, não se estaria impedindo a recorrência do fato. A causa raiz seria descobrir e atuar com ações corretivas no motivo do funcionário errar. Se o manipulador está em uma área de produção certamente deveria estar familiarizado com os cálculos e não erraria. Por que errou? Por que não fez as conferências de seus cálculos? Houve supervisão? Por que não houve? Atuando-se nestas variáveis, a possibilidade da repetição de um produto inadequado seria remota.

Em outro caso, a solicitação de Ágar SS (*Salmonella-Shigella*) resultou em profundidade inadequada. Com a aplicação da ferramenta verificou-se que o rendimento de placas foi superior ao volume produzido e, portanto, o envase foi com um volume menor do que o necessário. Frente às perguntas da Folha de Verificação de Processos, Unidade de envase padronizada e Envase asséptico manual com estimativa visual de volume verificou-se que as placas não eram padronizadas e a distribuição era visual. Facilmente se estabeleceria, como causa raiz da profundidade inadequada, estes dois fatos. Mas a causa raiz para este caso é investigar por que o procedimento de envase foi de maneira tão subjetiva. Por que faltou equipamento para envase? E, se não faltou, por que não foi utilizado? Investigando-se

profundamente e aplicando-se ações corretivas a não conformidade estaria sujeita a não se repetir. Porém, a resolução não caberia à área fabril, nem ao funcionário, nem ao controle de qualidade e sim à estrutura da empresa.

Como a proposta das ferramentas desenvolvidas foi rastrear a causa e não simplesmente a não conformidade estabeleceu-se que a sua utilização depende de uma visão investigativa e madura. E que, conforme o caso, rapidamente se detectou a causa, principalmente quando esteve envolvido somente um subprocesso. Para a avaliação de desempenho, além de ficar demonstrada que a ferramenta Fluxograma orientou facilmente a decisão a ser tomada pela área de produção em relação aos lotes não conformes, onde estes foram desprezados na totalidade e outros foram produzidos, demonstrou que a rastreabilidade das causas de não conformidades foi menos complicada. Porém, para a avaliação de esterilidade e de aspecto, a busca da causa raiz foi mais complicada, uma vez que a contaminação do lote se distribuiu de maneira aleatória, e levando-se em conta que o Fluxograma induziu a alternativa para não se desprezar por inteiro um lote com aspecto não conforme, que a maioria das variáveis foi de observação subjetiva e que demonstrou envolver a manipulação como fator preponderante, muitas vezes ficou-se, apenas no âmbito dos porquês. Rastrear a causa de não conformidade implica na tomada de decisão após a investigação da causa raiz. E nem sempre a conclusão a que se chegou foi agradável para a área produtiva e para a empresa. Desprezar lotes produzidos requer critério, conhecimento e estudo permanente, e aplicar ações corretivas sobre uma não conformidade requer certeza do caminho encontrado, que se chegou à causa raiz do problema e que ele não se repetirá. Requer movimentos de ações em várias direções com envolvimento da área de produção bem como da área diretiva e administrativa da instituição. Deve-se ter cuidado para não se aplicarem apenas ações de correção, pois sendo ações para eliminar não conformidades encontradas, não envolvendo o estudo das causas, implicará apenas na solução imediata do problema encontrado.

6. Produtos não conformes devido ao pH (potencial hidrogeniônico)

Em relação à avaliação de pH, neste estudo, não houve registro de não conformidade a ser analisado, mas deve-se levar em conta que produtos desidratados são produzidos para manter o pH após o preparo e que devem ser verificados segundo os manuais de fabricantes de meios de cultura desidratados. Rastrear as causas de não conformidade em relação à medição de pH envolve vários subprocessos, tais como: fatores inerentes ao próprio parâmetro analisado, erros decorrentes da inobservância dos procedimentos de manutenção do instrumento, sensibilidade teórica, efeitos de temperatura, contaminação da amostra ou solução tampão, limitação do instrumento e falhas do operador.⁽¹⁰⁾ O pH do meio de cultura é crítico para as reações bioquímicas dos micro-organismos e seu desenvolvimento, e por envolver variáveis múltiplas é fator complicador para a rastreabilidade da causa de um pH fora do especificado.

CONCLUSÃO

Com a aplicação das ferramentas da qualidade desenvolvidas conclui-se que rastrear as causas de não conformidades em meios de cultura acabados permeou por toda a cadeia produtiva e de controle e pôde-se verificar que são processos ricos em subprocessos a serem analisados e com nuances difíceis de serem percebidas. Não conformidades supostamente sendo detectadas requerem maturidade para a confirmação que a sua causa raiz foi localizada e que deverá ser aplicada sobre ela ações corretivas.

Concluiu-se que as ferramentas foram capazes de indicar, localizar e confirmar as não conformidades e as suas origens. Porém, para a investigação aprofundada da causa destes achados tornou-se necessário, além destas ferramentas, o conhecimento técnico, a pesquisa em referências disponíveis e *brainstorming* permanente.

Estas ferramentas, além de serem utilizadas para definir onde aplicar ações corretivas, poderão ser úteis como ferramentas de gerenciamento de riscos, aplicando-se ações preventivas. A estas ferramentas também caberia demonstrar quais decisões seriam adotadas em relação ao lote produzido não conforme, visando à solução imediata do problema, isto é, descartando o lote e produzindo um novo ou aproveitando-o. Definir-se-ia, desta maneira, a ação imediata de correção a ser tomada pela área fabril e a ação corretiva duradoura a ser tomada pelo controle de qualidade na resolução da causa da não conformidade.

A elucidação da causa raiz de não conformidades em um produto não terá relevância se sobre ela não forem aplicadas ações corretivas e verificada a eficácia, através de indicadores,⁽¹¹⁾ que demonstrará a eliminação da não conformidade e de sua não repetição.

AGRADECIMENTOS

Aos Diretores do Laboratório, Marcelo Pilonetto, Célia Fagundes da Cruz e Maria Emilia Aracema, a oportunidade e apoio de podermos desenvolver a pesquisa na Instituição.

À nossa orientadora, Rosiane Nickel por sua dedicação, bom senso e equilíbrio na condução dos trabalhos.

À equipe de funcionários do setor de produção de meios de cultura, pela cooperação e prontidão em nos auxiliar.

À Maria Fernanda Incote Montanha Teixeira e Daniel Hajjar Sagboni Montanha Teixeira, pela paciência e colaboração na formatação dos anexos.

À Deborah Bernett, pelo carinho, sabedoria e confiança a nós oferecido.

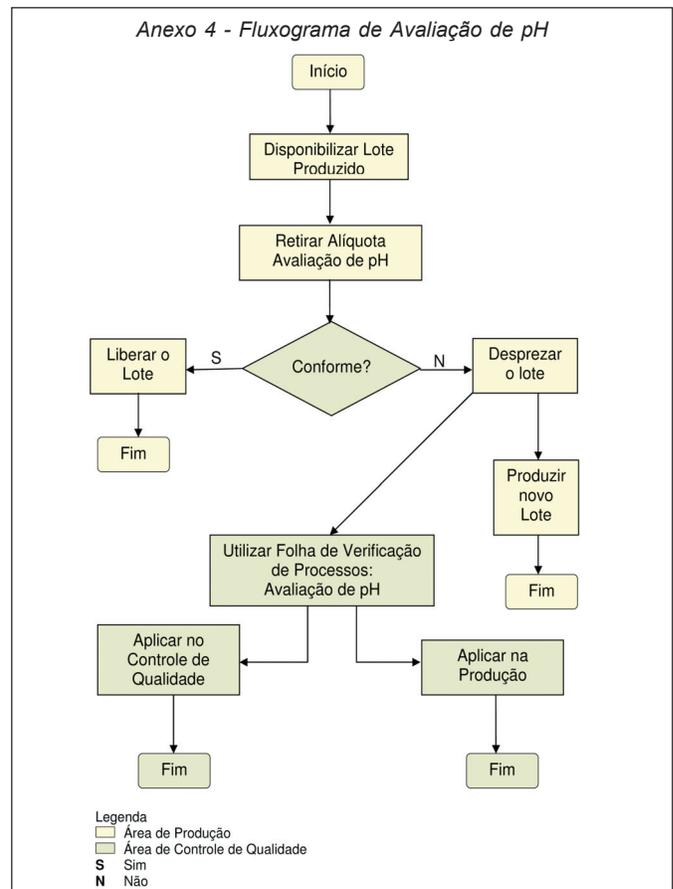
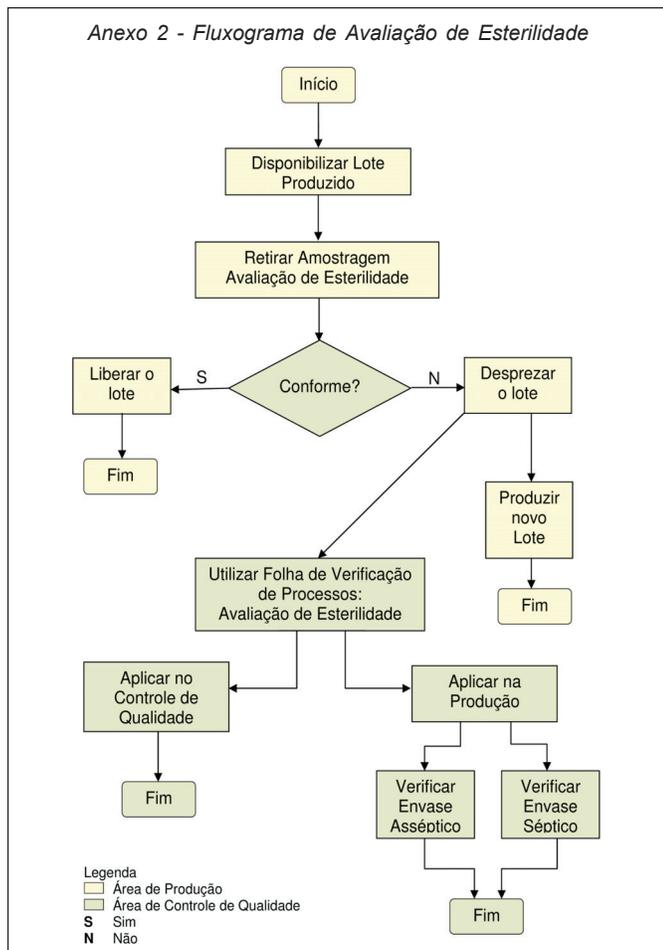
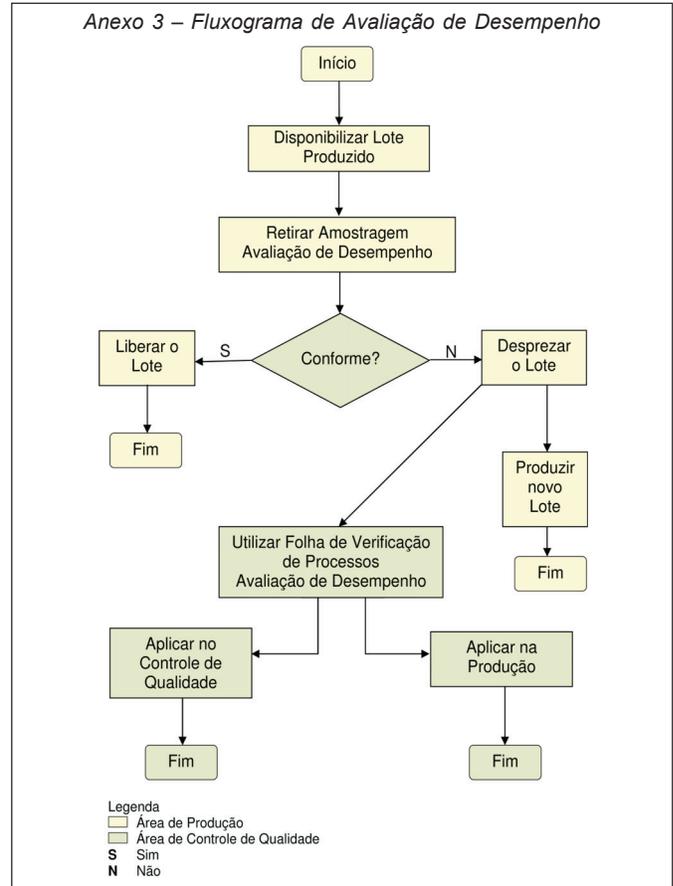
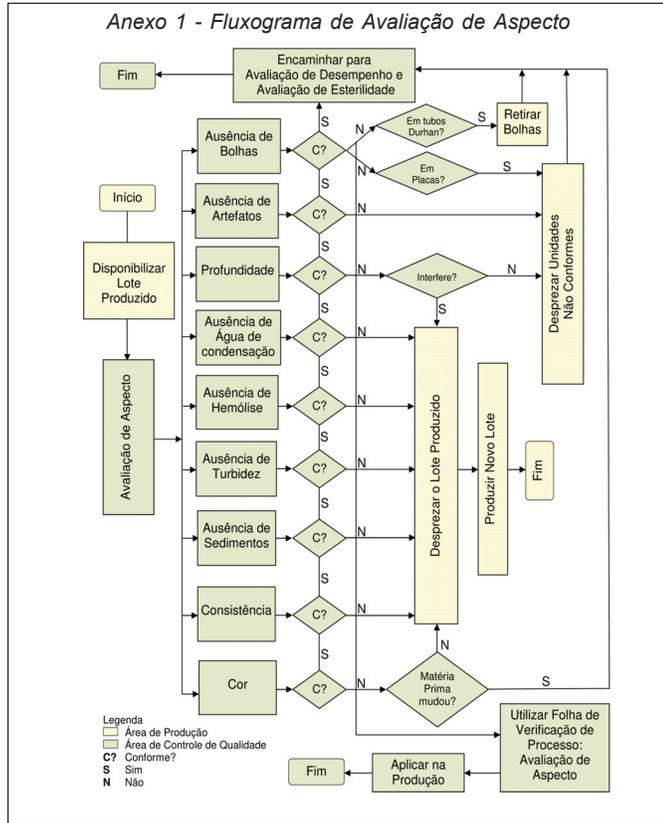
A Tiago Miguel da Silva Queiroz, pelos seus conhecimentos de informática e interesse em ajudar.

Finalmente, agradecemos aos familiares pela compreensão à nossas ausências durante a elaboração deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998. Determina a todos os estabelecimentos que fabriquem, produtos para diagnóstico de uso "in vitro", o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelas "Boas Práticas de Fabricação e Controle em Estabelecimentos de Produtos para Diagnóstico de uso "in vitro". Diário Oficial da União. Poder Executivo. Brasília, 28 ago. 1998.
2. OXOID. Manual OXOID. 1ª. edição em português (2000). São Paulo, SP: OXOID Brasil Ltda, 2000.
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. Rio de Janeiro - RJ: ABNT, 2005.
4. Paris WS. Proposta de uma Metodologia para Identificação de Causa Raiz e Solução de Problemas Complexos em Processos Industriais: Um Estudo de Caso. Curitiba, 2003. 111 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica. Setor de Tecnologia – Mestrado em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Paraná.
5. Graça RMT. A Qualidade no Laboratório Clínico: Uma Tecnologia de Gestão com Ênfase na Acreditação. Curitiba - PR: 2005. p. 43. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
6. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 2ª edição. São Paulo - SP: Editora Sarvier, 2004.
7. Albini CA, Souza HAPHM. A Validação de Meios de Cultura no Laboratório de Análises Clínicas. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), Jornal n.º 18. Rio de Janeiro - RJ: Agosto 2003. p. 6 e 7.
8. Morrison RT, Boyd RN. Química Orgânica. Fundação Calouste Gulbenkian/ Lisboa. 6ª edição. 1394 páginas. 1972.
9. Bier O. Bacteriologia e Imunologia em suas Aplicações à Medicina e à Higiene. 16ª edição revisada e ampliada. Edições Melhoramentos editora da Universidade de São Paulo. São Paulo - SP: 1975. p. 127. 1056 páginas.
10. Almeida NH, Nohama P, Binder NFB. Metodologia para Avaliação e Qualificação de Instrumentos Medidores de pH. Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, volume 24, n. 3. Campinas - SP: Dezembro 2008. p. 201-214.
11. Manual para Acreditação do Sistema da Qualidade de Laboratórios Clínicos - Sistema Nacional de Acreditação DICQ. 3ª edição. Rio de Janeiro - RJ: 2006. p. 93. 113 páginas.

ANEXOS



Anexo 5 - Folha de Verificação de Aspectos.				
FOLHA DE VERIFICAÇÃO DE PROCESSOS				
Processo:	AVALIAÇÃO DE ASPECTO			
Produto Não Conforme:		NC detectada:		
Lote:	Fabricação:	Validade:		
Data:	Responsável:			
AVALIAÇÃO DE COR		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Produto sofreu sobreaquecimento?				
pH final medido, de acordo com a fórmula mestra e/ou fabricante?				
Dissolução completa do produto antes da autoclavagem?				
Produto protegido de incidência de luz?				
Matéria prima dentro do prazo de validade?				
Utilizada matéria prima de acordo com fórmula mestra?				
AVALIAÇÃO DE CONSISTÊNCIA		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Dissolução completa do produto antes da autoclavagem?				
Produto sofreu sobreaquecimento?				
Pesagem respeitando as proporções de cálculo?				
Água reagente respeitando as proporções de cálculo?				
Suplementos respeitando as proporções de cálculo?				
Matéria prima dentro do prazo de validade?				
AVALIAÇÃO DE PROFUNDIDADE		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Dispensado volume solicitado por unidade de envase?				
Dispensadores com verificação de volume vertido?				
Unidade de envase correta para o produto dispensado?				
Unidade de envase padronizada?				
Tubos de Durham padronizados?				
Volume dispensado compatível com dimensões de Tubos de Durham?				
Inclinação com bisel de acordo com o solicitado (para tubos e frascos)?				
Envase asséptico manual com estimativa visual de volume?				
AVALIAÇÃO PARA AUSÊNCIA DE ARTEFATOS		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Vidraria de preparo armazenada de forma protegida?				
Embalagens de matéria-prima armazenadas bem fechadas?				
Tampas de tubos e/ou frascos ressecados e/ou enferrujados?				
Buchas de algodão para fechamento de tubos e/ou frascos sem proteção de gaze?				
AVALIAÇÃO PARA AUSÊNCIA DE SEDIMENTOS E/OU TURBIDEZ		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Dissolução completa do produto antes da autoclavagem?				
pH correto de acordo com fórmula mestra e/ou fabricante?				
Produto sofreu sobreaquecimento?				
Água reagente de acordo com Norma CLSI para preparo de meios de cultura?				
Matéria prima dentro do prazo de validade?				
AVALIAÇÃO PARA AUSÊNCIA DE HEMÓLISE (para meios com sangue)		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Sangue armazenado sob refrigeração adequada?				
Sangue dentro da validade?				
Sangue com cor vermelho vivo?				
Sangue estabilizado em temperatura ambiente antes da suplementação?				
Sangue homogeneizado delicadamente?				
Adição do sangue pelas bordas do frasco?				
Adição do sangue em base acima de 55°C?				
AVALIAÇÃO PARA AUSÊNCIA DE BOLHAS		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Base agitada bruscamente antes de envase?				
Base agitada bruscamente durante resfriamento?				
Base agitada bruscamente após suplementação?				
Dispensação do meio de cultura de forma rápida?				
Bomba peristáltica ajustada?				
AVALIAÇÃO PARA AUSÊNCIA DE ÁGUA DE CONDENSAÇÃO		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Placas de Petri fechadas com produto ainda quente?				
Meio resfriado em torno de 50° a 60°C para dispensação?				
Água de condensação em tubos e/ou frascos incorporados ao meio antes da solidificação?				
Produtos embalados imediatamente após o envase?				

NC = Não Conformidade

Anexo 6 - Folha de Verificação de Esterilidade.				
FOLHA DE VERIFICAÇÃO DE PROCESSOS				
Processo:	AVALIAÇÃO DE ESTERILIDADE			
Produto Não Conforme:		NC detectada:		
Lote:	Fabricação:	Validade:		
Data:	Responsável:			
AVALIAÇÃO DE VIDRARIA		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Vidraria de envase limpa?				
Vidraria de envase estéril?				
Controle de esterilidade de vidraria conforme?				
AVALIAÇÃO DE AUTOCLAVE		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Com Certificado de Calibração?				
Controle de Indicador Biológico conforme?				
Controle Químico conforme?				
Tempo de autoclavação adequado?				
Temperatura de autoclavação adequada?				
AVALIAÇÃO DE CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Com Certificado de Inspeção?				
Com Controle Microbiológico conforme?				
Uso de lâmpada ultravioleta?				
Ligada antes dos procedimentos por período de acordo com o fabricante?				
Desinfecção com álcool a 70%?				
Instalada em ambiente livre de correntes de ar e circulação de pessoas?				
Queda de energia durante o procedimento de envase asséptico?				
Com Barreira Técnica Asséptica (Limpeza e desinfecção) para os procedimentos de controle de qualidade?				
AVALIAÇÃO DE EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Uso de luvas estéreis?				
Uso de avental de manga longa?				
Uso de luvas estéreis sobre as mangas do avental?				
Uso de máscara facial?				
AVALIAÇÃO DE MANIPULAÇÃO		SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Tempo de resfriamento da autoclave aguardado corretamente?				
Produto em ebulição ao ser retirado de autoclave?				
Produtos já autoclavados retidos em autoclave por período prolongado?				
Tubos e/ou frascos foram hermeticamente fechados logo após a retirada de autoclave?				
Água de condensação foi incorporada ao produto nos tubos e/ou frascos autoclavado?				
Adição de suplementos após a autoclavação?				
Suplementos com esterilidade conforme?				
Uso de unidade filtrante 0,22 µ?				
Unidade filtrante com validade conforme?				
Uso de seringa e/ou agulha descartável estéril?				
Seringa e/ou agulha descartável com validade conforme?				
Distribuição asséptica foi realizada dentro da Cabine de Segurança Biológica?				
Distribuição asséptica foi realizada manualmente?				
Distribuição asséptica foi realizada automaticamente?				
Após a distribuição asséptica a embalagem foi fechada dentro da Cabine de Segurança Biológica?				
Placas de Petri fechadas com produto ainda quente?				
Produtos embalados imediatamente após o envase?				
Produtos acabados expostos à incidência solar?				
Produto acabado armazenado adequadamente, conforme especificado?				
Estufa para Teste de Esterilidade utilizada simultaneamente para Teste de Desempenho?				
Manipulação dos produtos para Teste de Esterilidade com mesma luva de Teste de Desempenho?				
Abertura de embalagem final no meio ambiente com exposição do produto envasado?				
Avaliação para o Controle de Esterilidade com abertura de embalagem final no meio ambiente expondo o produto?				

NC = Não Conformidade

Anexo 7 - Folha de Verificação de Desempenho						
FOLHA DE VERIFICAÇÃO DE PROCESSOS						
Processo:	Avaliação De Desempenho					
Produto Não Conforme:						
Lote:	Fabricação:	Validade:				
Data:	Responsável:					
AVALIAÇÃO DE VIDRARIA				SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Vidraria de envase limpa?						
Controle de qualidade de lavagem de vidraria conforme?						
AVALIAÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA				SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
De acordo com fórmula mestra?						
Dentro da validade?						
Sem sinais de deterioração?						
Armazenada em condições de temperatura, umidade e proteção solar adequadas?						
Água reagente de acordo com Norma CLSI para preparo de meios de cultura?						
A fórmula mestra do produto solicita adição de suplementos?						
Suplementos de acordo com fórmula mestra?						
O suplemento foi adicionado?						
Suplementos dentro do prazo de validade?						
AVALIAÇÃO DE PESAGEM				SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Balança com Certificado de Calibração?						
Balança avaliada com pesos padrões?						
Balança tarada e nivelada?						
Tempo de pré-aquecimento efetuado de acordo com fabricante?						
Pesagem respeitando as proporções de cálculo?						
Limpeza de balanças entre as pesagens?						
Pesagem alternada entre produtos de fórmulas mestras diferentes?						
AVALIAÇÃO DA MANIPULAÇÃO				SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Produto sofreu sobreaquecimento?						
Dissolução completa do produto antes da autoclavação?						
Produtos de acordo com fórmula mestra?						
Procedimento de preparo de acordo com fórmula mestra?						
Controle de Desempenho com cepas adequadas ao produto?						
Controle de Desempenho com cepas viáveis?						
Controle de Desempenho com cepas puras?						
Controle de Desempenho dentro do tempo mínimo de incubação?						
Controle de Desempenho dentro da temperatura de incubação?						
Competência Científica do manipulador?						
AVALIAÇÃO DO pH						
Utilizar FOLHA DE VERIFICAÇÃO DE PROCESSOS - CONTROLE DE pH						

NC = Não Conformidade

Anexo 8 - Folha de Verificação de pH.					
FOLHA DE VERIFICAÇÃO DE PROCESSOS					
Processo:	VERIFICAÇÃO DE pH				
Produto Não Conforme:					
Lote:	Fabricação:	Validade:			
Data:	Responsável:				
AVALIAÇÃO DE MEDIDOR DE pH E SOLUÇÕES			SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Medidor de pH foi calibrado?					
Medidor de pH foi controlado?					
Utilizado eletrodo para sólidos (de superfície ou de perfuração)?					
Calibradores com validade adequada?					
Controles com validade adequada?					
KCl 3,5 M?					
KCl com validade adequada?					
Água destilada do dia para lavagem do eletrodo?					
NaOH 1N com validade adequada?					
NaOH 1N armazenado sob refrigeração?					
HCl 1N com validade adequada?					
HCl 1N armazenado em temperatura ambiente?					
Limpeza e secagem de eletrodo entre as medidas?					
AVALIAÇÃO DE MANIPULAÇÃO			SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Média de 03 medidas finais?					
Medida de pH inicial com solução homogeneizada, a frio?					
Medida de pH final a 25°C?					
pH final medido de acordo com a fórmula mestra e/ou fabricante?					
AVALIAÇÃO DA VIDRARIA			SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Controle de Lavagem de Vidraria conforme?					
AVALIAÇÃO DO PRODUTO			SIM	NÃO	NÃO SE APLICA
Água reagente de acordo com Norma CLSI para preparo de meios de cultura?					
Matéria prima armazenada em condições de temperatura, umidade e proteção solar adequadas?					
Matéria prima dentro da validade?					
Dissolução completa do produto antes da autoclavagem?					
Meio de cultura sofreu sobreaquecimento?					

NC = Não Conformidade

Anexo 9 - Relatório de Rastreabilidade		
RELATÓRIO DE RASTREABILIDADE		
Processo:	VERIFICAÇÃO DE pH	
Produto Não Conforme:		
Lote:	Fabricação:	Validade:
Data:	Responsável:	
NÃO CONFORMIDADES DETECTADAS		
PROCESSOS VERIFICADOS E CONFERIDOS RELACIONADOS À NÃO CONFORMIDADE:		
CORREÇÃO PROPOSTA (ação imediata):		
CORREÇÃO EFETIVADA:		
CAUSAS DAS NÃO CONFORMIDADES:		
AÇÃO CORRETIVA PROPOSTA (ação de resolução):		
AÇÃO CORRETIVA EFETIVADA:		

Autor correspondente
Elizabeth El Hajjar Droppa
 LACEN/PR - Seção de Meios de Cultura e Reativos
 Rua Sebastiana Santana Fraga, 1001 - Guatupê
 83060-500 – São José dos Pinhais, PR, Brasil
 Tel.: (41) 3299-3200, (41) 3299-3223.
 E-mail: elhajjardroppa@yahoo.com.br

Uso de *pool* de soros em Programa Piloto de Comparação Interlaboratorial

Use of *pool* of blood serum in Pilot Program Interlaboratory Comparison

Rejane Giacomelli Tavares, Rafael Schutz, Carlo Isaia Neto, Vlademir Vicente Cantarelli

Resumo: A avaliação interlaboratorial ou Teste de Proficiência (TP) é uma ferramenta utilizada como avaliação externa da qualidade, visando comparar o desempenho dos resultados obtidos pelos laboratórios de análises clínicas (LACs). Este trabalho objetivou realizar um programa piloto para comparação interlaboratorial em ensaios de Bioquímica, de acordo com os documentos da National Association of Testing Authorities – NATA (2004) e Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (1999). Participaram desse estudo seis LACs, sediados na região metropolitana de Porto Alegre. Como amostras para essa avaliação foram utilizados três lotes de *pool* de soros onde se avaliaram glicose, creatinina, ureia e colesterol total. Os dados enviados por cada participante foram avaliados utilizando-se estatística robusta, e seu desempenho classificado como Satisfatório, Questionável ou Insatisfatório, segundo o Escore Z obtido. Verificou-se que todos os laboratórios participantes obtiveram resultado Satisfatório para os parâmetros colesterol total e ureia. Para a glicose, um dos participantes obteve resultado Questionável ($Z = 2$). Resultado idêntico foi encontrado para a creatinina, onde um laboratório obteve escore $Z = 2,6$, classificado como Questionável. Com base nestes dados, concluímos que é possível utilizar, com sucesso, o *pool* de soros para ensaios de proficiência, permitindo ao laboratório comparar o seu desempenho com o de outros laboratórios semelhantes, implementando ações preventivas visando à melhoria dos seus procedimentos.

Palavras-chave: Avaliação interlaboratorial; Pool de soros; Bioquímica; Controle de qualidade externo

Abstract: The interlaboratorial assessment or Proficiency Test (PT) is a tool used as external quality assessment, comparing the results obtained by the performance of clinical laboratories (LACs). The aim of this study was propose a pilot program for intercomparison trials of Biochemistry, according to the documents of the National Association of Testing Authorities – NATA (2004) and Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (1999). Participated in this study 6 LACs, based in the metropolitan region of Porto Alegre. As samples for this evaluation was used 3 batches of pool of blood serum which evaluated glucose, creatinine, urea and total cholesterol. The data sent by each participant were assessed using a robust statistical, and its performance rated as Satisfactory, Unsatisfactory or Questionable, according to the Z-score obtained. It was found that all participating laboratories obtained satisfactory results for the parameters total cholesterol and urea. For glucose, a result of the participants got Questionable ($Z = 2$). Identical results was found for creatinine, where a laboratory had Z score=2.6, classified as Questionable. Based on these data, we conclude that it is possible to use successfully, the pool of blood serum for proficiency testing, allowing the laboratory to compare its performance with other similar laboratories, implementing preventive actions aimed at improving their procedures

Keywords: Interlaboratory assessment; Pool of blood serum; Biochemistry; External Quality Control

INTRODUÇÃO

No mundo moderno, a qualidade vem sendo muito difundida e aplicada em todas às áreas da sociedade. Juntamente com as mudanças da era moderna, o conceito de qualidade também evoluiu, deixando de ser relacionado ao “melhor” e mais “caro” para ser melhor conceituado como o mais “apropriado”.⁽¹⁾ A evolução dos sistemas de qualidade fez com que as organizações de sistema de saúde, incluindo os Laboratórios de Análises Clínicas (LACs), adotassem sistemas para o controle e gestão da qualidade, acompanhando uma tendência geral de todas as indústrias.⁽²⁾ Além da utilização de metodologias já amplamente utilizadas em outras áreas, como Gestão da Qualidade Total, Normas ISO, Seis Sigma ou Prêmios da Qualidade, outras iniciativas foram direcionadas e implantadas exclusivamente para busca de qualidade

nos LACs, como certificações ou creditações realizadas por sociedades competentes.^(3,4)

Dentre essas iniciativas, a realização de avaliações interlaboratoriais conhecidas também como Teste de Proficiência (TP), passou a ser uma das principais ferramentas utilizadas como avaliação externa da qualidade, visando comparar o desempenho dos resultados obtidos pelos LACs.^(2,5) Esse tipo de teste surgiu da necessidade dos laboratórios buscarem uma ferramenta que os auxiliasse na avaliação dos resultados produzidos, garantindo confiabilidade analítica em seus processos. A utilização de comparações interlaboratoriais possibilita aos participantes, extrair preciosas informações dos métodos de medição, dos materiais utilizados durante as medições e da qualidade dos laboratórios onde são realizadas tais medições.⁽⁶⁾ Além de ser utilizada para avaliação da exatidão dos resultados, a participação dos

¹Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS

³Ciências da Saúde - UFCSPA

⁴Universidade Feevale

laboratórios em TP possibilitou uma maior confiança na liberação dos resultados pelos laboratórios, pois avalia a habilidade do laboratório de realizar ensaios ou medições de forma competente.^(7,8)

Por outro lado, alguns estudos demonstram que, mesmo com a melhora na qualidade analítica com o uso de novas tecnologias e metodologias, ainda não é possível eliminar variações interlaboratoriais significativas. Estudos demonstram que as variações obtidas se tornam maiores na medida em que os valores dos parâmetros analisados ultrapassam os níveis de normalidade.^(9,10)

De acordo com a ABNT⁽¹¹⁾ o TP realizado por comparação interlaboratorial consiste na organização e na avaliação de desempenho de ensaios por dois ou mais laboratórios em condições pré-determinadas. E os objetivos desses programas são:

- a) Determinar o desempenho individual de laboratórios para os ensaios propostos;
- b) Monitorar continuamente a qualidade;
- c) Propiciar subsídios aos laboratórios para a identificação e solução de problemas;
- d) identificar diferenças interlaboratoriais e
- e) Fornecer confiança adicional aos clientes dos laboratórios.

No Brasil, a Anvisa, através da RDC 302/2005 para funcionamento de laboratório clínico,⁽¹²⁾ dispõe sobre a obrigatoriedade de participação dos laboratórios de análises clínicas em ensaios de proficiência para todos os exames realizados na sua rotina. Ainda, segundo esta norma, para os exames não contemplados por programas de ensaios de proficiência, o LAC deve adotar formas alternativas de controle externo da qualidade, descritas em literatura científica. Tendo em vista que as formas de controle interlaboratorial atualmente disponíveis são unicamente comerciais, este trabalho teve como objetivo realizar um projeto piloto para teste de proficiência em Bioquímica válido, usando amostras alternativas, de fácil acesso, diversas daquelas disponíveis comercialmente.

Objetivos

Realizar um programa piloto para comparação interlaboratorial em ensaios de Bioquímica, avaliando a exatidão dos resultados em amostras de *pool* de soros com valores elevados, entre laboratórios de análises clínicas da região metropolitana de Porto Alegre.

MATERIAL E MÉTODOS

O planejamento e desenvolvimento do programa piloto de comparação interlaboratorial foi realizado de acordo com os documentos da NATA (2004)⁽¹³⁾ e ABNT (1999)⁽¹¹⁾ seguindo o modelo proposto pela Rede Metrológica RS.^(14,15) Participaram desse estudo seis LACs, sediados na região metropolitana de Porto Alegre. A execução de um programa interlaboratorial consiste em planejamento do programa, realização e preparação de amostras, execução dos ensaios e avaliação de desempenho dos laboratórios. Como amostras para essa

avaliação foi utilizado *pool* de soros, obtido a partir de pacientes atendidos no Laboratório de Biomedicina da Universidade Feevale. A seleção diária de amostras de soros consistiu na separação de soros previamente dosados, livres de hemólise, lipemia e icterícia. Os analitos escolhidos para esse estudo foram glicose, creatinina, ureia e colesterol total, por estarem entre os exames mais solicitados na rotina laboratorial.^(16,17)

Após a obtenção de 100 mL de soro, a amostra total foi descongelada até atingir a temperatura ambiente e centrifugada para separação de eventuais precipitados. Após, a mesma teve seu valor redefinido com a adição de soluções comerciais puras para elevação da concentração dos analitos escolhidos, até valores superiores ao limite superior de normalidade. A partir deste *pool*, foram separados três lotes, devidamente identificados, para posterior envio aos laboratórios. O transporte foi realizado em recipiente refrigerado, sendo que todos os laboratórios participantes receberam as amostras no mesmo dia, para evitar variáveis pré-analíticas que comprometessem o estudo. A homogeneidade e estabilidade da amostra foram testadas através de análise estatística (ANOVA e Teste-T) dos valores dosados no 1º e no 15º dias após a confecção do *pool*. O desempenho de cada laboratório participante foi avaliado a partir da análise estatística dos resultados enviados, sendo definida a estimativa do valor real (valor designado) através da mediana do conjunto de dados fornecidos pelos participantes. Para cada parâmetro em análise, o desempenho dos laboratórios foi classificado como satisfatório, questionável ou insatisfatório, conforme o valor do Escore "Z".

$Z \leq 2$	- Resultado Satisfatório
$2 < Z < 3$	- Resultado Questionável
$Z \geq 3$	- Resultado Insatisfatório

RESULTADOS

Na Tabela 1 encontram-se descritos os resultados para o parâmetro colesterol total. Observamos que todos os laboratórios participantes apresentaram resultado classificado como "Satisfatório", com valores de escore Z menores que 2. Além disso, para classificação do desempenho dos participantes, foi observado, ainda, o valor da mediana (valor alvo) e o CV% de cada participante.

O valor-alvo nestas análises foi de 197,17 mg/dL, conforme demonstrado na Tabela 1. Percebe-se que o grupo apresentou um desempenho uniforme nas análises deste parâmetro, possuindo um CV de apenas 5,39%.

O desempenho para o parâmetro ureia pode ser avaliado na Tabela 2, onde todos os participantes também obtiveram classificação como "Satisfatório", com valores de escore "Z" (em módulo) inferiores a 2.

Já para a avaliação da glicose (Tabela 3), percebe-se que um dos participantes (Laboratório 06) obteve escore Z igual a 2, que é o valor limite para a classificação como satisfatório. Entretanto, se avaliarmos os CV% obtido, observa-se que este é extremamente alto (12,61%), indicando problemas

Tabela 1. Resultados do parâmetro colesterol

Código do Laboratório	1ª via (mg/dL)	2ª via (mg/dL)	3ª via (mg/dL)	Média das vias	CV da média	Escore Z da Média
Lab 01	200,67	202,00	203,33	202,00	0,66%	0,5
Lab 02	186,33	187,67	185,67	186,56	0,55%	- 1,0
Lab 03	194,67	194,00	194,00	194,22	0,20%	- 0,3
Lab 04	218,67	219,67	205,67	214,67	3,64%	1,6
Lab 05	199,67	202,00	201,33	201,00	0,60%	0,4
Lab 06	187,67	181,00	180,67	183,11	2,16%	- 1,3
Parâmetro Estatístico Calculado						
Mediana dos dados (valor de referência)	197,17					
1º Quartil do conjunto de dados	187,67					
3º Quartil do conjunto de dados	202,00					
Amplitude Interquartilica (IQ)	14,33					
Amplitude Interquartilica Normalizada (IQN)	10,62					
Coefficiente de Variação (CV)	5,39%					

Tabela 2. Resultados do parâmetro Uréia

Código do Laboratório	1ª via (mg/dL)	2ª via (mg/dL)	3ª via (mg/dL)	Média das vias	CV da média	Escore Z da Média
Lab 01	86,33	86,67	84,33	85,78	1,47%	-0,6
Lab 02	89,67	90,00	85,67	88,44	2,73%	0,4
Lab 03	87,43	87,30	86,10	86,94	0,84%	- 0,2
Lab 04	84,43	85,80	81,57	83,93	2,57%	-1,2
Lab 05	93,00	92,33	92,67	92,67	0,36%	1,9
Lab 06	88,33	89,67	88,00	88,67	0,99%	0,5
Parâmetro Estatístico Calculado						
Mediana dos dados (valor de referência)	87,37					
1º Quartil do conjunto de dados	85,88					
3º Quartil do conjunto de dados	89,67					
Amplitude Interquartilica (IQ)	3,79					
Amplitude Interquartilica Normalizada (IQN)	2,81					
Coefficiente de Variação (CV)	3,22%					

Tabela 3 - Resultados do parâmetro glicose

Código do Laboratório	1ª via (mg/dL)	2ª via (mg/dL)	3ª via (mg/dL)	Média das vias	CV da média	Escore Z da Média
Lab 01	213,00	212,00	214,67	213,22	0,63%	0,0
Lab 02	223,67	221,33	220,33	221,78	0,77%	0,6
Lab 03	190,67	190,67	189,67	190,33	0,30%	- 1,7
Lab 04	224,67	229,00	203,67	219,11	6,18%	0,4
Lab 05	209,33	201,33	212,67	207,78	2,80%	- 0,4
Lab 06	276,33	222,67	224,67	241,22	12,61%	2,0
Parâmetro Estatístico Calculado						
Mediana dos dados (valor de referência)	276,33					
1º Quartil do conjunto de dados	222,67					
3º Quartil do conjunto de dados	224,67					
Amplitude Interquartilica (IQ)	241,22					
Amplitude Interquartilica Normalizada (IQN)	12,61%					
Coefficiente de Variação (CV)	2,0					

nas dosagens. Nestes casos, segundo Rodrigues e colaboradores, cada laboratório deve avaliar seus resultados observando com atenção os valores de desvios padrão e coeficientes de variação determinados para cada análise, e, assim, determinar se os resultados alcançados são satisfatórios para seus objetivos ou se necessitam de revisão dos procedimentos, equipamentos, pessoal, materiais utilizados, etc.⁽¹⁵⁾

Tabela 4 - Resultados do parâmetro creatinina

Código do Laboratório	1ª via (mg/dL)	2ª via (mg/dL)	3ª via (mg/dL)	Média das vias	CV da média	Escore Z da Média
Lab 01	3,83	4,07	4,03	3,98	3,17%	1,0
Lab 02	4,63	4,60	4,50	4,58	1,52%	2,6
Lab 03	3,37	3,37	3,47	3,40	1,70%	- 0,4
Lab 04	3,57	3,60	3,17	3,44	7,00%	- 0,3
Lab 05	3,63	3,57	3,57	3,59	1,07%	0,1
Lab 06	3,48	3,45	3,31	3,41	2,68%	- 0,4
Parâmetro Estatístico Calculado						
Mediana dos dados (valor de referência)	3,57					
1º Quartil do conjunto de dados	3,45					
3º Quartil do conjunto de dados	3,98					
Amplitude Interquartilica (IQ)	0,53					
Amplitude Interquartilica Normalizada (IQN)	0,39					
Coefficiente de Variação (CV)	11,05%					

A avaliação de desempenho para a creatinina é representada na Tabela 4. Pode-se observar que o laboratório 02 teve seu desempenho considerado "Questionável" para esse parâmetro atingindo, um escore Z = 2,6. Os demais participantes avaliados obtiveram desempenho considerado "Satisfatório" para esse parâmetro. Ao contrário do parâmetro anteriormente relatado (glicose), o resultado de IQN = 0,39 desse parâmetro foi o mais baixo entre todos os parâmetros avaliados, evidenciando que houve pouca variação dos resultados dos participantes. Importante destacar que a IQN mede a dispersão dos resultados, tendo papel fundamental na determinação das regiões de resultados satisfatórios. Neste sentido, quanto menor o valor da IQN, menor será a faixa de resultados satisfatórios.⁽¹⁵⁾

DISCUSSÃO

Nos testes de proficiência, a amostra utilizada pode ser considerada o fator limitante para o sucesso da avaliação. Por esse motivo utilizamos *pool* de soros como amostra, pois o mesmo não sofre influência de fatores como o efeito matriz.⁽¹⁸⁾ A utilização desse tipo de amostra torna também a avaliação mais econômica, na medida em que não é necessária a compra de material exclusivo para esse fim. Além disso, consideramos mais relevante realizar essa avaliação com a concentração dos parâmetros em nível de decisão médica relevante, conforme já é preconizado para o controle interno dos laboratórios. Associado a isso, a realização da análise estatística adequada para avaliar a homogeneidade e estabilidade da amostra reforça a viabilidade de utilização de *pool* de soros como amostra para avaliação interlaboratorial nos parâmetros bioquímicos estudados.

A opção pelo modelo de estatística robusta utilizada nesse trabalho foi influenciada pelo número de participantes dessa avaliação, pois, ao contrário da estatística clássica, a estatística robusta sofre pouca influência de valores dispersos, dispensando a utilização de procedimentos para a identificação e remoção desses valores.^(14,15,19) Além disso, a estatística robusta é considerada o método mais eficiente para tratamento de resultados de ensaios de proficiência,

com ampla possibilidade de uso, independente da distribuição dos dados, e também por sua praticidade de implementação.⁽¹⁹⁾

A classificação dos resultados dos laboratórios dentro das categorias "satisfatório" ou "questionável" foi obtida por meio do cálculo do escore Z. Para isto foi utilizado o IQN, que é uma medida de dispersão equivalente ao desvio padrão da estatística clássica. Dentre todos os parâmetros analisados, a glicose teve o maior valor de IQN, o que determinou uma ampla faixa de resultado "Satisfatório" incluindo o resultado do participante Laboratório 06. Como anteriormente relatado, a classificação deste resultado requer uma avaliação cuidadosa e pode ser discutida, visto que houve uma grande variação na média das vias desse participante. Essa variação nos remete a uma imprecisão importante dos valores enviados.

Outro ponto que merece discussão foi observado em relação ao participante Laboratório 02, em relação à creatinina. Embora o mesmo tenha obtido um valor de escore "Z" igual a 2,6, observa-se um CV = 1,52%, o que indica uma boa precisão das dosagens. Assim, o resultado "Questionável" parece estar mais relacionado a equívocos na indicação da metodologia utilizada por esse participante do que propriamente em erro analítico.

O enquadramento da maioria dos resultados na categoria "Satisfatório" nessa avaliação não serve como avaliação definitiva para o participante. É aconselhado que cada laboratório avalie seus resultados, observando com atenção os valores de desvios padrão e coeficientes de variação determinados para cada análise, de forma a definir se os resultados alcançados são adequados para seus objetivos ou se necessitam de revisão dos procedimentos, equipamentos, pessoal, materiais utilizados, etc.^(14,15)

Cabe ressaltar que é fundamental levar em consideração as limitações do teste de proficiência, pois ele considera somente o processo analítico, não incluindo as atividades pré ou pós-analíticas dos LAC, não devendo o mesmo ser utilizado como única ferramenta de controle de qualidade.^(17,20)

CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados nesse trabalho indicam que é possível a utilização de *pool* de soros como amostra para testes de proficiência, desde que sejam tomados os cuidados necessários na seleção, preparação e armazenamento dessas amostras. Em relação à metodologia de análise estatística, consideramos a estatística robusta uma ferramenta eficiente para avaliação dos laboratórios participantes, pois possibilita a avaliação dentro de um grupo menor, tornando possível a realização de avaliações regionais, mais próximas da realidade dos laboratórios.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos laboratórios clínicos que se disponibilizaram a participar, gratuitamente, da etapa de avaliação deste projeto piloto.

REFERÊNCIAS

1. Algarte, W; Quintanilha, D. A história da qualidade e o programa brasileiro da qualidade e produtividade. Rio de Janeiro: INMETRO/SENAI, 2000.
2. Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. Fundamentos de Química Clínica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
4. Berlitz, F. A. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. J Bras Patol Med Lab, 46 (5): 353-363, out. 2010.
5. Motta, V. T. et al. Gestão da Qualidade no Laboratório Clínico. 2. ed. Caxias do Sul, RS: Editora Médica Missau, 2001.
6. Costa JG, Rocha G M. Organização e avaliação de comparações interlaboratoriais. Congresso da Qualidade em Metrologia (EQUALAB), 2005, São Paulo. Trabalhos técnicos. São Paulo, REMESP, 2005. Disponível em: <www.grupocalbracao.com.br/download.aspx?idAttribute=artigo_arquivo&idContent=1001>. Acesso em: 10 maio 2011.
7. Pizzolato et al. A influência do sistema de gestão de laboratórios nos resultados dos ensaios de proficiência da construção civil. Gest. Prod 15 (3): 579-589, set./dez. 2008.
8. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin Chem Lab Med. 2006;44(6):750-9.
9. Cabral EC, et al. Determinação sérica de lipídeos: Variações interlaboratoriais. Rev Bras Anal Clin. 2010;24(2):115-8.
10. Picheth, G. et al. Controle de qualidade da glicemia um estudo interlaboratorial. Rev Bras Anal Clin. 2001;33(4):171-4.
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR ISO/IEC Guia 43-1: Ensaios de Proficiência por comparação interlaboratorial. Parte 1: Desenvolvimento e operação de programas de ensaio de proficiência. Rio de Janeiro, 1999.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 13 out. 2005.
13. National Association of Testing Authorities (NATA). Guide to NATA Proficiency Testing. Austrália. Fev. 2004.
14. Albano F, Rodrigues M, Albano JF. Garantia da qualidade analítica através de programas de comparação interlaboratorial. In: Semana de Engenharia de Produção Sul-Americana (VII SEPROSUL), 7., 2007, Salto, Uruguai. Disponível em: <http://www.producao.ufrgs.br/arquivos/publicacoes/128_Garantia%20qualidade%20analitica.pdf>. Acesso em: 17 maio 2011.
15. Rodrigues M, Albano F, Rodrigues T. Análise de resultados programa piloto de comparação interlaboratorial em ensaios de cromatografia iônica. Congresso da Qualidade em Metrologia (EQUALAB), 2008, São Paulo. Trabalhos técnicos. São Paulo, REMESP, 2008. Disponível em: <http://www.vertent.net/remesp/enqualab2008/cdrom/pdf/TT005.pdf>. Acesso em: 17 maio. 2011.
16. Capilheira MF, Santos IS. Epidemiologia da solicitação de exame complementar em consultas médicas. Rev Sau Púb. 2006;40 (2):289-97.
17. Corrêa JA. Programa Nacional de Controle de Qualidade. Manual do Laboratório Participante PNCQ, 2008.
18. Ricós C, Juvany R, Alvarez V, Jiménez CV, Perich C, Minchinela J, et al. Commutability between stabilized materials and fresh human serum to improve laboratory performance. Clin Chim Acta. 1997;263(2):225-38.
19. Biasoli V, et al. Aplicação de estatística robusta em ensaios de proficiência. Artigos Contollab. Disponível em: <https://www.controllab.com.br/pdf/artigo_estadistica_robusta.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2011.
20. Oliveira GL, et al. Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. J Bras Patol Med Lab. 2009;45 (6): 441-7.

Autor correspondente

Rejane Giacomelli Tavares

Avenida Grécia, 1100 ap 1805 – Bairro Passo da Areia
91350-070 – Porto Alegre, RS

Vantagens do diagnóstico molecular para malária em comparação à microscopia

Advantages of malaria molecular diagnosis in comparison to microscopy

Janayna Roriz Hipólito¹, Pedro Paulo Vieira¹, Claudio Fernández Araujo², Maria das Graças Costa Alecrim¹

Resumo: A malária é um problema de saúde pública na região Amazônica, onde mais de 200 mil casos ocorrem anualmente somente no estado do Amazonas. A principal técnica para o diagnóstico da malária é a gota espessa; entretanto, outros métodos vêm sendo avaliados e os testes moleculares têm se mostrado mais sensíveis e específicos para detectar e diferenciar as espécies em baixas parasitemias. Neste estudo foram analisadas 300 amostras, sendo que 200 eram referentes ao D0 (diagnóstico inicial da infecção) e 100 coletadas no sétimo dia (D7) de tratamento e comparadas as técnicas de microscopia, PCR em tempo real e *nested*-PCR. No diagnóstico microscópico inicial pela gota espessa, não foi detectada nenhuma amostra com infecção mista, sendo 9% por *P. falciparum* e 91% por *P. vivax*. No diagnóstico molecular por *nested*-PCR foram observadas infecções mistas, coinfeção de *P. falciparum* e *P. vivax*, em 19% destas amostras. A sensibilidade dos testes para *P. vivax* foi em média 71%, e a especificidade 92%, e para *P. falciparum* foi 91% e 79%, respectivamente. As 100 amostras restantes do dia D7 de tratamento eram negativas pela microscopia, porém, o diagnóstico molecular demonstrou 21% de positividade. Este estudo mostrou que muitas infecções mistas vêm sendo subestimadas e que testes moleculares devem ser indicados como um diagnóstico alternativo e complementar à gota espessa, principalmente nos casos de pacientes com baixas parasitemias, estudo de infecções criptônicas, na avaliação da negatificação da parasitemia para monitoramento terapêutico e em estudos que visem a diminuição da transmissão pela existência de prováveis gametócitos persistentes após o tratamento.

Palavras-chave: Malária; Diagnóstico; Nested-PCR; PCR em tempo real

Abstract: Malaria is a problem of public health in the Amazonian area where more than 200,000 cases happen annually only in the state of Amazon. The main technique for diagnosis of the malaria is the drop thickens, however, other methods are being appraised, and the molecular tests have shown more sensitive and specific to detect and to differentiate the species in low parasitaemias. In this study 300 samples were analyzed, and 200 were regarding D0 (initial diagnosis of the infection) and 100 collected in the seventh day (D7) of treatment and compared the microscopy techniques, PCR in real time and nested-PCR. In the initial microscopic diagnosis for the drop thickens, any sample was not detected with mixed infection, being 9% for *P. falciparum* and 91% for *P. vivax*. In the molecular diagnosis for nested-PCR mixed infections, co-infection of *P. falciparum* and *P. vivax* were observed, in 19% of these samples. The sensibility of the tests for *P. vivax* was 71%, and the specificity 92% on average, and for *P. falciparum* it was 91% and 79%, respectively. The 100 remaining samples of the day treatment D7 were negative for the microscopy, however, the molecular diagnosis demonstrated 21% of assertiveness. This study showed that many mixed infections have been underestimated and that molecular tests should be suitable as complemental diagnosis in patients with low parasitemias, study of cryptonic infections, in the evaluation of the clearance of the parasitaemia for monitoring therapeutic, and in studies that seek the decrease of the transmission for the existence of probable persistent gametocytes after the treatment.

Keywords: Malaria; Diagnosis; Nested-PCR; Real time PCR

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, com manifestações de caráter agudo e está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais e representa uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em regiões endêmicas. Cerca de 40% da população mundial estão expostos ao risco de transmissão.⁽¹⁻⁴⁾

A forma diagnóstica mais utilizada para pesquisa de parasitas da malária no sangue é a microscopia. O material utilizado nesse exame é o sangue obtido da punção digital.⁽⁵⁾ Outro teste microscópico para diagnóstico da malária é realizado utilizando fluorescência com afinidade para ácidos

nucleicos dos parasitas. O Quantitative Buffy Coat – QBC é um desses testes que visualizam os parasitas em capilares centrifugados. Esse teste é recomendado para triagem em banco de sangue.⁽⁶⁾

O diagnóstico molecular para malária começou a ser testado em meados dos anos 80, com hibridização de sondas espécie-específica em membrana de nitrocelulose. O primeiro diagnóstico para malária por meio de hibridização de sondas de oligonucleotídeos para a subunidade menor do RNA ribossomal (SSUrRNA) foi testado em 1989, possibilitando a detecção das quatro espécies de plasmódio. Entretanto, esse tipo de análise não é muito usado pelo fato de usar radioatividade.^(7,8)

¹Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

²Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (LACEN-AM)

*Trabalho de conclusão do curso de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas

Estudos para avaliar qual o melhor método de diagnóstico para malária vêm demonstrando que as técnicas que utilizam a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) são mais sensíveis e específicas em relação aos métodos microscópicos e imunológicos, sendo por isso o método mais indicado para diagnóstico de malária em bancos de sangue e nos casos de sintomatologia da doença sem positividade nos outros testes diagnósticos de rotina.^(5,9,10-14) O uso do diagnóstico molecular para malária por PCR em tempo real, que é a técnica mais moderna e rápida para o uso da PCR, parece estar restrito a grandes centros de pesquisas.⁽¹⁵⁾ Por esse motivo, a análise da utilização desse diagnóstico para finalidades epidemiológicas pode contribuir com a formulação de novas medidas de controle da doença.

Os testes moleculares de diagnóstico por PCR em tempo real para malária demonstram maior rapidez e eficiência em relação a *nested*-PCR.^(14,16-22) Esses testes ainda não haviam sido testados em amostras de campo na região Amazônica e, por isso, a proposta deste trabalho é indicar algumas finalidades para os métodos de diagnóstico molecular em malária, através das técnicas de *nested*-PCR e PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODOS

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, amostras sanguíneas foram coletadas por via endovenosa em tubos contendo EDTA e depois centrifugadas a 800g/10min. As hemácias foram alíquotadas em volumes de 500 µl de solução criopreservadora (Glicerolaty). Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica, em câmara de fluxo laminar. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -70°C, catalogadas e mantidas no banco de patógenos na gerência de malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) para subseqüentes análises moleculares, conforme Vieira et al.⁽²³⁾

Foram selecionadas 300 amostras com diagnóstico positivo para malária pela técnica microscópica da gota espessa, sendo 200 do dia do início do tratamento (D0) e 100 amostras de pacientes em tratamento para malária *vivax* não grave, tratadas no esquema terapêutico adotado pela FMTAM, cuja coleta do sangue para o diagnóstico molecular dessas amostras foi realizada no sétimo dia de tratamento (D7).

O diagnóstico molecular por *nested*-PCR para a malária foi realizado nas 300 amostras e o resultado foi analisado em dois grupos distintos (amostras coletadas no D0 e amostras coletadas no D7). Primeiramente foi realizado o diagnóstico molecular das 200 amostras coletas no D0, e, em 34 destas amostras, foi realizado também o diagnóstico molecular por PCR em tempo real.

A realização da extração do DNA foi realizada com o uso de kits de extração comercialmente disponíveis (QIAamp mini-kits e UltraClean - MO BIO Laboratories). Após a extração do DNA, foi realizada uma técnica de reação em cadeia da polimerase aninhado (*Nested*-PCR). A técnica consiste na utilização de oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem o gene codificante da subunidade menor do RNA ribossomal

(ssurRNA) do *Plasmodium*,^(12,24) sendo duas reações: a primeira gênero-específica com amplicons de 1200 pb e a segunda espécie-específica, com amplicons de 205 pb para *P. falciparum* e com amplicons de 120pb para *P. vivax*.

A observação do resultado da amplificação foi realizada pela visualização das bandas correspondentes aos produtos de PCR em transiluminador ultravioleta após eletroforese (80V) dos mesmos em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10 µg/µL).

A reação de amplificação em tempo real foi realizada no LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), usando o SYBR Green I como corante fluorescente da reação. Os *primers* utilizados para a reação do PCR em tempo real para amplificar as seqüências gênero-específicas do *Plasmodium* sp. foram realizados conforme descrito por Ciceron et al.⁽²⁵⁾ e os *primers* para as regiões espécie-específicas para *P. falciparum* e *P. vivax* conforme Snounou et al.⁽¹²⁾ A análise dos resultados do diagnóstico no LightCycler® foi realizada através das curvas de dissociação, fornecidas pelo próprio aparelho.⁽²⁶⁾ Os testes de PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Parasitologia da Universidade Claude Bernard Lyon I, na França.

Para cada reação foi usado o DNA de humano como controle negativo, e o DNA de amostras em cultivo (3d7 para controle de *P. falciparum*) ou o DNA de uma amostra conhecida (de *P. vivax*), foram utilizados como controles positivos.

RESULTADOS

As 200 amostras foram coletadas com finalidade de realização de análises moleculares por *nested*-PCR no D0 (dia em que foi realizado o diagnóstico da gota espessa com resultado positivo para infecção malárica). Das 200 amostras estudadas no D0, 176 eram provenientes de pacientes da cidade de Manaus, e 91% (174) apresentaram diagnóstico microscópico de infecção pelo *P. vivax* (Tabela 1). Após aplicação da metodologia molecular de diagnóstico, foi confirmada a presença do *P. vivax* em 100% das amostras diagnosticadas pela gota espessa. Adicionalmente, foram observadas infecções mistas, coinfeção de *P. falciparum* e *P. vivax*, em 17,8% (31) destas amostras. As 24 amostras restantes eram provenientes de localidades do interior do estado do Amazonas e foram obtidas com o apoio da FUNASA e das Secretarias Municipais de Saúde (SEMSA) nos municípios de São Gabriel da Cachoeira (09), Tefé (08), Humaitá (04) e Careiro (03).

Tabela 1. Diagnóstico Laboratorial das amostras coletadas em D0

Local de coleta	Total de amostras	Gota espessa		PCR Diagnóstico			
		<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	I.M.	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	I.M.
Manaus	176	174	2	0	143	2	31
Interior*	24	8	16	0	5	12	7
Total	200	182	18	0	148	14	38

I.M. = Infecções Mistas; * - São Gabriel da Cachoeira, Tefé, Humaitá e Careiro - AM
Obs: A proporção entre espécies plasmódios presentes no banco de amostras da FMTAM não representa necessariamente a incidência das mesmas nas diferentes áreas malarígenas do Estado do Amazonas

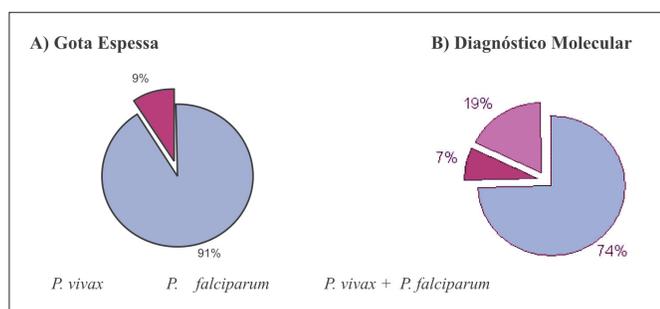


Figura 1 – Percentual de detecção laboratorial em duas técnicas de diagnóstico da malária humana.

Adicionalmente ao método de *nested*-PCR, outro diagnóstico molecular para malária foi realizado em 34 das amostras coletadas no D0, utilizando metodologia descrita por de Mombrión,⁽²⁶⁾ baseada na técnica de PCR em tempo real (Lightcycler, Roche®). O resultado desses experimentos está demonstrado na Tabela 2.

Na comparação do diagnóstico da malária por PCR em tempo real x gota espessa, a copositividade (sensibilidade) desses dois testes para o diagnóstico da infecção causada pelo *P. vivax* foi de 69% enquanto a conegatividade (especificidade) foi de 95%. Para o *P. falciparum* a copositividade (sensibilidade) dos testes foi de 95% enquanto a co-negatividade (especificidade) foi de 75%. O índice Kappa encontrado foi de 0,65 sendo regular a concordância entre os testes.

Na comparação do diagnóstico da malária por *nested*-PCR x gota espessa, a copositividade dos testes para *P. vivax* foi de 69% enquanto a conegatividade foi de 95%. A copositividade dos testes para *P. falciparum* foi de 78% enquanto a conegatividade foi de 94%. O índice Kappa

encontrado foi de 0,56 e a concordância entre os testes foi regular.

Na comparação do diagnóstico da malária por PCR em tempo real x *nested*-PCR, a sensibilidade dos testes para *P. vivax* foi de 75% enquanto a especificidade foi de 86%. A sensibilidade dos testes para *P. falciparum* foi de 100% enquanto a especificidade foi de 68%. O índice Kappa encontrado foi de 0,56 e a concordância dos dois testes moleculares foi regular.

Para fins de avaliação epidemiológica e da sensibilidade do diagnóstico molecular, incluímos neste estudo a análise feita em 100 amostras de sangue obtidas de pacientes ao longo do tratamento para malária causada pelo *P. vivax*. O processamento dessas amostras para análises moleculares de detecção de DNA plasmodial foi realizado no sétimo dia de tratamento (D7). Como resultados, foram diagnosticadas positivamente 21% das amostras (Tabela 3).

Quase todas as amostras (97%) apresentaram diagnóstico microscópico para malária como monoinfecção pelo *P. vivax* em D0, com exceção de três amostras com possíveis infecções mistas nos testes microscópicos de diagnóstico em D0, nestes casos, a avaliação molecular confirmou a presença de DNA de *P. falciparum* em apenas uma delas.

DISCUSSÃO

No diagnóstico molecular para malária, por *nested*-PCR, nas 200 amostras coletadas no D0 da infecção para uma confirmação do diagnóstico microscópico da gota espessa, o resultado da *nested*-PCR confirmou a presença dos parasitas em todas as amostras testadas. Adicionalmente, foi encontrada grande quantidade de infecções mistas, cerca

Tabela 2. Sítios de coleta e diagnóstico para malária nas três metodologias

Amostras	Origem	No de amostras	Técnicas de diagnóstico para malária								
			G.E.			nested - PCR			PCR em tempo real		
			P.f	P.v	I.M.	P.f	P.v	I.M.	P.f	P.v	I.M.
Manaus		10	2	8	0	2	6	2	2	7	1
Humaitá		4	4	0	0	2	0	2	3	1	0
São Gabriel da Cachoeira		9	3	6	0	3	5	1	6	3	0
Tefé		8	2	6	0	5	1	2	7	1	0
Careiro		3	3	0	0	3	0	0	3	0	0
Total		34	14	20	0	15	12	7	21	12	1

Obs: n = 34; P.f : *Plasmodium falciparum*; P.v: *Plasmodium vivax*; I.M.: Infecção mista; G.E. = gota espessa

Tabela 3. Diagnóstico molecular positivo em D7

Amostras	Gota Espessa		Detecção molecular por PCR	
	D0	D7	D7 (<i>P. vivax</i>)	D7 (<i>P. falciparum</i>)
<i>P. vivax</i>	97	0	20	0
<i>P. falciparum</i> + <i>P.vivax</i>	3	0	0	1
Total	100	0	20	1

Obs: n = 34; P.f. : *Plasmodium falciparum*; P. v.: *Plasmodium vivax*; I. M: Infecção mista; G.E. = gota espessa

de 19%. Apenas uma amostra obteve diagnóstico molecular diferente do que foi realizado pela microscopia.

Resultados positivos na *nested*-PCR e negativos na microscopia devem ser considerados como verdadeiros positivos, uma vez que essa técnica é mais sensível que a microscópica.⁽²⁷⁾ Os resultados da detecção de 19% de infecções mistas demonstram que elas têm sido subestimadas pelo teste diagnóstico microscópico da gota espessa, confirmando outras pesquisas já realizadas na gerência de malária da FMTAM, onde cerca de 11% de infecções mistas foram encontradas em monoinfecções de malária *vivax* ou *falciparum*.⁽²⁸⁾

A melhor sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos para malária por técnicas moleculares de amplificação por PCR em relação à microscopia vem sendo argumentada desde 1993, sendo usada principalmente para fins epidemiológicos.^(5,9-13,24,29) Entretanto, para fins de diagnóstico na rotina de áreas endêmicas, essa técnica não é muito utilizada devido ao seu alto custo e à necessidade de infraestrutura e mão de obra mais especializada.

Essas infecções mistas de *P. vivax* e *P. falciparum* subestimadas à microscopia, mas diagnosticadas nas técnicas moleculares, demonstram que, em regiões endêmicas, pacientes com malária por infecções mistas são comuns.⁽³⁰⁾ Entretanto, o diagnóstico desse tipo de infecção não é uma tarefa fácil pela técnica microscópica. Isso ocorre principalmente porque a quantidade de uma espécie de parasita costuma ser bem menor que a outra, sendo, portanto, quase imperceptível até mesmo para bons microscopistas. Mudanças na morfologia de alguns parasitas também podem levar a similaridades entre alguns estágios de evolução das espécies, tornando o diagnóstico diferencial dessas espécies ainda mais difícil.^(31,32)

Acredita-se que o principal problema da falha na detecção dessas infecções mistas tenha sido devido aos baixos níveis de parasitemias de uma espécie em relação a outra, o que, na maioria das vezes, não gera a sintomatologia da doença da espécie que está em menor quantidade, mas o indivíduo é um portador assintomático dessa espécie e, se não for tratado de forma eficaz na eliminação de ambas as espécies, a que estiver em menor quantidade poderá se manifestar posteriormente.⁽³³⁾

A quantidade de infecções mistas encontradas (19%) pelo método molecular poderia gerar dúvidas se a positividade dos resultados desses testes moleculares não seria devido à presença de DNA livre circulante, provenientes de infecções anteriores. Entretanto, os parasitas mortos são destruídos por mecanismos de resposta imune do organismo ou por tratamento devido à ação de drogas, sendo retirados da circulação sanguínea por fagócitos rapidamente. Além disso, Jarra e Snounou⁽³⁴⁾ demonstraram que apenas parasitas viáveis são detectados por *nested*-PCR.

Sendo assim, os resultados obtidos pela *nested*-PCR no diagnóstico de malária mista eram realmente devido à presença das duas espécies de parasitas viáveis, com potencial de desenvolverem a doença, mas que, por algum motivo, apenas uma espécie manifestou a sintomatologia clínica da doença, ficando a outra de forma criptônica. Os resultados laboratoriais nem sempre são semelhantes aos relatos clíni-

cos; entretanto, esses métodos são ótimas ferramentas de pesquisas epidemiológicas e podem ser usados para avaliação dos tratamentos e triagem de pacientes assintomáticos em regiões endêmicas como o Amazonas.^(16,28)

É indiscutível a melhor sensibilidade e especificidade da PCR sobre a gota espessa e, por esta razão, no caso de infecções não detectadas pela microscopia, mas com indícios clínicos de infecção pelo parasita da malária, é prudente viabilizar a aplicabilidade do método molecular, a fim de diagnosticar corretamente a doença, sendo sua principal vantagem o diagnóstico de infecções mistas e nos casos de baixas parasitemias.^(17-19,21)

Na análise do diagnóstico das 34 amostras testadas pelas três técnicas (microscópica, *nested*-PCR e PCR em tempo real) houve divergência de alguns resultados entre os testes, sendo regular a concordância entre eles. Entretanto, outro estudo realizado na Amazônia Venezuelana com diagnóstico molecular por *nested*-PCR demonstrou que a reprodutibilidade desse teste pode variar, e a pouca reprodutibilidade do teste pode ser devido a problemas de contaminações durante as manipulações.⁽²⁷⁾ O método de PCR em tempo real é o mais confiável por diminuir essa possibilidade de contaminações durante o processo, uma vez que as amostras são menos manipuladas durante a execução do teste diagnóstico.

Nos estudos realizados nesse trabalho não havia nenhuma amostra mista diagnosticada pela microscopia, enquanto que pela *nested*-PCR foram diagnosticadas sete em 200 amostras, e, pela PCR em tempo real, foi diagnosticada apenas uma em 34 amostras. Esse resultado demonstra que problemas de contaminação durante a *nested*-PCR pode ter acontecido, ou a quantidade de DNA na amostra utilizada na reação de PCR em tempo real foi insuficiente para detecção de parasitas que estavam em baixa parasitemia, uma vez que pouca quantidade dessas amostras foram armazenadas em papel de filtro e transportadas para a França, local onde foi realizado o experimentos em PCR em tempo real.

Os testes diagnósticos das 34 amostras foram realizados no LightCycler® de forma rápida, sendo feitos em apenas uma hora para a amplificação e análise dos resultados para o diagnóstico da malária. Na comparação desse teste molecular com o diagnóstico microscópico, a PCR em tempo real apresentou uma sensibilidade de 61% para infecções por *P. vivax* e 99% para *P. falciparum* e uma especificidade de 94% para o *P. vivax* e de 66% para o *P. falciparum*. Entretanto, esse tipo de PCR em tempo real apresenta custos mais elevados que experimentos realizados no LightCycler®.⁽¹⁹⁾

Com base nesses resultados e em outros trabalhos, ambos os testes, microscópicos e moleculares, são considerados bons não só para o diagnóstico como também para monitoramento do tratamento, porém, a sensibilidade do método de PCR em tempo real é maior; 3 parasitas/ μ L^(18,26) podem ser detectados em relação à microscopia, onde apenas 50 parasitas/ μ L podem ser visualizados por um bom microscopista.⁽³¹⁾ Portanto, o diagnóstico molecular por real time demonstra ser mais eficaz que o microscópico, especialmente em situações especiais de baixa parasitemia.

As vantagens dos aparelhos de PCR em tempo real em relação à PCR convencional são com relação à rapidez da análise dos resultados, além de minimizar a possibilidade de contaminações, que é muito freqüente na *nested*-PCR.⁽¹⁸⁾ Os níveis de sensibilidade e especificidade do diagnóstico por real time PCR em relação à *nested*-PCR foram de 66% e 71% para infecções *P. vivax* e 100% e 62% para infecções por *P. falciparum*. A baixa copositividade para os dois testes, mesmo sendo ambos baseados na técnica de amplificação de DNA, pode estar relacionada ao índice mínimo de detecção diferenciado dos dois testes, sendo de 30 até 3 parasitas/μL no real time⁽²⁶⁾ e de aproximadamente 10 parasitas/μL na *nested*-PCR.⁽¹²⁾

Em experimentos realizados por Rougemont et al.⁽²¹⁾ com PCR em tempo real, houve alta sensibilidade do teste em comparação com a microscopia (detecção de seis amostras positivas que tinham resultado negativo na microscopia). Entretanto, esse ensaio não demonstrou muita eficiência para detectar infecções mistas, ilustrando a dificuldade de identificação dessas infecções por essas técnicas.

Nesse trabalho, também, foi realizado o diagnóstico molecular para a confirmação do diagnóstico microscópico de negatização do parasita na circulação sanguínea do paciente em 100 amostras após o tratamento por sete dias para malária *vivax*. Foram encontradas 20 amostras positivas pela *nested*-PCR para espécie *P. vivax*, sendo negativas para *P. falciparum*. Das 100 amostras, três haviam sido diagnosticadas como sendo infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* no diagnóstico antes do tratamento. Das três amostras mistas, apenas uma foi positiva na *nested*-PCR para *P. falciparum* depois do tratamento, sendo negativas para *P. vivax*. Todas essas amostras foram negativas pelo exame microscópico da gota espessa e não há indícios de retorno clínico após o tratamento.

Uma das estratégias para o controle da malária é a identificação rápida e precisa da infecção, que consequentemente pode levar a um tratamento mais apropriado e, quando realizado de forma correta, há uma diminuição do risco de transmissão da doença. Por esse motivo há muitas tentativas de se achar um método de diagnóstico que seja apropriado às condições específicas de cada local e modelo de estudo.^(16,28,35)

Neste estudo pode-se demonstrar que o diagnóstico para a malária tem como ferramenta complementar o uso de diagnósticos moleculares, não só na fase sintomática da doença, como, também, pode contribuir para estudos sobre a dinâmica das infecções malarígenas e com isso aumentar a precisão dos resultados de estudos epidemiológicos desenvolvidos na região Amazônica.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo, ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Claude Bernard Lyon I, na França e a gerência de malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM.

REFERÊNCIAS

1. CIVES - Centro de Informação de Saúde para viajantes/Malária. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/malaria/mal-iv.html>. Acesso em 30/06/2006.
2. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa nacional de controle da malária - PNCM. Brasília-DF, 2004.
3. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial da Saúde (OPAS/OMS). Situación de los programas de malaria en las Americas, XLIII, informe. CD38/ INF/ 2: p.1-15, 1998.
4. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. CMAJ. 2004; 170(11):1693-702. Comment in: CMAJ. 2004;171(9):1023; author reply 1023-4.
5. Häscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clin Lab Haematol. 1999;21(4):235-45.
6. Moody A. Rapid diagnostic test for malaria parasites. Clin Microbiol Rev. 2002;15(1):66-78.
7. Barker RH Jr, Suebsaeng L, Rooney W, Alecrim GC, Dourado HV, Wirth DF. Specific DNA probe for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria. Science. 1986;231(4744):1434-6.
8. Lanar DE, McLaughlin GL, Wirth DF, Barker RJ, Zolg JW, Chulay JD. Comparison of thick films, in vitro culture and DNA hybridization probes for detecting Plasmodium falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 1989; 40(1):3-6.
9. Häscheid T, Valadas E, Grobusch MP. Polymerase chain reaction for screening blood donors at risk for malaria: safe and useful? Emerg Infect Dis. 2002; 8(8):872; author reply 873-4.
10. Kimura M, Kanedo O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by *nested* PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitology International. 1997;46:91-95.
11. Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF. One year's experience with polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(5):503-8.
12. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of *nested* polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993b;61(2):315-20.
13. Tirasophon W, Rajkulchai P, Ponglikitmongkol M, Wilairat P, Boonsaeng V, Panyim S. A highly sensitive, rapid, and simple polymerase chain reaction-based method to detect human malaria (Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax) in blood samples. Am J Trop Med Hyg. 1994;51(3):308-13.
14. Ali MS, Yousif AG, Mustafa MS, Ibrahim MH. Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. Clin Lab Sci. 2005 Spring;18(2):69-73.
15. Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval JF. Contribution of PCR- based methods to diagnosis and management of imported malaria. Med Trop (Mars). 2005;65(2):176-83.
16. Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KC, Oliveira AM, Ferreira SR, Boulos M. PCR based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004;46 (4):183-7
17. Fabre R, Berry A, Morassin B, Magnaval JF. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. Parasitology. 2004;128(Pt 1):15-2.
18. Lee MA, Tan CH, Aw LT, Tang CS, Singh M, Lee SH, et al. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4343-5.
19. Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends Parasitol. 2002;18(8):337-42.
20. Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ. Comparison of blood smear, antigen detection, and *nested*-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. J Clin Microbiol. 2004;42(6):2694-700.
21. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatou K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5636-43.
22. Whitley DM, LeComec GM, Baddeley A, Savill J, Szymis MW, Mackay IM, et al. Detection and differentiation of Plasmodium species by polymerase chain reaction and colorimetric detection in blood samples of patients with suspected malaria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49(1):25-9.
23. Vieira PP, das Graças Alecrim M, da Silva LH, González-Jiménez I, Zalis MG. Analysis of the PfCRT K76T mutation in Plasmodium falciparum isolates from the Amazon region of Brazil. J Infect Dis. 2001;183(12):1832-3.
24. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaitong S, Brown KN. Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol. 1993a;58(2):283-92.

25. Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M. Development of a Plasmodium PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(1): 35-8.
26. de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S.. Simultaneous identification of the four Plasmodium DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(4):387-90.
27. Laserson KF, Petralanda I, Hamlin DM, Almera R, Fuentes M, Carrasquel A, et al. Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(2):169-80.
28. Manso MRFC. Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da malária. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, 2004.
29. Kimura M, Kaneko O, Inoue A, Ishii A, Tanabe K. Amplification by polymerase chain reaction of Plasmodium falciparum DNA from giemsa-stained thin blood smears. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;70(1-2):193-7.
30. Mayxay M, Pukitrayakamee S, Chotivanich K, Imwong M, Looareesuwan S, White NJ. Identification of cryptic coinfection with Plasmodium falciparum in patients presenting with vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(5): 588-92.
31. Warhurst DC, Williams JE. ACP Broadsheet nº 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol.* 1996;49(7):533-8.
32. Bruce MC, Donnelly CA, Packer M, Lagog M, Gibson N, Narara A, et al. Age- and species-specific duration of infection in asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitology.* 2000;121(Pt 3):247-56.
33. Nsoby SL, Parikh S, Kironde F, Lubega G, Kamya MR, Rosenthal PJ, et al. Molecular evaluation of the natural history of asymptomatic parasitemia in Ugandan children. *J Infect Dis.* 2004;189(12):2220-6.
34. Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infect Immun.* 1998;66(8):3783-7.
35. Arcanjo AR. Métodos imunocromatográficos em malária: aplicabilidade como diagnóstico em localidades rurais do Estado do Amazonas. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas. 2004.

Autor correspondente
Janayna Roriz Hipólito
Universidade do Estado do Amazonas
Escola Superior de Ciências da Saúde
Departamento de Cito-histologia
Avenida Carvalho Leal, nº 1777 – Bairro Cachoeirinha
69065-001 – Manaus, AM
e-mail: janaynar@gmail.com