ISSN 0370-369x

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

Alternativas para a eliminação da interferência negativa da bilirrubina na dosagem de creatinina por aparelhos automatizados .. 199
Joíza Lins Camargo; Maurílio Silveira do Prado; Magda Comoreto Gall; Maria Luiza Brisolara; Rosalva Maria Bauer Pereira & Elaine Ottoni Braga Barreiro
Alternatives to eliminate negative interference of bilirubin in creatinine dosaje by automatized autoanalysers

Detecção e tipagem molecular de Papilomavírus Humano (HPV) em 460 amostras de colo uterino: estudo comparativo com exames citopatológico e colposcópico 203
Nilo Ikuta; Bernadette Nonnenmacher; Luiza Lina Villa; João Carlos Prolla; André Salvador Kazantzi Fonseca; Carla Streit & Vagner Ricardo Lunge
Human Papillomavirus (HPV) detection and molecular typing from 460 cervical samples: comparative study between colposcopy and citology (Papanicolaou smears)

Meio de Cultura Líquido para pesquisa e identificação do *Mycoplasma hominis*, utilizando o Azactam no Suplemento (MHAZ) – Modificação do Meio M-42 205
Jurandi David da Silva
Liquid culture medium for research and identification of *Mycoplasma hominis*, employing Azactam as a suplement (MHAZ) – Modification of the M-42 medium

Óxido nítrico: benéfico ou prejudicial? 207
Luci Maria Sant'Ana Dusse
Nitric oxide: benefic or prejudicial?

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Araraquara (SP) - Brasil ... 210
Inneke Marie van der Heijden; Karina Ferrazzoli Devienne & Maria Stella Gonçalves Raddi
Occurence of *Listeria monocytogenes* in Araraquara (SP) - Brazil

Citologia ginecológica funcional: abordagem ao ensino na formação do farmacêutico-bioquímico 213
Linda Emiko Suzuki & Nanci Elias Cecílio Souza
Citology functional in the clinical analist formation

Prevalência de parasitoses intestinais em escolares no Município de São Joaquim, SC 215
Marcelo L. Schmitt & Marco Antonio S. Paes
Intestinal parasites prevalence in schoolars from São Joaquim, Santa Catarina, Brazil

Hepatite viral A: freqüência de positividade para anticorpos das classes IgG e IgM segundo faixa etária e trimestre sazonal (São Paulo, SP/1996) 217
Márcia F. Fukuya; Adelaide J. Vaz; Regina N. Tundisi; Patrícia S. Rodrigues; Adriana P. Lago; Andréia P. Ferreira; Charles Schimidt & Décio Diament
HAV virus: positivity frequency of anti-HAV antibodies IgG (HAV-G) and IgM (HAV-M)

Ação interferente do ácido ascórbico no doseamento da glicose sérica e urinária e do ácido úrico sérico, *"in vitro"* 220
Mestrando Élcio R. Rodrigues; Prof. Dr. Antenor Henrique Pinto Pedrazzi; João José Franco & Antonio Zanardo Filho
Ascorbic acid interference on seric and urinary glucose and uric acid seric determinations, *"in vitro"*

Título de Especialista em Análises Clínicas 223
Programa e Regulamento

Freqüência de parasitas intestinais em idosos dos núcleos da Prefeitura de João Pessoa, Estado da Paraíba 230
Cristina de Fátima Freitas Menezes de Araújo & Jucilene da Silva Correia
Intestinal parasite frequency on aged people belonging to João Pessoa, Paraiba state

4

VOLUME 29 1997

Alternativas para a eliminação da interferência negativa da bilirrubina na dosagem de creatinina por aparelhos automatizados

Joíza Lins Camargo [1 *]
Maurílio Silveira do Prado [2]
Magda Comoreto Gall [3]
Maria Luiza Brisolara [1]
Rosalva Maria Bauer Pereira [1]
Elaine Ottoni Braga Barreiro [3]

Unidade de Bioquímica e Laboratório de Emergência
Serviço de Patologia Clínica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 Largo Eduardo Zaccaro Faraco
Porto Alegre - RS - Brasil
90035-003

[1] Bioquímicas da Unidade de Bioquímica
[2] Bioquímico-Chefe do Laboratório de Emergência
[3] Bioquímicas do Laboratório de Emergência
*** Autor para correspondência**

RESUMO - A interferência negativa da bilirrubina na dosagem de creatinina pelo método de Jaffé é bem documentada. Para estudarmos esta interferência nos autoanalisadores Cobas Mira® (Roche) e Merck-Mega® (Diagnóstica Merck), ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] foi usado para oxidar a bilirrubina à biliverdina. Trinta amostras de soro, com diferentes níveis de icterícia (bilirrubina total = 6.9 ± 6.5mg/dl, média ± desvio padrão), foram analisadas para creatinina, em ambos aparelhos, antes e depois de serem tratadas (1:1) com uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ 3 mmol / L, usando o método de Jaffé automatizado. Em paralelo, $K_3Fe(CN)_6$ 3 mmol/L foi adicionado ao reagente de Jaffé (1:6.5) para ser usado no Cobas e a diluição automática ("rerun mode") de amostra sem tratamento prévio foi usada no Mega como procedimentos alternativos de eliminação da interferência. Estes procedimentos foram comparados com o procedimento de tratamento prévio da amostra com $K_3Fe(CN)_6$. Os valores de creatinina antes do tratamento variaram de 0.2 a 9.4 mg/dl e de 0.5 a 9.5 mg/dl para Cobas e Mega, respectivamente. Após tratamento, os valores variaram de 0.4 a 10.6 mg/dl, para ambos aparelhos. Houve diferença significativa entre os valores de creatinina pré e pós-tratamento ($p<0.0001$). A interferência negativa variou de 0.1 a 3.4 mg/dl no Cobas e de 0.0 a 0.8 mg/dl no Mega. O erro relativo variou de 7 a 75% e de 0 a 37% no Cobas e Mega, respectivamente. O aumento de creatinina após tratamento foi independente da concentração de bilirrubina na amostra. Quando diferentes concentrações de creatinina foram adicionadas em um "pool" de soro e amostras foram tratadas previamente com $K_3Fe(CN)_6$, aproximadamente 95% de recuperação foi alcançado. Valores de creatinina obtidos com $K_3Fe(CN)_6$ adicionado ao reativo de Jaffé do Cobas e amostras dosadas em "rerun mode" no Mega mostraram excelente correlação e concordância com os resultados obtidos com amostras pré-tratadas dosadas em ambos aparelhos ($r=0.97$ e $r=0.99$, $p<0.0001$). Nós sugerimos que amostras ictéricas sejam dosadas com $K_3Fe(CN)_6$ adicionado ao reativo de Jaffé no Cobas e em "rerun mode" sem tratamento prévio no Mega para eliminar a interferência negativa da bilirrubina.

PALAVRAS CHAVES - Comparação de métodos, reação de Jaffé, interferências, creatinina

SUMMARY - The negative interference of bilirubin on estimation of creatinine by the Jaffé method has been very well documented. To study this interference in a Cobas Mira® (Roche) and a Merck-Mega ®(Diagnostic Merck) autoanalysers, we used potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] to oxide bilirubin to biliverdin. Creatinine was determined in thirty samples, with different degree of jaundice (total bilirubin = 6.9 ± 6.5 mg/dl), in both machines, before and after treatment with a 3mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ solution (1:1), by the Jaffé method. We also tested the effect of addition of $K_3Fe(CN)_6$ (1:6.5) to Jaffé reagent (Cobas) and the "rerun mode" without previous treatment (Mega) as alternative procedures to eliminate interfering substances. These procedures were compared with the method using previous treatment. Before treatment, values for creatinine ranged from 0.2 to 9.4 mg/dl and from 0.5 to 9.5 mg/dl for Cobas and Mega, respectively. After treatment , the values ranged from 0.4 to 10.6 mg/dl, for both machines. There was a significative difference between creatinine values before and after treatment. The negative interference ranged from 0.1 to 3.4 in Cobas and from 0.0 to 0.8 mg/dl in Mega. The relative bias ranged from 7 to 75% and from 0 to 37% in Cobas and Mega, respectively. The increase in creatinine concentration after treatment was bilirubin concentration independent. When different concentrations of creatinine were added to a pooled sera and samples were previously treated with $K_3Fe(CN)_6$, approximately 95% of recovery was obtained. Creatinine values obtained with Jaffe reagent treated with $K_3Fe(CN)_6$ and "rerun" mode showed excellent correlation and agreement with values obtained with pre-treated samples, in both autoanalysers ($r=0.97$ and $r=0.99$, $p< 0.0001$). We suggested that jaundiced samples should be measured with Jaffé reagent treated with $K_3Fe(CN)_6$ in the Cobas Mira and in "rerun mode" without treatment in the Merck-Mega to eliminate the negative interference of bilirubin.

KEY WORDS - Jaffé reaction, analytical comparison, interference evaluation, creatinine

INTRODUÇÃO

O reagente alcalino de picrato de sódio tem sido o mais usado para determinação de creatinina em laboratórios clínicos desde que a reação de Jaffé foi descrita em 1886 [5]. A creatinina reage com o picrato alcalino para formar um complexo eqüimolar laranja-avermelhado que é medido e quantificado a 500 nm [6,10]. A carência de especificidade do método de Jaffé é bem documentada e interferentes como acetoacetato e glicose foram relatados pelo próprio Jaffé quando a reação foi descrita. De fato, muitos compostos oxidoredutivos presentes no soro reagem com o picrato alcalino para reduzir ou aumentar a concentração aparente de creatinina [6,12].

Interferências positivas podem ocorrer devido a lenta redução do picrato alcalino a picramato por compostos como glicose, acido úrico e ascorbato ou devido a reação do picrato com substâncias como acetoacetato, cetoácidos, e piruvato que forma complexos corados. A interferência negativa mais conhecida é aquela causada pela presença de altas concentrações de bilirrubina. Em base forte, a bilirrubina é oxidada a um composto cromógeno com uma concomitante redução em absorbância na região de 500nm, diminuindo assim, a absorbância total medida na reação de Jaffé, levando a uma concentração falsamente diminuída de creatinina [6-8,12].

Durante os últimos 100 anos, muitas medidas têm sido usadas para eliminar as interferências e aumentar a especificidade da reação de Jaffé. Adsorção da creatinina, oxidação ou extração de interferentes, diálise e medida cinética da reação em diferentes condições já foram propostas [9,11,12].

De todas as alternativas, o ensaio automatizado, cinético ou de ponto final com múltiplas leituras, é o mais usado e aceito entre os laboratórios

clínicos [6,10,12]. O método é facilmente automatizado, permite o uso de pequenas quantidades de amostra e reagente, e dispensa desproteinização [3]. A formação do complexo corado picrato-creatinina começa a ser monitorizada após 10-60 segundos da adição dos reagentes. Esse tempo de espera permite que os interferentes que reagem rápido, como acetoacetato, sejam efetivamente eliminados antes da leitura da absorbância inicial da reação. A monitorização total varia de 16 a 120 segundos e reduz substancialmente, mas não elimina totalmente, as interferências positivas. A interferência negativa causada pela bilirrubina ainda é a maior fonte de erro na determinação de creatinina por métodos automatizados [3,7-9].

Os objetivos deste estudo foram determinar o grau de interferência da bilirrubina na determinação de creatinina usando o reagente de Jaffé e propor um procedimento rápido e eficiente para determinar a verdadeira concentração de creatinina em soros ictéricos usando os aparelhos Cobas Mira® (Roche) e Merck-Mega® (Diagnóstica Merck).

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta amostras de soro, com diferentes níveis de icterícia, foram selecionadas da rotina do nosso laboratório e analisadas para creatinina usando o método colorimétrico de Jaffé de ponto final com monitoramento contínuo ("kit" Diagnóstica Merck), sem desproteinização, em um Cobas Mira® e um Merck-Mega®. Bilirrubina total e direta foram determinadas no Merck-Mega® ("kit" Diagnóstica Merck). Em paralelo, alíquotas de 1ml das mesmas amostras foram tratadas (1:1) com uma solução de ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] 3 mmol/L, para eliminação da bilirrubina por oxidação [9]. Após homogeneização e espera de 5 minutos, as amostras foram re-analisadas para creatinina e bilirrubina, como acima mencionado, levando-se em consideração o fator de diluição. A eficiência da oxidação foi testada comparando-se os resultados de bilirrubina antes e depois do tratamento das amostras com $K_3Fe(CN)_6$.

Como métodos alternativos para eliminação da interferência da bilirrubina, $K_3Fe(CN)_6$ 3 mmol/L foi adicionado ao reagente de Jaffé de trabalho no Cobas Mira® em uma proporção 1:6.5 e a determinação da creatinina foi feita usando a diluição automática ("rerun mode") da amostra, sem nenhum tratamento, no Merck-Mega®. Sessenta amostras de soro foram analisadas pelo método alternativo no Cobas Mira®,e 23 pelo método alternativo no Merck-Mega®. Resultados de creatinina obtidos pelos dois métodos alternativos foram comparados com o método de tratamento prévio da amostra descrito por O'Leary & colaboradores [9] em ambos aparelhos.

Para estudarmos a recuperação da creatinina na presença de $K_3Fe(CN)_6$, diferentes concentrações de creatinina (Merck) foram adicionadas em um “pool” de soro. Amostras foram analisadas para creatinina usando o método de tratamento prévio nos dois autoanalisadores e o método alternativo no Cobas Mira®.

As diferenças entre os resultados, obtidos pelos diferentes métodos e aparelhos, foram analisadas através do teste t de Student para amostras pareadas. O coeficiente de Pearson foi empregado para avaliar a existência de correlação quando necessário. O nível de significância adotado foi de 5%.

A comparação entre os métodos alternativos e o método de tratamento prévio da amostra foi analisada pela medida da concordância [1,2]. A presença ou ausência de concordância é sumarizada pelos 95% de limites de concordância (média das diferenças entre os dois métodos comparados $\pm$ 2 desvios padrões [DP]). A maioria das diferenças estará entre média $\pm$ 2DP. Dois métodos são considerados em concordância quando as diferenças entre os 95% dos limites de concordância não são clinicamente importantes. Desta forma, resultados obtidos pelos dois métodos não são significativamente diferentes.

RESULTADOS

A Tabela 1 resume os resultados de bilirrubina, creatinina obtida antes e depois do tratamento com $K_3Fe(CN)_6$, e a interferência negativa encontrada para as 30 amostras ictéricas analisadas neste estudo.

A bilirrubina total foi de 6.9 ± 6.5 mg/dl (média ± desvio padrão [DP]). Os valores de creatinina variaram de 0.2 a 9.4mg/dl e 0.5 a 9.5 mg/dl para Cobas Mira® e Merck-Mega®, respectivamente, quando as amostras foram analisadas sem tratamento prévio. Depois do tratamento com $K_3Fe(CN)_6$, os valores de creatinina revelaram um aumento significativo quando comparados com os valores obtidos com amostras sem tratamento ($p<0.0001$), e variaram de 0.4 a 10.6 mg/dl para ambos aparelhos. O aumento em concentração de creatinina variou de 0.1 a 3.4 mg/dl no Cobas Mira® e de 0.0 a 0.8 mg/dl no Merck-Mega® e mostrou-se independente da concentração de bilirrubina presente na amostra. Não houve diferença significativa entre os resultados de creatinina após tratamento obtidos pelo dois aparelhos. A interferência representou um erro relativo de 7 a 75% e de 0 a 37% no Cobas Mira® e Merck-Mega®, respectivamente. A oxidação pelo $K_3Fe(CN)_6$ foi considerada efetiva quando os valores de bilirrubina total nas amostras tratadas foram ≤ 1.2 mg/dl.

Quando creatinina, em diferentes concentrações, foi adicionada a um pool de soro, uma recuperação analítica de 95.3 ± 8.2% foi observada para o método de Jaffé sem tratamento prévio de amostras nos dois aparelhos. Para o método usando tratamento prévio das amostras com $K_3Fe(CN)_6$, a recuperação foi de 94.3 ± 5.8%, para ambos aparelhos. Para o método usando $K_3Fe(CN)_6$ incorporado ao reativo de uso, uma recuperação de 97.0 ± 2.3% foi encontrada (Tabela 2).

Sessenta amostras de soro foram dosadas para creatinina com $K_3Fe(CN)_6$ adicionado ao reativo de Jaffé e , em paralelo, pelo método de tratamento prévio das amostras no Cobas Mira®. Os resultados entre estes dois procedimentos mostraram excelente correlação ($r=0.97$, $p< 0.0001$, Figura 1) e concordância (Figura 2). Os 95% limites de concordância ficaram entre -0.06 $\pm$ 0.26 mg/dl. O reativo adicionado de $K_3Fe(CN)_6$ mostrou-se estável até 5 horas após preparação.

Da mesma forma, 23 amostras de soro foram dosadas em “rerun mode” sem tratamento prévio e pelo método de tratamento prévio das amostras no Merck-Mega®.Os resultados obtidos pelos diferentes métodos, também apresentaram excelente correlação ($r= 0.99$, $p<0.0001$, Figura 1) e concordância (Figura 2). O intervalo dos 95% de limites de concordância foi -0.16 $\pm$ 0.42 mg/dl.

DISCUSSÃO

As vantagens da reação automatizada de Jaffé incluem pequenos volumes de amostra, uso de amostras sem desproteinização e velocidade de análise. A maior desvantagem é a interferência negativa causada pela presença de altas concentrações de bilirrubina. Este estudo confirmou a presença dessa interferência, e está em concordância com prévios estudos [3,4,9,11] que relataram uma diminuição da concentração de creatinina em soros ictéricos usando diferentes aparelhos de automação.

A interferência mostrou-se menor no Merck-Mega® que no Cobas Mira®, isso é devido, provavelmente, ao uso de reagentes separados no Merck-Mega®. Existem trabalhos relatando que a ordem de adição dos reagentes pode afetar as leituras durante a reação de Jaffé, amenizando assim as interferências [3]. As diferenças entre a interferência vista nos dois aparelhos não podem ser atribuídas a diferenças na composição dos reagentes [3,12], já que o reagente do Merck-Mega® (picrato de lítio e NaOH) foi usado no Cobas Mira®, seguindo as orientações do próprio fornecedor, e não houve alterações nos resultados obtidos.

Esse estudo não demonstrou relação entre a concentração de bilirrubina e a magnitude da interferência. Isso pode ser atribuído ao fato de que a maioria das amostras continham uma concentração de bilirrubina < 10 mg/dl. Estudos anteriores mostraram que a interferência foi dependente da concentração de bilirrubina quando concentrações muito altas de bilirrubina estavam presentes na amostra [3,4]. Nesse estudo, apenas 7 amostras apresentaram uma concentração de bilirrubina > que 10 mg/dl e só uma

amostra apresentou bilirrubina acima de 30.0 mg/dl. Quando todas as amostras foram consideradas, uma moderada, embora significativa, correlação (r= 0.68 e r= 0.52, para Cobas e Mega, respectivamente) foi encontrada. Re-analisando os dados, desconsiderando a única amostra com bilirrubina > 30 mg/dl, a correlação praticamente inexiste (r=0.21e r=0.19, p>0.1, para Cobas e Mega, respectivamente). Devido a essas observações, nós concluímos que os dados, aqui apresentados, são insuficientes para determinar a relação entre a concentração de bilirrubina e interferência. Há necessidade de se incluir, em estudo posterior, mais amostras com concentrações de bilirrubina > 10 mg/dl.

Em geral, a interferência negativa da bilirrubina na determinação da creatinina não parece ser clinicamente relevante, mas em pacientes muito ictéricos e com uma concentração de creatinina normal ou levemente aumentada, uma falsa diminuição da creatinina pode resultar em um problema de diagnóstico. Considerando os pequenos coeficientes de variações (CV) interensaio apresentados pelas técnicas automatizadas (neste estudo o CV interensaio foi < 3%), pequenas variações nos resultados se tornam relevantes. Esses fatos se tornam extremamente importantes quando pacientes recém-nascidos ictéricos, hemodialisados ou transplantados renais estão envolvidos. Nessas situações, pequenas flutuações na concentração de creatinina exigem mudanças na conduta médica, e no caso dos transplantados renais, pode indicar rejeição. Devido a esses eventuais pacientes, nós sugerimos que a interferência negativa da bilirrubina na determinação da creatinina seja eliminada.

Os métodos alternativos, neste estudo, mostraram-se eficientes em eliminar a interferência da bilirrubina, como mostra a concordância com o

método de tratamento prévio da amostra proposto por O'Leary & colaboradores [9]. Eles são baratos, rápidos e fáceis de fazer, não exigindo passos adicionais como centrifugação ou incubação, e são capazes de fornecer resultados de creatinina que se aproximam do verdadeiro.

Nós sugerimos que a creatinina, de amostras visualmente ictéricas, sejam dosadas com $K_3Fe(CN)_6$ incorporado ao reativo de uso no Cobas Mira® e em "rerun mode" sem tratamento prévio no Merck-Mega® para eliminar a interferência negativa da bilirrubina na reação de Jaffé.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Carmen Pilla pelo imenso incentivo e auxílio na elaboração de todas as etapas deste trabalho; ao Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pelos comentários e assessoramento científico; aos colegas da Unidade de Bioquímica e do Laboratório de Emergência do HCPA pela ajuda na obtenção de amostras e resultados utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Altman, D.G.** Practical Statistics for Medical Research. London, Chapman & Hall, 1991; p. 396-403.
2. **Bland, J.M. & Altman, D.G.** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. The Lancet i:307-310, 1986.
3. **Bowers, L.D. & Wong, E.T.** Kinetic serum creatinine assays.II. A critical evaluation and review. Clin Chem 26(5):555-561, 1980.
4. **Guy, J.M. & Legg, E.F.** Bilirrubin interference in determinations of creatinine with the Hitachi 737 Analyzer. Clin Chem 36(10):1851-1852, 1990.
5. **Jaffé, M.** Ueber den niederschlag welchen pikrinsäure in normalen harn erzeugt und über eine neue reaktion des kreatinins. Z Physiol Chem 10:391-400, 1886.
6. **Kaplan, L.A. & Pesce, A.J.** Clinical Chemistry: Theory, analysis and correlations. 2nd ed. St Louis, C.V. Cosby Co. 1990; p. 1247-1253.
7. **Kenny, D.** A study of interferences in routine methods for creatinine measurement. Scand J Clin Lab Invest 53(suppl 212):43-47, 1993.
8. **Narayanan, S. & Appleton, H.D.** Creatinine: a review. Clin Chem 26(8):1119-1126, 1980.
9. **O'Leary, N.; Pembroke, A., & Duggan, P.F.** A simplified procedure for eliminating the negative interference of bilirrubin in the Jaffé reaction for creatinine. Clin Chem 38(9):1749-1751, 1992.

10. **Perrone, R.D.; Madias, N.E., & Levey, A.S.** Serum creatinine as an index of renal function: New insigths into old concepts. Clin Chem 38(10):1933-1953, 1992.

11. **Rajs, G. & Mayer, M.** Oxidation markedly reduces bilirrubin interference in the Jaffé creatinine assay. Clin Chem 38(12):2411-2413, 1992.

12. **Spencer, K.** Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. Ann Clin Biochem 23:1-25, 1986.

Tabela 1
Resultados de bilirrubina, creatinina antes e depois do tratamento com [$K_3Fe(CN)_6$], e interferência nos autoanalisadores Cobas Mira® e Merck-Mega®.

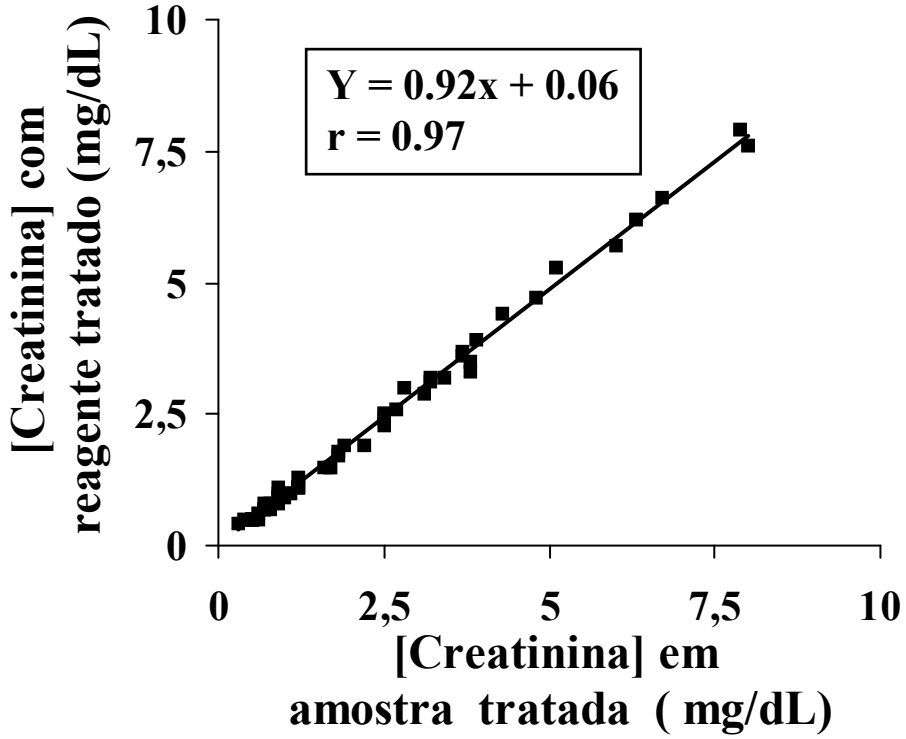
Paciente	Bilirrubina Total (mg/dl)	Cobas Mira®				Merck Mega®			
		Creatinina antes do tratamento (mg/dl)	Creatinina após tratamento (mg/dl)	Interferência (mg/dl)	Erro (%)	Creatinina antes do tratamento (mg/dl)	Creatinina após tratamento (mg/dl)	Interferência (mg/dl)	Erro (%)
1	32.9	1.8	5.2	3.4	65.4	4.2	5.0	0.8	16.0
2	7.2	2.5	4.2	1.7	40.5	3.8	4.0	0.2	5.0
3	2.8	0.3	0.6	0.3	50.0	0.5	0.6	0.1	16.7
4	10.3	1.9	3.0	1.1	36.7	2.6	3.0	0.3	10.0
5	2.2	0.9	1.2	0.3	25.0	0.9	1.0	0.1	10.0
6	1.7	2.0	2.2	0.2	9.1	1.8	2.0	0.2	10.0
7	1.9	1.8	2.0	0.2	10.0	1.7	2.0	0.3	15.0
8	18.1	1.6	2.0	0.4	20.0	1.7	2.0	0.3	15.0
9	5.6	3.9	4.2	0.3	7.1	3.8	4.2	0.4	9.5
10	5.7	1.8	2.6	0.8	30.8	2.1	2.4	0.3	12.5
11	2.6	0.8	1.0	0.2	20.0	0.8	1.0	0.2	20.0
12	3.8	0.5	1.0	0.5	50.0	0.6	0.8	0.2	25.0
13	15.7	0.3	0.4	0.1	25.0	0.5	0.8	0.3	37.5
14	5.4	0.8	1.2	0.4	33.3	1.0	1.2	0.2	16.7
15	12.1	0.3	1.2	0.9	75.0	0.9	1.2	0.3	25.0
16	12.7	0.2	0.6	0.4	66.7	0.5	0.8	0.3	37.5
17	7.0	2.5	3.4	0.9	26.5	2.7	3.2	0.5	15.6
18	6.9	1.7	2.0	0.3	15.0	1.8	2.0	0.2	10.0
19	5.5	1.1	1.2	0.1	8.3	1.1	1.2	0.1	8.3
20	3.0	0.9	1.2	0.3	25.0	0.9	1.2	0.3	25.0
21	5.6	0.3	0.6	0.3	50.0	0.6	0.6	0.0	00.0
22	2.5	1.1	1.4	0.3	21.4	1.3	1.4	0.1	7.1
23	2.1	2.0	2.6	0.6	23.1	2.1	2.4	0.6	12.5
24	2.7	0.7	1.0	0.3	30.0	0.9	1.0	0.3	10.0
25	6.0	0.3	0.6	0.3	50.0	0.5	0.6	0.3	16.7
26	12.1	6.3	7.0	0.7	10.0	6.5	7.0	0.7	7.1
27	5.3	1.8	2.4	0.6	25.0	2.2	2.6	0.6	15.4
28	2.5	9.4	10.6	1.2	11.3	9.5	10.2	1.2	6.9
29	3.2	0.8	1.0	0.2	20.0	0.8	1.2	0.2	33.3
30	1.8	3.9	4.4	0.5	11.4	4.1	4.4	0.5	6.8

Tabela 2
Teste de recuperação analítica da creatinina usando $K_3Fe(CN)_6$ incorporado ao reativo no Cobas Mira®.

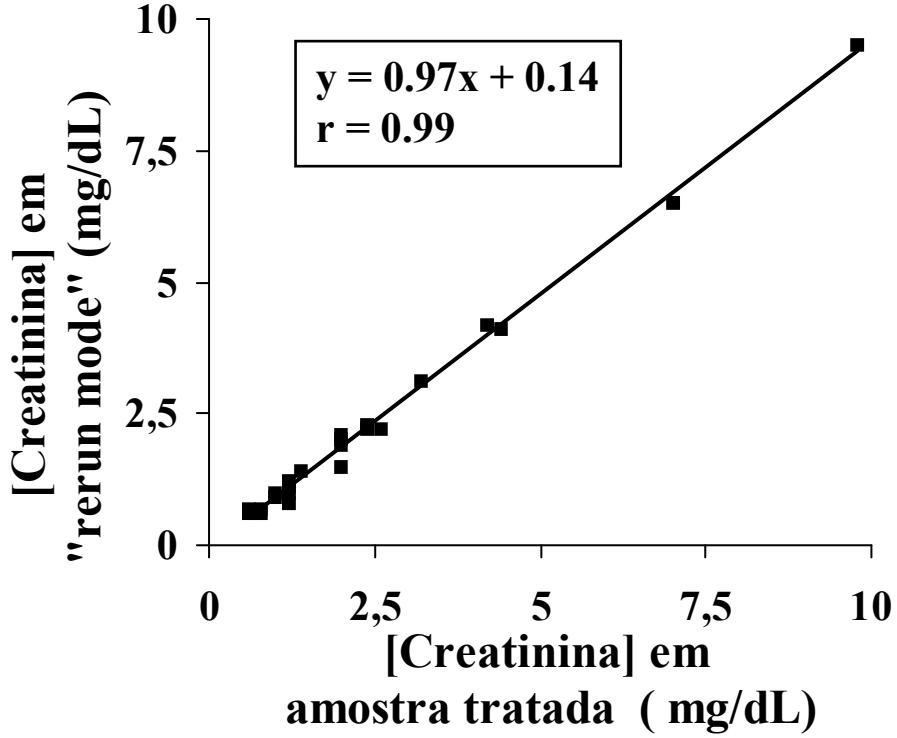
Creatinina Adicionada (mg/dl)	Creatinina Medida (mg/dl)	Creatinina Recuperada (mg/dl)	Recuperação (%)
-	1.5	-	-
1.25	2.7	1.2	98.2
7.5	8.6	7.1	95.6
10	10.8	9.3	93.9
15	16.5	15.0	100.0
20	20.6	19.1	95.8
30	31.1	29.6	98.73

FIGURA 1: Correlação entre os métodos alternativos e o método de tratamento prévio da amostra, **A) COBAS MIRA e B) MEGA**

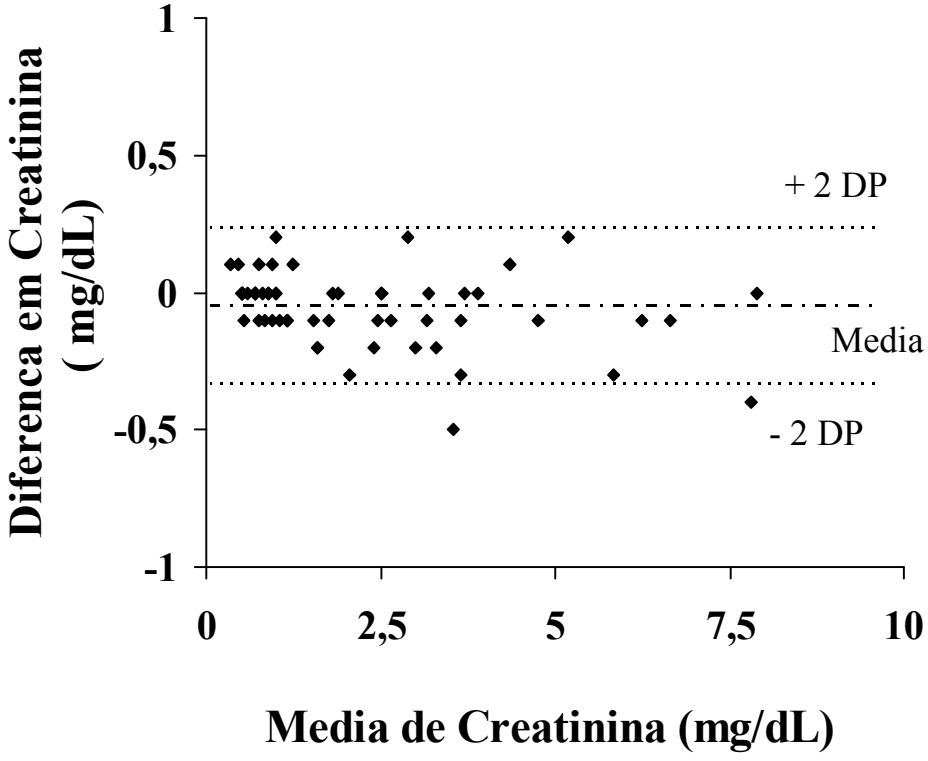
FIGURA 2: Concordância entre os métodos alternativos e o método de tratamento prévio da amostra, **A) COBAS MIRA e B) MEGA**


Y = 0.92x + 0.06
r = 0.97
[Creatinina] com reagente tratado (mg/dL)
[Creatinina] em amostra tratada (mg/dL)
0
2,5
5
7,5
10

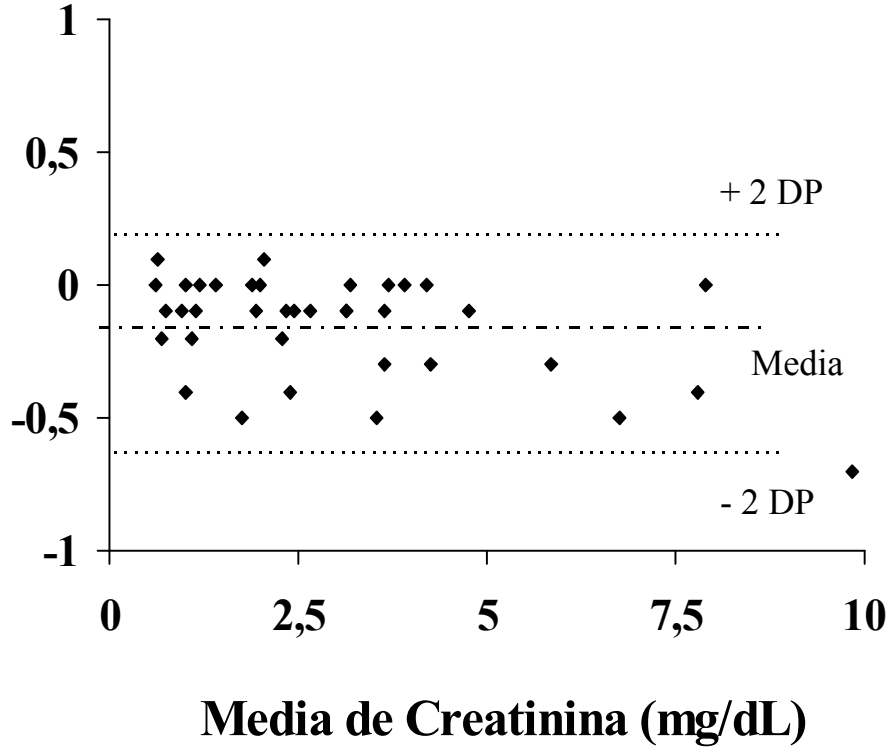
A)


y = 0.97x + 0.14
r = 0.99
[Creatinina] em "rerun mode" (mg/dL)
[Creatinina] em amostra tratada (mg/dL)
0
2,5
5
7,5
10

B)


Diferenca em Creatinina
(mg/dL)
1
0,5
0
-0,5
-1
+ 2 DP
Media
- 2 DP
0
2,5
5
7,5
10
Media de Creatinina (mg/dL)

A)


1
0,5
0
-0,5
-1
+ 2 DP
Media
- 2 DP
0
2,5
5
7,5
10
Media de Creatinina (mg/dL)

B)

CITOLOGIA GINECOLÓGICA FUNCIONAL: ABORDAGEM AO ENSINO NA FORMAÇÃO DO FARMACÊUTICO BIOQUÍMICO[1]

GYNECOALOGIC FUNCIONAL CYTOLOGY IN THE CLINICAL ANALIST FORMATION

Linda Emiko SUZUKI[2]

Nanci Elias Cecílio e SOUZA[3]

---

[1] Parte do projeto de ensino 'Acompanhamento e avaliação do ciclo menstrual: análise citológica'.

[2] Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

[3] Professora colaboradora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

RESUMO: Com o objetivo de promover a qualidade de ensino da Citologia Clínica, notadamente a sua abordagem funcional, o presente trabalho buscou o adestramento técnico e o confronto do estudante com a realidade prática do cotidiano profissional. A obtenção de material didático às aulas do curso de Farmácia - Bioquímica também foi um dos objetivos atingidos.

Unitermos: citologia funcional; formação farmacêutico bioquímico.

SUMMARY: To learn Cytology with quality on endocrinological focus, the objective of this paper was to train the students about cytologics techniques used and to evaluate the values normally found in the human menstrual cycle. This study resulted in didactical materials to Citologia Clínica sector of Farmacia-Bioquimica course.

Key words: funcional citology; formation in clinical analist.

INTRODUÇÃO

Tendo em vista o Decreto nº 85.878 de 07/04/81 que estabelece normas sobre o exercício da profissão farmacêutica e a Resolução nº179 do Conselho Federal de Farmácia de 18/03/87 que ratifica a competência legal do farmacêutico executar exames de Citologia Esfoliativa: Oncótica e Hormonal bem como a Resolução nº 296/96 de 25/07/96 do mesmo conselho que normatiza o exercício das Análises Clínicas pelo farmacêutico-bioquímico.

A Universidade como órgão formador destes profissionais deve buscar sempre a qualidade do ensino para que os farmacêuticos como profissionais de saúde possam exercer plenamante o seu direito bem como as suas responsabilidades perante a população. Este trabalho teve como objetivo a busca de treinamento especializado dos acadêmicos em Citologia Hormonal e também obter material didático para aulas práticas de Citologia Clínica.

As alterações cíclicas da função ovariana ocorrem mensalmente, com variação da secreção dos hormônios femininos e da estrutura do revestimento interno do útero; em seu conjunto, essas variações constituem o ciclo sexual feminino (Guyton,1988).

O epitélio da vagina sofre uma série de modificações cíclicas, dependentes fundamentalmente da secreção hormonal ovárica(Ayala & Ortiz,1978). Como esse epitélio apresenta uma descamação fisiológica de suas células, a coleta do material vaginal, sua coloração e a sua avaliação microscópica permitirão fazer uma avaliação indireta do estudo da função ovárica.

Lencione (1971), faz referências quanto a determinação do grau de atividade estrogênica através de esfregaços vaginais aplicáveis nos casos de precocidades sexuais em

crianças e nos transtornos menstruais em que estão envolvidas a disfunção ovárica e a sua utilidade no diagnóstico da ovulação ressaltando a sua facilidade e o baixo custo comparados aos demais métodos analíticos. Salienta ainda a sua utilidade nos casos em que uma vez determinada a existência de insuficiência ovárica, a possibilidade de uma indicação terapêutica racional

Tendo em vista estes conhecimentos, o ensino da citologia hormonal torna-se dificultoso na medida em que há necessidade de coletas sequenciais ressaltadas por Ayala & Ortiz (1978) para a avaliação correta do ciclo. Ressalte-se ainda que não existe material didático disponível no mercado.

A dificuldade em se obter material didático para a utilização em aulas práticas bem como a posterior confecção de slides com o material obtido e ainda proporcionar treinamento e vivência de casos reais aos acadêmicos do curso de Farmácia - Bioquímica foram motivos suficientes para a existência do projeto.

MATERIAL E MÉTODO

As pacientes interessadas e doadoras colheram o material vaginal às cegas com swab esterilizado, confeccionando geralmente três esfregaços de cada amostra.

O material obtido foi imediatamente fixado em álcool comercial a 95%. A fixação foi de dez minutos a uma semana.

A coloração utilizada foi a de Papanicolaou segundo Takahashi (1982).

A montagem da lâmina permanente foi feita com enterllam.

Foi realizada a leitura sob microscopia ótica a seco em aumento 25X e 40X.

O resultado foi expresso em Índice de Eosinofilia, Índice de Picnose e Índice de Maturação (Takahashi, 1982), e ainda foram realizadas a avaliação semi-quantitativa da quantidade do material, leucócitos, hemácias e flora bacteriana como forma de treinamento de leitura.

Com os índices encontrados foi confeccionado o respectivo gráfico e realizada a discussão do caso à luz dos dados clínicos da paciente.

A primeira amostra foi colhida no quinto dia do ciclo, sabendo-se que o primeiro dia da menstruação é o primeiro dia do ciclo. As amostras seguintes foram colhidas geralmente a intervalos de cinco dias até o término do ciclo que acontece com a próxima menstruação conforme Ayala & Ortiz (1978).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Pela natureza do trabalho, de acompanhamento longo, observou-se a dificuldade de se trabalhar tanto com alunos quanto com doadoras resultando em grande índice de desistência. Em relação aos acadêmicos, houve um grande interesse inicial em aderir ao projeto, e muitos destes se inscreveram, porém, houve um índice razoável de desistência. Dos trinta e dois inscritos desistiram doze (37%). Participaram do projeto vinte acadêmicos (dezoito do curso de Farmácia e dois do curso de Medicina). Dois acadêmicos foram agraciados pela Bolsa Ensino. Na análise da desistência observou-se que o motivo principal foi econômico. Existem na universidade outras bolsas como PET, Iniciação Científica, Bolsa Extensão, Monitoria que têm tido a preferência dos alunos em relação às atividades voluntárias.

Tiveram interesse em doar o material, sessenta e quatro mulheres no menacme das quais onze desistiram. Das cincoenta e três doadoras que participaram do projeto, obteve-se trinta ciclos completos. O material de quatro mulheres foi desprezado e não foram concluídos os ciclos de oito doadoras. Tendo em vista que de cada coleta confeccionou-se três esfregaços, deveríamos obter três ciclos completos, porém isso não ocorreu na prática desde que o padrão três esfregaços por amostra não foi respeitado e nem todas as amostras foram aproveitadas. A causa principal do não aproveitamento foi a insuficiência de material, além de má fixação provocando em consequência, uma má coloração resultando em inutilização do ciclo. Porém, pode-se considerar como saldo positivo a obtenção de material didático os trinta e sete ciclos completos inclusive com gabarito (leitura das

lâminas e o gráfico) e os vinte e nove ciclos que estão prontos e poderão ser utilizados para a reposição de material em casos de quebra de lâminas.

Além de tudo vale ressaltar a possibilidade do acadêmico ter contato com as doadoras na obtenção dos dados clínicos (anexo 1)pois estas poderão ser as possíveis pacientes no futuro, exercitando assim o perfil do profissional analista clínico.

Dos trinta e sete ciclos obtidos observou-se quanto ao trofismo, dezessete curvas normotróficas, dezoito hipotróficas e duas hipertróficas. Trinta curvas foram do tipo cíclico e sete acíclico. Em relação a ocorrência de ovulação, obteve-se treze curvas ovulatórias (gráfico 1), quatorze não ovulatórias (gráfico 2), duas provavelmente ovulatórias e oito doadoras faziam uso de anticoncepcional hormonal (gráfico 3). Houve dois casos de ovários policísticos e um caso com suspeita de insuficiência luteínica.

Carvalho (1988) é criterioso ao descrever as várias fases do ciclo e relata "o diagnóstico da atividade hormonal por meio de estendidos citológicos e a respectiva identificação das diversas fases do ciclo vaginal normal é hoje assunto que suscita pouquíssimas objeções. Embora não seja possível ainda fornecer uma análise quantitativa das diversas nuances hormonais, as informações qualitativas proporcionadas pelos estendidos, colhidos periodicamente, são de tal utilidade que nenhum ginecologista minucioso dispensará uma colheita de material vaginal a fim de estabelecer uma avaliação acurada do estado hormonal de sua paciente por intermédio das variações celulares".

BIBLIOGRAFIA

AYALA,M.J. & Ortiz,F.N. *Citologia Ginecológica*. Vol I. SãoPaulo. 1978. Artes Médicas.

CARVALHO.G. *Citologia do trato genital feminino*. 2ª ed. Rio de Janeiro. 1988.Atheneo.

GUYTON,A.C. *Fisiologia humana*. 6ª ed. Rio de Janeiro. 1984. Guanabara Koogan.

LENCIONE,L.J. *El colpocitograma.*1ª ed. Buenos Aires. 1971. Panamericana.

TAKAHASHI,M. *Atlas colorido de citologia do câncer*. 2ª ed. São Paulo.1982. Manole.

Anexo 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
DISCIPLINA : CITOLOGIA CLÍNICA

Paciente : Registro :
Endereço : Fone :
Idade : Estado civil :
Data da última menstruação : Tipo de ciclo :
Leucorréia : Coceira : Sangramento :
Está grávida? Está amamentando?
Medicação : Anticoncepcional :

RESULTADO

Data da coleta								
Dia do ciclo								
C.S.E.								
C.S.C.								
C.I.								
C.P.								
Q. de Células								
Agrupamento								
Pregueadura								
Muco								
Leucócitos								
Hemácias								
Flora Bact.								
I. Picnótico								
I. Eosinófilo								
I. Maturação								

Observações :

_____
Responsável

Gráfico 1. Caso 25X. Curva Normotrófica Cíclica Ovulatória.

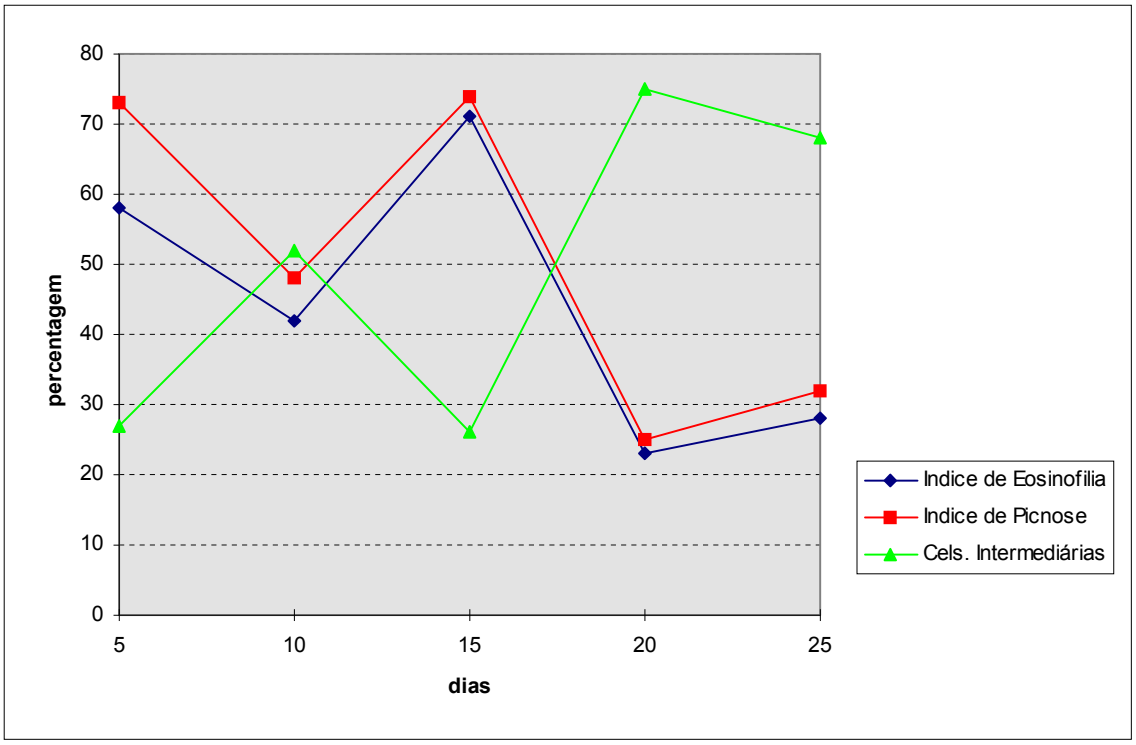


Gráfico 2. Caso 43X.Curva Hipotrófica Acíclica (não ovulatória).

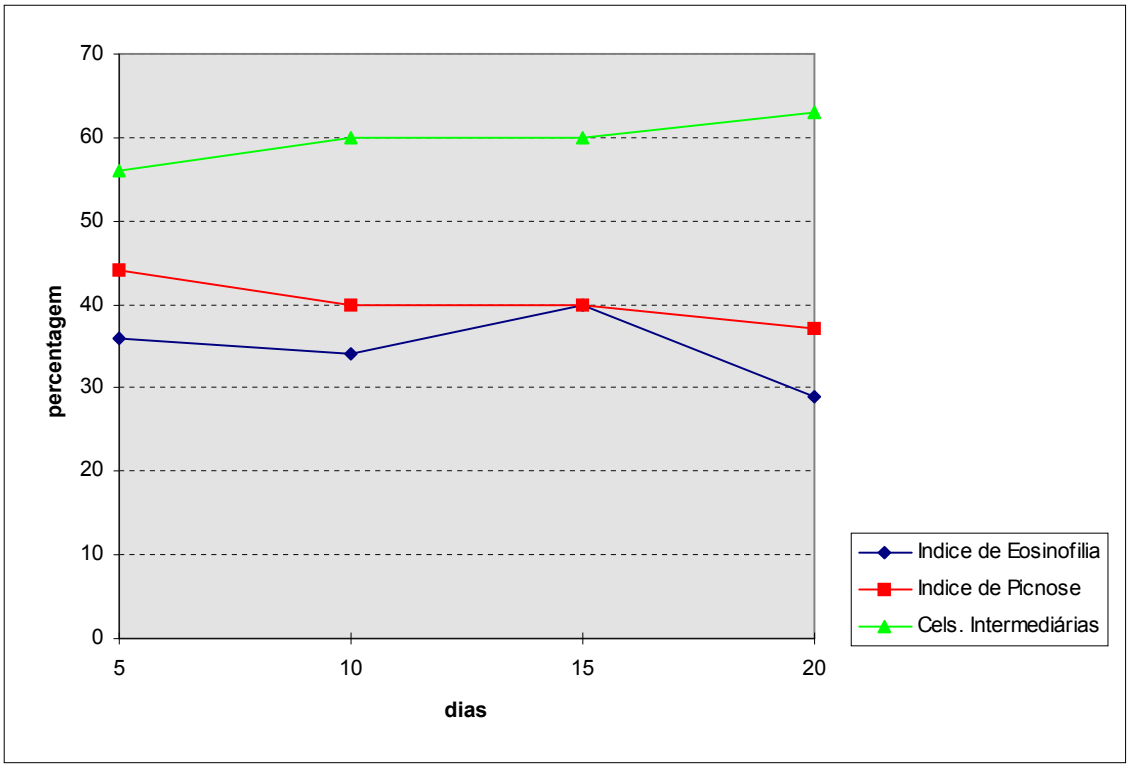
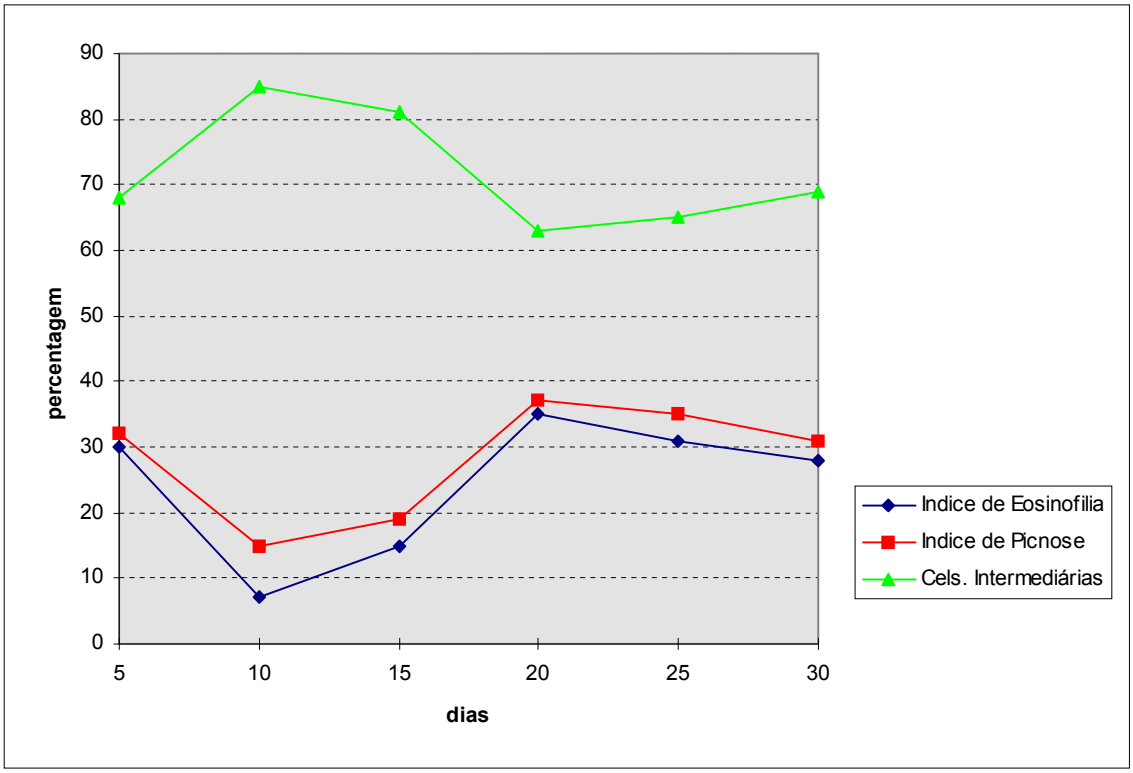


Gráfico 3. Caso 27X. Curva Hipotrófica cíclica(uso de ACHO)



DETECÇÃO E TIPAGEM MOLECULAR DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (*HPV*) EM 460 AMOSTRAS DE COLO UTERINO: ESTUDO COMPARATIVO COM EXAMES CITOPATOLÓGICO E COLPOSCÓPICO

Nilo Ikuta, Bernadette Nonnenmacher**, Luiza Lina Villa***,* João Carlos Prolla****, *André Salvador Kazantzi Fonseca*, Carla Streit* e Vagner Ricardo Lunge*.*

* Pesquisadores da SIMBIOS Biotecnologia - Centro de Biotecnologia/UFRGS

** Aluna de doutorado do CPG em Clínica Médica /UFRGS

*** Pesquisadora do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

**** Pesquisador Hospital das Clínicas/UFRGS

endereço para correspondência - André S. K. Fonseca, Caixa Postal CP 15092, CEP 91501-970. Porto Alegre/RS.

SINOPSE

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de amplificação enzimática de seqüências específicas de ácidos nucleicos. Essa técnica tem sido amplamente descrita para detecção e tipagem do Papilomavírus Humano (HPV - *Human Papillomavirus*). Neste trabalho, 460 amostras de colo uterino foram avaliadas para a presença do DNA do HPV pela técnica de PCR. Amostras positivas foram subseqüentemente tipadas por RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*). Os resultados de PCR-RFLP foram comparados com os exames colposcópico e citopatológico (Papanicolaou). O PCR-RFLP demonstrou ser uma técnica eficaz na detecção e tipagem virais, apresentando maior sensibilidade do que os exames citopatológico e colposcópico.

UNITERMOS: HPV, PCR, tipagem viral, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction (PCR) is an enzymatic method for amplification of specific nucleic acid sequences. This method has been widely described for *Human Papillomavirus* (HPV) detection and typing. In this study, 460 cervical samples were evaluated for the HPV DNA presence by PCR assay. Positive samples were subsequently typed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The PCR-RFLP results were compared with the ones from colposcopy and cytology (Papanicolaou smears). PCR-RFLP proved to be an efficient and sensitive method for virus detection and typing.

Uniterms: HPV, PCR, genotyping, Molecular Diagnostic

INTRODUÇÃO

O grupo do papilomavírus genital humano (HPV - *Human Papillomavirus*) compreende mais de 20 tipos virais relacionados com infecção de colo uterino. Os tipos 16, 18, 39, 45, 56 estão associados com displasia e carcinoma cervical e considerados de alto risco. Os tipos 31, 33, 35, 51, 52, 58 são

considerados de risco intermediário e os tipos 6, 11, 34, 40, 42, 44, de baixo risco. A detecção precoce e a tipagem do papilomavírus são importantes na prevenção e tratamento de lesões que possam evoluir para carcinomas cervicais (1 - 8).

Vários métodos já foram descritos para detecção e tipagem viral, dentre os quais "Dot Filter Hibridization", "Southern Transfer Hibridization", "*in situ* Hibridization" e Captura Híbrida . Essas técnicas têm-se mostrado extremamente eficientes para a identificação dos tipos virais, mas apresentam como inconvenientes baixa sensibilidade e alto custo em alguns casos (8 -11).

Outro método que vem sendo amplamente utilizado para identificação e tipagem do vírus é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Trata-se de uma técnica altamente promissora devido a sua alta especificidade, maior sensibilidade e potencialidade de automação. Vários estudos têm demonstrado o uso intensivo dessa técnica tanto para detecção do HPV quanto para o diagnóstico dos tipos virais oncogênicos (1 - 6, 12).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso da técnica de PCR para a detecção do DNA do HPV, com subseqüente tipagem viral por RFLP, em um estudo comparativo com exames rotineiros para detecção de lesões genitais causadas pelo HPV (colposcopia e exame citopatológico).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram coletadas, após consentimento solicitado em ficha de triagem, no Ambulatório da **Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre**.

Foram coletadas 460 amostras do colo uterino na Junção Escamo-Colunar e Endocérvice para Citopatológico e "PCR" através de uma escova (*cytobrush*). No mesmo momento da coleta foi realizada colposcopia das pacientes.

Os resultados da citologia foram classificados para maior praticidade, neste estudo, como CP normal, e CP positivo. O CP positivo compreendeu lesões do tipo ASCUS, Baixo Grau - LGSIL, Alto Grau - HGSIL e lesões não relacionadas pela infecção do HPV.

Para o PCR, o DNA das amostras foi extraído pelo método padrão de fenol-clorofórmio (1, 12) e amplificado num sistema *multiplex* com "primers" para beta-globina humana e HPV genérico (12). Os produtos da amplificação foram visualizados em luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. As amostras positivas para beta-globina e HPV genérico foram analisadas quanto a determinação dos tipos virais. A genotipagem viral das amostra foi realizada por RFLP do fragmento amplificado, segundo a técnica descrita por Bernard (25). Os genótipos de HPVs pesquisados pela técnica utilizada foram classificados quanto ao risco relativo de severidade de doença cervical, em: <u>baixo risco</u> (6, 11, 34, 40,42, 44), <u>risco intermediário</u> (31, 33, 35, 51, 52, 58), <u>alto risco</u> (16, 18, 39, 45, 56) e <u>risco não determinado</u> (13, 26, 32, 34, 39, 40, 53, 54, 55, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, MM 4, MM 7, MM 8, MM 9, LVX 100, IS 39, CP 141, CP 6108, CP 8304, CP 4173, CP 8061).

Em todos os ensaios, foram utilizados controles com amostras comprovadamente positivas e negativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações de PCR apresentaram, nos casos positivos para HPV genérico e betaglobina, fragmentos amplificados de aproximadamente 450 pares de bases (pb) e 268 pb, respectivamente, demonstrando-se compatíveis aos descritos por e BAUER & MANOS (1993).

O Quadro 1 apresenta resultados comparativos dos exame citopatológico, colposcopia e PCR.

Na CONDIÇÃO **1**, onde o diagnóstico colposcópico e citopatológico dão resultados normais (357 casos), não houve a correspondência por PCR em 27 amostras (positivas apenas para o PCR). Está bem estabelecida a maior sensibilidade do PCR quando em comparação com técnicas convencionais de diagnóstico (5, 6, 10, 11) e, até mesmo, com outros métodos moleculares (5, 6, 8 - 11), o que justifica a ocorrência de positividade em situações onde outros métodos apresentam resultados negativos.

Na CONDIÇÃO **4**, onde o CP e a Colposcopia apresentaram resultados positivos (10 amostras), não houve correspondência por PCR em apenas 1 amostra. Apesar do exame colposcópio detectar nesta paciente uma lesão na zona de transformação, o CP "positivo" relacionava-se a uma lesão "não relacionada pela infecção do HPV" (ver materiais e métodos).

Nos casos onde não houve concordância dos exames citopatológico e colposcópico, CONDIÇÕES **2** e **3**, o PCR evidenciou seu valor como indicativo adicional, ratificando um ou outro diagnóstico. Na CONDIÇÃO **2** o PCR confirmou o resultado de 5 casos de colposcopia suspeita das 62 amostras CP normal, e na CONDIÇÃO **3** o PCR confirmou 6 casos CP positivos das 31 amostras em que a colposcopia era normal.

Com relação ao material submetido à tipagem (47 amostras), observou-se: 1) 18 casos de HPV de alto risco, dos quais 12 com resultado de CP normal e 11 de colposcopia normal;. 2) 4 casos de HPV de risco intermediário, dos quais 2 (tipos 33 e 58) de CP com lesões de alto grau apesar de apresentarem colposcopia normal; 3) 4 casos de HPV de baixo risco, dos quais nenhum apresentou CP com lesões de alto grau; 4) 19 casos de HPV de risco não determinado, 16 com CP normal e 3 com CP positivo (sendo 2 pacientes com lesões de baixo grau causados pelo HPV tipo 53). Em 2 casos o padrão de RFLP encontrado não foi compatível com os 46 tipos descritos por Bernard et al. (17) e em outros 2 casos não foi possível realizar a tipagem viral.

CONCLUSÕES

- O PCR-RFLP permitiu a detecção da ocorrência de HPV (genérico) e a determinação dos tipos virais prevalentes.

- O PCR-RFLP foi eficaz para a detecção de casos de infecção causada por HPV, tendo sido positivo em diversos casos não detectados pelo CP e/ou colposcopia.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio e financiamento do CNPq, da empresa Simbios Biotecnologia, e do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

BIBLIOGRAFIA

1) TING, Y. & MANOS, M.. Detection and Typing of Genital Human Papillomaviruses. in PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. edited by Innes, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J.. Academic Press, Inc. p 356-367. 1990.

2) BOSCH F.X., MUNOZ N., SANJOSE S.. Human papillomavírus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: A case-control study in Spain and Colombia. Cancer Epidemiol. 1993; 2:415-422.

3) LORINCZ A.T., REID R., JENSON A.B. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obst. Gynecol. 1992; 79:328-337.

4) NETO J.E.; BOOTH M.; MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; MEIJER C.J.L.M. & WALBOOMERS J.M.M.. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. J. Cancer 1994; 69:114-119.

5) BAUER H.M; TING Y.; GREER C.E; CHAMBERS J.C.; TASHIRO C.J.; CHIMERA J.; REINGOLD A.; MANOS M.M.. Genital Human Papillomavirus Infection in Female University Students as Determined by a PCR-Based Method. JAMA 1991; 265:23-30.

6) MORRISON E.A.B.; GOLDBERG G.L.; KADISH A.S. AND BURK R.D.. Polymerase Chain Reaction Detection of Human Papillomavirus: Quantitation May Improve Clinical Utility. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:2539-2543.

7) SCHIFFMANN M, BAUER H.M., HOOVER R.N.. Epidemiologic evidence showing that human papillomavírus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. J. Natl. Cancer Inst. 1993; 85:958-964.

8) MARGALL N.; GUIU X.M.; CHILLON M.; COOL P.; ALEJO M.; NUNES V.; QUILEZ M.; RABELLA N.; PRATS G. AND PRAT J.. Detection of Human Papillomavirus 16 and 18 DNA in Epithelial Lesions of the Lower Genital Tract by In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction: Cervical Scrapes Are Not Substitutes for Biopsies. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:924-930.

9) KUYPERS J.M.; CRITCHLOW C.W.; GRAVITT P.E ; VERNON D.A.; SAYER J.B.; MANOS M.M. AND KIVIAT N.B.. Comparison of Dot Filter Hybridization, Southern Transfer Hybridization, and Polymerase Chain Reaction Amplification for Diagnosis of Anal Human Papillomavirus Infection. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:1003-1006.

10) SCHIFFMAN, M.H., BAUER, H.M., LORINCS, A.T., MANOS, M. M., BYRNE, J. C., GLASS, A. G., CADELL, D. M. AND HOWLEY, P. M.. Comparison of Southern Blot Hibridization and Polymerase Chain Reaction methods for the detection of human papillmavírus DNA. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:573-577.

11) GUERREIRO E.; DANIEL R.W.; BOSCH F.X.; CASTELLSAGUE X.; MUÑOZ N.; GILI M.; VILADIU P. ; NAVARRO C.; ZUBIRI M.L.; ASCUNCE N.; GONZALEZ L.C.; TAFUR L.; IZARZUGAZA I. AND SHAH K.V.. Comparison of ViralPap, Souther Hybridization, and Polymerase Chain Reaction Methods for Human Papillomavirus Identification in an Epidemiological Investigation of Cervical Cancer. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2951-2959.

12) BAUER, H.M. & MANOS, M.M.. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. in Diagnostic Molecular Microbiology, Principales and Applications. edited by Persing D.H.; Smith T.F.; Tenover F.C.; White T.J.. Amercican Society for Microbiology. Mayo Foundation, 407-413.1993.

13) VAN DEN BRULE, A.J.C, ET AL. Use of anti-contamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and biopsies. J. Med. Virol. 1989; 29:20-27.

14) VAN DEN BRULE, A.J.C, ET AL.. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and typespecific polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:2739-2743.

15) KOSS, L.G.. Epidermoid Carcinoma of The Uterine Cervix and Related Precancerous Lesions. in Diagnostic Citology, 4th edition. J.B. Lippincott Company. p 374-423, 1992.

16) MALDONADO, P., JACINTHO, C., ALMEIDA, F.G.. HPV- Infecção Genital Feminina e Masculilna, primeira edição, editora Revinter Ltda, 1994.

17) BERNARD, H., CHAN, S., MANOS, M.M., ONG, C., VILLA, L.L., DELIUS, H., PEYTON, C.L., BAUER, H.M., WHEELER, C.M.. Identification and Assessment of Known and Novel HPV by PCR, RFLP, Nucleotide sequence, and Phylogenetic Algorithms. J.I.D 170:1077-1085 , 1994.

QUADRO 1 - Relação da avaliação de colposcopia, exame citopatológico com resultados positivos para detecção/caracterização de papilomavírus por PCR/RFLP - 460 pacientes examinadas.

CONDIÇÃO	RISCO			
	alto	intermediário	baixo	indeterminado
1) CP** e Colposcopia*** Normais	10/357	0/357	2/357	15/357
2) CP Normal e Colposcopia Suspeita	2/62	0/62	0/62	3/62
3) CP Positivo e Colposcopia Normal	1/31	2/31	1/31	2/31
4) CP Positivo e Colposcopia Suspeita	5/10	2/10	1/10	1/10
TOTAL	18/460	4/460	4/460	21/460

* (n) - representa o total de casos estudados em cada condição.

** resultados de CP segundo L. G. Koss (15).

***resultados de Colposcopia segundo P. Maldonado (16).

HEPATITE VIRAL A: FREQÜÊNCIA DE POSITIVIDADE PARA ANTICORPOS DAS CLASSES IgG E IgM SEGUNDO FAIXA ETÁRIA E TRIMESTRE SAZONAL(São Paulo, SP, 1996)

Márcia F FUKUYA[1], Adelaide J VAZ[1,2], Regina N TUNDISI[1], Patrícia S RODRIGUES[1], Adriana P LAGO[1], Andréia P FERREIRA[1], Charles SCHIMIDT[1], Décio DIAMENT[1]

[1]Laboratório Bio-Ciência Lavoisier. Av Angélica 1832. 01228-200. Fax (011) 8132197. São Paulo, SP, Brasil.

[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

RESUMO

Foram analisados os resultados dos testes imunoenzimáticos ELISA (Roche Diagnóstica) para anticorpos anti-HAV das classes IgG (HAV-G) e IgM (HAV-M) obtidos no período de dezembro de 1995 a novembro de 1996. Os 1177 pacientes estavam assim distribuídos: 1042 (88,5%) adultos (≥ 15 anos), sendo 49,4% do sexo masculino e 50,6% feminino, e 135 crianças (54,1% masculino e 45,9% feminino).

Foram obtidos os seguintes índices de positividade para HAV-G: 76,2% para adultos (77,5% dos homens e 75,0% das mulheres) e 48,9% para as crianças (56,2% entre os meninos e 40,3% entre as meninas). Os adultos apresentaram maior freqüência de positividade que as crianças ($p<0,05$). O contrário foi observado para anticorpos IgM: 4,6% de positividade para adultos e 29,6% entre as crianças.

Palavras-Chave: Hepatite Viral A, Anticorpos IgG e IgM anti-HAV.

SUMMARY

We present the 1,177 results of anti-HAV antibodies, IgG (HAV-G) and IgM (HAV-M) carried out from December 1995 to November 1996 using ELISA method (Roche Diagnóstica). The patients were distributed as follows: 1042 (88.5%) adults (≥ 15 anos), represented by 515 (49.4%) males and 527 (50.6%) females, and 135 children (54.1% male and 45.9% female). The following reactivity frequencies were obtained for HAV-G: 76.2% among the adults, higher ($p<0.05$) than among the children group (48.9%). The opposite was observed for frequency of HAV-M positivity: 4.6% for adults and 29.6% for children.

Keywords: HAV virus, Anti-HAV antibodies.

INTRODUÇÃO

Hepatites virais são definidas como aquelas causadas por vírus hepatotrópicos, cinco deles bem conhecidos: A, B, C, D, E. Recentemente, outros estudos têm levado à identificação de novos vírus como, por exemplo, o vírus G (GBV-A, GBV-B e GBV-C) (SIMONS et al., 1995).

Estes vírus apresentam diferenças importantes entre si, tanto no que diz respeito a estrutura, conteúdo de ácidos nucléicos, vias de transmissão e formas de inativação e quanto à evolução clínica dos indivíduos infectados (SÁEZ-ALQUÉZAR et al, 1996).

O vírus da hepatite A (HAV) é um RNA vírus com 7.900 nucleotídeos e dimensões de 27nm de diâmetro médio, não possuindo envelope. Morfologicamente é classificado como picornavírus (estrutura icosaédrica) (McNAMARA, 1990).

A distribuição do HAV é cosmopolita, nas formas epidêmica e endêmica. A via de transmissão é fecal-oral, sendo freqüentes os surtos epidêmicos, por contaminação de alimentos e água, em comunidades fechadas (PERRENOUD et al, 1996). Assim, é mais freqüente em áreas de piores condições sanitárias. No Brasil, a maioria da população adulta apresenta positividade para anticorpos IgG anti-HAV (NATH et al., 1981).

O HAV não tem tido importância epidemiológica no controle de produtos derivados do sangue, já que o vírus tem sido isolado apenas em fezes de indivíduos infectados, sendo pouco provável a transmição por via parenteral (SÁEZ et al, 1996).

A infecção por HAV ocorre mais freqüentemente na forma assintomática ou branda, como pode ser observado pelo elevado número de indivíduos com anticorpos IgG anti-HAV sem história de hepatite. Nos casos sintomáticos podem ser observados febre, anorexia, vômitos, fadiga e mal estar. Não está descrita a evolução da hepetite A para a forma crônica nem para estado de portador assintomático; raros casos se apresentam sob a forma fulminante. A mortalidade é muito baixa, < 0,2% (SÁEZ et al., 1996)

Os achados laboratoriais incluem urina escura, níveis elevados de transaminases e bilirrubina, todos inespecíficos e requerem exames diferenciais para identificar o agente etiológico. O período de incubação varia de 10 a 50 dias (McNAMARA, 1990) e ao final desse período podem surgir, ou não, os sintomas. Nessa fase, o HAV está presente nas fezes e antes mesmo do início dos sintomas, pode ser observada a produção de anticorpos séricos específicos anti-HAV, iniciando pelos da classe IgM (patognomônicos de infecção recente).

Os marcadores sorológicos da infecção são anticorpos IgG e IgM. Em 6-9 meses desaparecem os anticorpos classe IgM, enquanto que IgG pode persistir por muitos anos. Por isso, o teste HAV-IgM é útil no diagnóstico de fases aguda e recentes e o teste HAV-IgG pode ser empregado em estudos epidemiológicos de prevalência.

Mais recentemente, métodos de biologia molecular para detecção do RNA do HAV podem ser empregados para identificar o vírus em fezes. Esses métodos são mais rápidos que o isolamento viral em culturas de células e apresentam resultados mais precoces que a detecção de anticorpos IgM (SÁEZ et al., 1996). Devido ao elevado custo e pouca disponibilidade têm sido aplicação limitada em nosso meio.

A prevenção da hepatite A pode ser garantida por excelentes condições sanitárias locais. No entanto, as correntes migratórias e o número grande de indivíduos locomovendo-se pelo mundo, permitirão sempre a introdução do vírus naquelas comunidades.

A imunização passiva pela administração de gamaglobulina de indivíduos previamente expostos é utilizada com eficiência na fase sintomática e, preventivamente, em indivíduos do núcleo familiar ou geográfico do paciente.

Por outro lado, a imunização ativa pode ser a melhor forma de prevenir a infecção, em especial naqueles grupos expostos aos fatores de risco (ANÔNIMO, 1995). A vacina para hepatite A disponível no mercado tem sido considerada como altamente imunogênica e eficiente, sem apresentar reações adversas, sendo sugerido que a imunização universal poderia, eventualmente, erradicar a hepatite A (LISKER et al., 1996).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os resultados dos testes imunoenzimáticos ELISA (Roche Diagnóstica) para anticorpos anti-HAV das classes IgG (HAV-G) e IgM (HAV-M) obtidos no período de dezembro de 1995 a novembro de 1996 no Laboratório Bio-Ciência Lavoisier. Os testes foram realizados em sistemas automatizados da Roche: Cobas-Core (até agosto/96) e Cobas-Core II (a partir de setembro/96).

Os 1177 pacientes estudados estavam assim distribuídos: 1042 (88,5%) adultos (≥ 15 anos), sendo 515 (49,4%) do sexo masculino e 527 (50,6%) feminino, e 135 (11,5%) crianças sendo 73 (54,1%) delas do sexo masculino e 62 (45,9%) do sexo feminino.

RESULTADOS

A distribuição dos resultados obtidos para os testes HAV-G e HAV-M, de acordo com o grupo (idade e sexo) são apresentados na tabela 1.

A tabela 2 mostra os resultados do teste HAV-M distribuidos de acordo com época do ano, em trimestre sazonal.

Foram obtidos os seguintes índices de positividade para HAV-G: 76,2% para adultos (77,5% entre os homens e 75,0% entre as mulheres) e 48,9% para as crianças (56,2%entre os meninos e 40,3% entre as meninas). Não foi observada diferença significativa entre os sexos.

Os adultos apresentaram maior freqüência de positividade no teste HAV-G do que as crianças ($p<0,05$).

O contrário foi observado para anticorpos IgM: 4,6% de positividade para adultos (5,6% no sexo masculino e 3,6% no feminino) e 29,6% entre as crianças (35,1% dos meninos e 22,6% das meninas).

Quando comparamos os índices positividade do teste HAV-M de acordo com a época do ano, observamos ligeiro predomínio dos casos nos meses chuvosos (9,3%) em relação ao restante do ano (5,8%).

Tabela 1

Distribuição dos pacientes de acordo com idade, sexo e resultado obtido nos testes imunoenzimático para anticorpos anti-HAV das classes IgG (HAV-G) e IgM (HAV-M).

GRUPO*	**HAV-G**			**HAV-M**	
idade/sexo	**Positivo**	**Negativo**	**Total**	**Positivo**	**Negativo**
ADULTOS M	399 (77,5%)	116 (22,5%)	515	29 (5,6%)	486 (94,4%)
ADULTOS F	395 (75,0%)	132 (25,0%)	527	19 (3,6%)	508 (96,4%)
CRIANÇAS M	41 (56,2%)	32 (43,8%)	73	26 (35,6%)	47 (64,4%)
CRIANÇAS F	25 (40,3%)	37 (59,7%)	62	14 (22,6%)	48 (77,4%)
Total	860 (73,1%)	317 (26,9%)	1.177	88 (7,5%)	1.089 (92,5%)

* Adultos: ≥ 15 anos. Crianças: < 15 anos. M: sexo masculino. F: sexo feminino.

Tabela 2

Distribuição dos resultados obtidos nos testes imunoenzimático para anticorpos anti-HAV das classes IgG (HAV-G) e IgM (HAV-M), de acordo com o trimestre.

Meses	HAV-M		Total
	Positivo	Negativo	
Dezembro-Fevereiro	18 (7,9%)	209 (92,1%)	227
Março-Maio	34 (10,3%)	297 (89,7%)	331
Junho-Agosto	23 (7,3%)	294 (92,7%)	317
Setembro-Novembro	13 (4,3%)	289 (95,7%)	302
Total	88 (7,5%)	1.089 (92,5%)	1.177

DISCUSSÃO

A detecção de anticorpos anti-HAV por testes imunoenzimáticos, para auxiliar no diagnóstico diferencial das hepatites virais e em estudos epidemiológicos, tem sido muito utilizada em razão da elevada eficiência, facilidade de execução e custo relativamente menor que os métodos de identificação viral em fezes, por isolamento em cultura de células ou por técnicas de biologia molecular. A automação dos testes enzimáticos veio aumentar a rapidez com que são obtidos os resultados, importante nos casos graves e naqueles em que o paciente é criança.

Antes mesmo do início dos sintomas, são observadas anticorpos específicos da classe IgM, que perduram por 6 a 9 meses, em concentração decrescente. Concomitantemente, ou logo a seguir, surgem os anticorpos classe IgG, que poderão persistir por muitos anos. Contatos posteriores com o vírus irão manter a IgG anti-HAV presente por toda a vida.

Os métodos indiretos de deteção de IgM tinham a desvantagem de não eliminar a competição da IgG. O teste imunoenzimático de captura de IgM resolveu esse problema e vem sendo utilizado com elevada sensibilidade diagnóstica. A quantificação dos anticorpos anti-HAV (por intensidade de positividade) mostra grande variabilidade sem correlação com a clínica e, por isso, não tem sido empregada.

Para diagnóstico da fase aguda da infecção por HAV, o melhor marcador é o anticorpo IgM e, se possível o isolamento do vírus em fezes. Em estudos de prevalência da infecção o anticorpos IgG pode ser empregado.

Com o objetivo de avaliar os dois marcadores, foram analisados os resultados dos testes imunoenzimáticos ELISA para anticorpos anti-HAV das classes IgG (HAV-G) e IgM (HAV-M) obtidos no período de dezembro de 1995 a novembro de 1996 no Laboratório Bio-Ciência Lavoisier.

Os resultados foram obtidos de 1.177 pacientes assim distribuídos: 1042 (88,5%) adultos (≥ 15 anos), sendo 515 (49,4%) do sexo masculino e 527 (50,6%) feminino, e 135 crianças (< 15 anos), 73 (54,1%) deles do sexo masculino e 62 (45,9%) do sexo feminino.

No teste HAV-G foi observada maior freqüência de positividade entre os adultos do que entre as crianças (76,2% vs 48,9% $p<0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os sexos (77,5% dos homens, 75,0% das mulheres, 56,2% dos meninos e 40,3% das meninas). (tabela 1)

A freqüência de positividade do teste HAV-M mostrou diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre crianças (29,6%) e adultos (4,6%), sem distinção quanto ao sexo (5,6% dos homens, 3,6% das mulheres, 35,1% dos meninos e 22,6% das meninas) (tabela 1)

Quando comparamos os índices positividade do teste HAV-M de acordo com a época do ano, observamos ligeiro predomínio dos casos nos meses chuvosos (9,3%) em relação ao restante do ano (5,8%), sem diferença significativa (tabela2).

O número elevado de adultos estudados se explica por representar a faixa etária de maior risco para hepatites virais, incluindo aquelas de transmissão parenteral e sexual. Acreditamos que os testes HAV em adultos são solicitados apenas para diagnóstico diferencial do agente etiológico. Esse dado, a elevada positividade de HAV-M observada entre as crianças (29,6%) e a elevada freqüência de adultos infectados anteriormente (76,2%) também pode corroborar o fato de que na infância a infecção por HAV é geralmente assintomática (SÁEZ et al, 1996).

Considerando que os pacientes analisados estavam sob investigação da etiologia de hepatite, e a freqüência de positividade para infecção recente (7,5% no total estudado), conclue-se que o vírus da hepatite A tem importância epidemiológica para inclusão no diagnóstico diferencial das hepatites.

Os resultados obtidos sugerem que a infecção por HAV continua prevalente em nosso meio, indicando que as condições sanitárias, em especial nos meses chuvosos, permanecem adequadas para a transmissão de mais essa virose. Investimentos no sentido de prevenir a infecção devem ser estimulados, pela imunização ativa com vacinação da população exposta e, principalmente, pela melhoria das condições sanitárias que também minimizaria o impacto de outras afecções de transmissão fecal-oral.

AGRADECIMENTOS

A Simone A Silveira do Centro de Processamento de Dados do Laboratório Bio-ciência Lavoisier pelo auxílio na tabulação dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANÔNIMO - Vacuna antihepatitis A. Monografia. SmithKline Beecham Farmacéutica, Cidade del México, 1995. 39p.
2. LISKER M, PRADO D, RAMONET M. - Hepatitis A: su prevención, una necesidad. Pros y contras. In: 1st World Congress of Pediatric Infectious Diseases. 1996. Acapulco. Resumos. P.19.
3. McNAMARA AM. Viral Hepatitis. In: SHEEHAN C, ed. - Clinical Immunology: principles and laboratory diagnosis. JB Lippincott Co., Philadelphia, 1990. p. 257-266.
4. NATH N, MAZZUR S, FANG C. - Prevalencia de los anticuerpos contra el virus de la hepatitis A en donantes de sangre de 13 países y territorios del hemisferio occidental. Bol. sanit. panam., 90: 425-429, 1981,
5. PERRENOUD BAF, COSTA R, LERNER LH - Surtos de Hepatite. Relatório Provisório. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, 1996. 36p.
6. SÁEZ-ALQUÉZAR A, BASSIT L, SABINO EC. - Hepatites. In: FERREIA AW, ÁVILA SLM, eds. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1996. p.37-49.
7. SIMONS JN, LEARY TP, DAWSON GJ, PILOT-MATIAS TJ, MUERHOFF AS, SCHLAUDER GG, DESAI SM, MUSHAHWAR IK. - Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. Nature Medicine, 6: 564-569, 1995.

Meio de Cultura Líquido para pesquisa e identificação do Mycoplasma hominis, utilizando o Azactam no Suplemento (MHAZ). Modificação do Meio M-42

Jurandi David da Silva*

Palavras chaves: meio de cultura líquido - Mycoplasma hominis-Azactam-M-42-MHAZ.

Resumo: o Azactam é um medicamento que possui em sua formulação o aztreonam, um betalatâmico e o aminoácido L-argina, elementos essenciais na composição do meio de cultura para pesquisa e identificação do Mycoplasma hominis. Baseado nessa formulação, utilizamos com êxito a confecção do suplemento para o novo meio de cultura líquido, o MHAZ.

A metodologia apresentada simplifica a confecção do meio de cultura, viabilizando uma abrangência maior dos laboratórios que se preocupam com o isolamento e diagnóstico do M. hominis.

SUMARY

Title: Liquid culture medium for research and identification of Mycoplasma hominis, employing Azactam as a suplement (MHAZ). Modification of the M-42 medium.

Key words: Liquid culture medium; Mycoplasma hominis, Azactam-MHAZ

*** Farmacêutico - Bioquímico**
Chefe de seção de bacteriologia do Hospital do Sesi - Maceió-AL
Membro da American Society for Microbiology

SUMARY: Azactam is medicament that contains in it composition aztreonam - a betalactamic - and the aminoacido L-arginina, both essencial elements for the formulation of the culture medium for research and identification of Mycoplasma hominis.

Based on this formulation, the author successfully employed it for the preparation of a suplement for a new liquid culture medium, the MHAZ.

The metodology presented simplifics the preparation of the culture medium, making possible a major extent in laboratory pratce, for those who are looking towards isolation and of. M. hominis.

Introdução: Tem crescido de importância o envolvimento do M. hominis em diversas patologias urogenitais, cervicais, neonatais e até infertilidade. (2) (3)

Sua pesquisa tem sido bastante valorizada e solicitada constantemente pela clínica médica. A vasta literatura já existente, abordando o assunto, comprova a importância dessa bactéria, que tem como características principais:

a) Ser imune à ação dos beta lactâmicos, por não possuir parede celular;

b) Hidrolizar a arginina, que em conseqüência libera compostos aminados, alcalinizando o meio e provocando uma viragem indicadora da presença e proliferação da mesma. (1)

O presente trabalho tem por objetivo viabilizar e simplificar a confecção do meio de cultura para M. hominis, tornando-o acessível a todos os laboratórios de análise clínicas.

A praticidade e simplicidade de confecção do meio de cultura apresentado, evidencia-se quando comparado as formulações já existentes. (4)

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras inoculadas no meio foram obtidas dos seguintes sítios:

- uretra masculina - 20
- primeiro jato urinário - masculino - 10
- canal endocervical - 60
- fundo do saco vaginal - 60

Método de Obtenção das amostras

- Da uretra masculina - por introdução de uma swab fino no canal uretral cerca de 2 a 3 cm, explorando a fossa navicular. No ato de introdução do swab deve-se girar o mesmo. No caso da presença de muita secreção ou muco, remove-se com o auxílio de outro swab, antes da coleta.

- Canal da endocervice - utilizando o espéculo para expor o sítio, remover o excesso de muco ou secreção; introduzir o swab no canal endocervical, girando várias vezes.

- Fundo do saco vaginal - utilizar o espéculo para visualizar melhor o campo, remover o excesso de muco ou secreção e introduzir o swab na exploração do fundo de saco vaginal.

- Urina de primeiro jato - a urina obtida do primeiro jato foi centrifugada durante 10 minutos a uma velocidade de 400 x g(2.000RPM); desprezado o sobrenadante, obteve-se o sedimento para ser inoculado.

Inoculação no meio

Os swabs utilizados na coleta das amostras da uretra masculina, canal da endocervice e do fundo de saco vaginal, foram inoculados no meio MHAZ mediante esgotamento do material

neles contidos, através de rápido mergulho e agitação, sendo retirados em seguida. No caso da urina de primeiro jato, o swab foi mergulhado no sedimento urinário e transportado para o meio MHAZ da mesma forma acima descrita.

O volume inoculado não foi avaliado em virtude do objetivo do meio de cultura em estudo se destinar a uma identificação qualitativa. O volume inoculado limitou-se portanto, ao esgotamento da amostra obtida, em 2 ml do meio MHAZ.

O meio de cultura MHAZ, se constitui de base e suplemento

1. Base: Tryptone soya broth 2,0g
água destilada ou deionizada ..... 100 ml

pH ajustado entre 6,5 a 7,0 - uma solução de HCL 1,0N, foi utilizada para ajustar o pH.

Após o ajuste do pH foi adicionado 0,1 ml de solução de vermelho de fenol a 2% (solução indicadora).

A base foi autoclavada a 121 ºC, por 20 minutos.

Suplemento: Soro de cavalo, estéril 10,0ml

Solução de extrato de levedura 25% 4,0ml

Azactam de 1g (frasco ampola) 3,0ml

O suplemento foi adicionado à base, após esta ser resfriada em torno de 40ºC.

O meio foi distribuído em porções de 2,0ml em tubos de ensaios.

O Azactam de 1,0g possui em sua formulação 780mg de L-arginina

Preparo da solução do extrato de levedura a 25%

Em condições ambientais estéreis, pesar sobre papel laminado, previamente esterilizado por autoclavação, 12,5g do extrato de levedura (yeast extract), diluir em 50,0 ml de água

destilada ou deionizada estéril. Não autoclavar a solução. Conservar em geladeira entre 4 a 8ºC. Adotamos o prazo de validade de 15 dias.

Procedência das substâncias e meios de cultura utilizadas:

- Tryptone soya broth - Oxoid
- Yeast extract (extrato de levedura) - Oxoid
- Soro de cavalo, estéril - Fazenda Pigue - Fundação BioRio
- Azactam de 1g - Laboratório Bristol Myers - Squibb
- Mycogen - meio sólido - Labomedical Ind. Com. Rep. Ltda.

Deixamos de utilizar no suplemento, fatores essenciais de crescimento, como Polvitex, Vitox, Biovitalex, etc... objetivando dar mais especificidade ao meio, uma vez que os produtos citados contém glicose em suas formulações, a qual é utilizada por outras espécies de *Mycoplasmas*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras pesquisadas foram obtidas de pacientes ambulatoriais das clínicas urológica e tocoginecológica do Hospital do SESI - Maceió, no 1º Semestre do ano de 1996. Total de pacientes pesquisados: 90.

Resultados obtidos:

AMOSTRAS	EXAME REALIZADOS	RESULTADOS		PERCENTUAL DE POSITIVIDADE
		Positivo	**Negativo**	
- Uretra masculina	20	4	16	20%

- Canal da endocervice (*)	60	5	55	8,3%
- Fundo de saco vaginal	60	7	53	11,6%
- Urina de 1º jato (masc)	10	2	08	20%

(*) As amostra do canal endocérvico e do fundo de saco vaginal, foram colhidas concomitantemente das mesmas pacientes.

Confirmação do crescimento e identificação do M. hominis

A viragem do meio de cultura da cor amarela para vermelho ou cereja (fig. 1), com aspecto límpido, após incubação de 24 a 48 horas, a 37 ºC, indica a proliferação do Mycoplasma, o qual utiliza a L-arginina, liberando compostos aminados que alcalizam o meio de cultura, provocando a viragem do mesmo.

O aspecto turvo do meio, mesmo ocorrendo a viragem, é indicativo de contaminação. A maior parte das espécies de Pseudomonas, vira o meio em virtude de possuir a propriedade de hidrolizar a arginina.

A confirmação da proliferação do M. hominis no meio indicativo de positividade (onde ocorreu a viragem), foi feita mediante repicagem para o meio sólido (Mycogen) e após incubação a 37 ºC por 48 horas na jarra com vela constatou-se a presença de colônias típica de M. hominis. (fig. 2)

A técnica de repicagem do meio MHAZ para o meio MYCOGEN, foi feita utilizando um swab umedecido no meio MHAZ, onde ocorreu a viragem, e semeando no meio MYCOGEN.

Os resultados obtidos foram plenamente satisfatórios, considerando a simplificação da confecção do meio de cultura em comparação com as formulações descritas no manual de microbiologia clínica da Sociedade Americana de Microbiologia (2) e o meio M-42, bem como, levando-se em conta se tratar de meio de cultura destinado ao cultivo e identificação de uma bactéria classificada como fastidiosa.

AGRADECIMENTOS

Dra. Cristina Coitinho Bulhões pelos serviços de tradução; Acadêmico de Medicina Abel Cordeiro de Sousa Filho, pelos serviços de computação e ao Sr. Ricardo Damasceno Gomes, representante do Laboratório Bristol - Myers Squib, pelo fornecimento das amostras do Azactam.

BIBLIOGRAFIA

1. Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology - 19ª edition, 1994 - Ed. Baltimore Willians & Wilkins.

2. Manual of Clinical Microbiology - 15ª edition, 1991, Washington - ASM.

3. Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods - 18ª edition, 1995 - Ed. W. B., Saunders Company - Philadelphia - M.D. Henry, Jonh Bernard.

4. Rev. Bras. Anal Clin. 2.3. (4): 129-131, 1991 - Mezzari, A. & Caudoro, P.

OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM ARARAQUARA (SP) - BRASIL

Inneke Marie van der HEIJDEN*
Karina Ferrazzoli DEVIENNE**
Maria Stella Gonçalves RADDI**

- RESUMO: Um total de 219 fezes humanas, 77 material vaginal e 107 fezes de diversos animais foram analizadas quanto a presença do patógeno ***Listeria monocytogenes***. Crioenriquecimento em caldo triptose, contendo 40 mg/L de ácido nalidíxico, e isolamento em agar seletivo (agar BEA) foram utilizados para o processamento das amostras. Duas cepas isoladas de fezes humanas foram identificadas sorologicamente como ***L. monocytogenes*** sorotipo 1/2b e uma ***L. innoccua*** sorotipo 6B. ***L. monocytogenes*** não foi encontrada em material vaginal e fezes de animais. Apesar dos resultados desse estudo demonstrarem a baixa ocorrência de ***L. monocytogenes***, a possibilidade de listeriose humana esporádica não deve ser descartada.

- UNITERMOS: ***Listeria monocytogenes***; listeriose

---

* Estagiária do Programa de Iniciação Científica PIBIC-CNPq 94/96

** Departamento de Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - 14.801-902 - Araraquara - SP - Brasil

Introdução

A listeriose é uma zoonose causada pela ***Listeria monocytogenes*** que, em 1911, foi de grande importância em animais domésticos e selvagens, contudo, rara no homem[6]. Nos últimos anos, esse microrganismo vem demonstrando causar uma doença de origem alimentar, sendo preocupante para a indústria de alimentos, como também, na clínica médica[1,2,16,17].

O gênero listeria compreende um grupo de microrganismos ubiquitários, onde apenas uma espécie tem patogenicidade reconhecida, a ***L. monocytogenes***, encontrada em uma lista surpreendentemente grande de hospedeiros, tais como: mamíferos, aves, carrapatos, peixes e crustáceos[6]. Esse patógeno psicrófilo, de ocorrência cosmopolita, demonstrou ser de vida livre sendo isolado de plantas e solo[22]. O ciclo infeccioso é, provavelmente, determinado pela sua sobrevida no solo ou vegetação, estabelecendo portadores ou causando doença em animais e aves, e no homem, após consumo de alimentos contaminados cozidos inadequadamente[4].

Em 1989-90, estudos sobre fatores nutricionais de risco, realizados na Dinamarca, constataram que o leite não pasteurizado era responsável pela listeriose esporádica e que o surgimento de uma cepa epidêmica européia de ***L. monocytogenes*** estava veiculada a queijos tipo gorgonzola ("blue-mould cheese")[11]. A ingestão de carne de ave e bovina contaminada por esse microrganismo também é considerada uma possível fonte de infecção[5].

Na última década, o Center for Diseases Control (CDC) relatou casos de listeriose em 154 pacientes de seis regiões americanas, onde apenas um terço dos casos eram perinatais e que os outros dois terços ocorreram em pacientes idosos

e/ou imunodeprimidos, provavelmente, tendo como causa a ingestão de carne de frango mal cozida[23].

A ***L. monocytogenes*** é um pequeno bastonete Gram positivo, com 0,4 a 0,5µm de largura por 0,5 a 2,0µm de comprimento, não esporulado, microaerófilo, móvel, que cresce melhor em pH neutro a levemente alcalino, podendo suportar pH extremos (6,0-9,0) e temperaturas de 1-45°C, tendo crescimento ótimo a 30-37°C. É um microrganismo que cresce bem em meios gerais utilizados de rotina. Em agar sangue de carneiro, as colônias geralmente são circundadas por estreita faixa de beta hemólise, simulando a produzida pelo ***Streptococcus pyogenes***. O fenômeno CAMP (fator hemolítico acentuado) utilizado na identificação presuntiva de ***Streptococcus agalactiae*** é verificado também em algumas cepas de listeria. Na verdade, se ***L. monocytogenes*** não for cuidadosamente examinada em relação as outras características bioquímicas, o microrganismo pode ser confundido com estreptococos hemolíticos. Da mesma forma, pode ser erroneamente identificado como ***Enterococcus*** sp devido seu crescimento em agar esculina, seletivo para esse gênero. Como o microrganismo, via de regra, apresenta uma formação em paliçada ao exame bacterioscópico, frequentemente é confundido com bacilos difteróides[8].

A incidência de listeriose humana é desconhecida, principalmente, devido a semelhança da ***L. monocytogenes*** com outros microrganismos isolados em materiais clínicos. É provável que este microrganismo seja, na verdade, muito comum sem ser identificado. Assim, no presente trabalho, propusemo-nos verificar a presença de ***L. monocytogenes*** em fezes humanas, conteúdo vaginal e fezes de diversos animais da região de Araraquara utilizando técnica de enriquecimento e meio seletivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Crioenriquecimento a 4°C, de aproximadamente 1g de material biológico (conteúdo vaginal, fezes humanas e de animais), foi realizado em 9 ml de caldo triptose contendo por litro: triptose 20g (Maknur Laboratories), cloreto de sódio 5g (Merck), dextrose 1g (Carlo Erba), extrato de carne 10g (Difco), ácido nalidíxico 40mg, por período de até 60 dias. No 30° e 60° dias o caldo foi homogeinizado e uma alçada inoculada em agar seletivo indicador BEA, contendo por litro: caldo brucela 28g (Difco), manitol 10g (Difco), esculina 0,8g (Merck), citrato de ferro 0,5g (Riedel-de Haën), agar 15g (Merck), vermelho de fenol 0,08g (Merck), acriflavina 5mg, utilizando-se a técnica de esgotamento, o qual foi incubado por um período de 24 horas, em microaerofilia. As colônias suspeitas (com halo escuro sob as mesmas) foram repicadas para caldo TSB que após incubação por 24 horas, a 35°C foram submetidos a exame bacterioscópico pelo método de Gram. Os microrganismos Gram positivos foram identificados através de testes bioquímicos: catalase (+), hidrólise da esculina (+), mobilidade a temperatura ambiente (+), VM (+), VP (+), redução do nitrato (+), uréia (-), oxidação e fermentação da glicose, TSI (A/A), NaCl (+), azul de metileno (+) e teste CAMP (faixa estreita) foram realizadas[19]. Os microrganismos identificados presuntivamente como ***L. monocytogenes*** foram encaminhados ao Instituto Oswaldo Cruz para confirmação sorológica. A cepa ***L. monocytogenes*** ATCC 7644 foi utilizada no acompanhamento da metodologia padronizada.

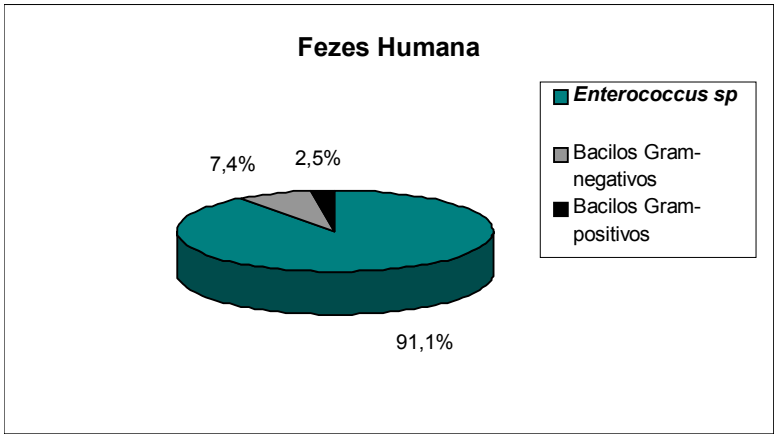
RESULTADOS

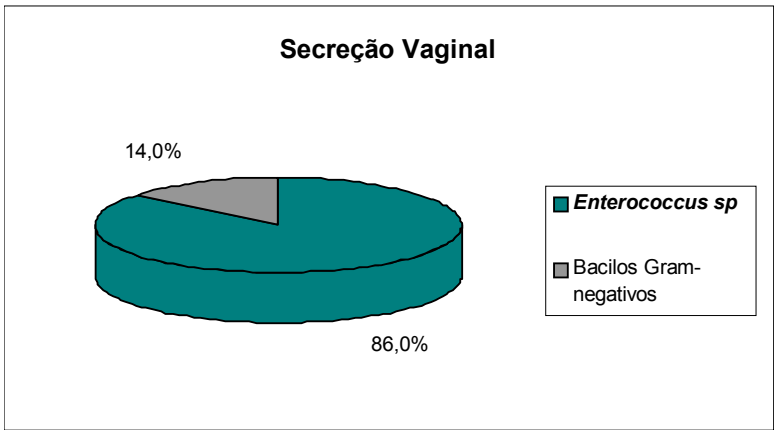
Foram processadas 219 amostras de fezes de pacientes, com solicitação para realização de exame parasitológico, encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas "Prof. Antônio Longo", da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP. Dentre as amostras analisadas, 166 (76,9%) apresentaram crescimento de colônias suspeitas. Devido a capacidade do meio triar microrganismos que hidrolisam a esculina, 446 colônias foram repicadas para caldo triptose soja (TSB) e, posteriormente, submetidas a bacterioscopia, após coloração pelo método de Gram. Os microganismos Gram-positivos foram identificados como sendo, na sua maioria, pertencentes ao gênero ***Enterococcus*** (Figura 1). De um total de 11 bacilos Gram-positivos isolados, apenas 3 (27,2%) foram triados como sendo ***Listeria*** sp. Estes foram encaminhados para realização de testes sorológicos e identificados como ***Listeria monocytogenes*** sorotipo 1/2b (2 cepas) e ***Listeria innocua*** sorotipo 6B.

Das 77 amostras de secreção vaginal, coletadas no Laboratório de Microbiologia Clínica, 48 (62,3%) apresentaram crescimento em meio seletivo (agar BEA). Um total de 93 colônias foram triadas e 86% (80) dos microrganismos isolados, que hidrolisaram a esculina, foram identificados como ***Enterococcus*** sp (Figura 1).

Um total de 107 amostras de fezes de animais da região de Araraquara foram processadas, sendo 64 de cão (59,8%), 15 de gado (14,1%), 7 de cavalo (6,5%), 6 de galinha (5,6%), 5 de porco (4,7%), 5 de gato (4,7%), 2 de cabra (1,9%), 1 de ganso (0,9%), 1 de carneiro (0,9%) e 1 de papagaio (0,9%). Do total, 65,4% (70) apresentaram crescimento de colônias suspeitas; 116 colônias foram repicadas para caldo TSB, conforme metodologia descrita anteriormente. A maioria dos microrganismos isolados foi identificado como ***Enterococcus*** sp (Figura 1). O

crescimento de ***Proteus*** sp, em 6 amostras, impossibilitou a pesquisa de ***L. monocytogenes***.





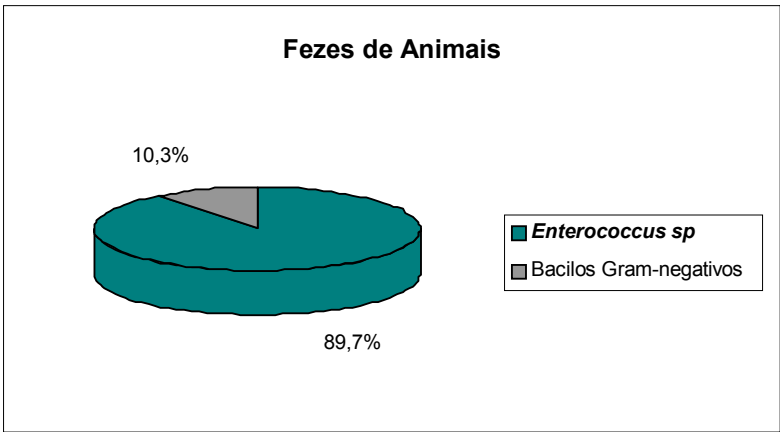


Figura 1 - Resultado obtido na triagem de colônias com característica morfológica de ***Listeria*** sp em fezes humanas, secreção vaginal e fezes de animais

DISCUSSÃO

Apesar do reconhecimento da ***L. monocytogenes*** como causa de enfermidade humana já ter ultrapassado meio século, somente nas últimas duas décadas investigações epidemiológicas, vêm merecendo atenção, com o objetivo de identificar casos de listeriose humana e determinar o papel dos alimentos na transmissão dessa doença[22].

A dificuldade no isolamento desse microrganismo, principalmente a partir de espécimes contendo alto índice de contaminantes, como fezes de origem humana e animal, foi explicada por diversos pesquisadores McBride[18], Kampelmacher[12] e Hoffer[10] que responsabilizaram a interferência de outras bactérias como fator inibidor do desenvolvimento normal de ***Listeria*** sp.

O enriquecimento a frio (4°C) em caldo triptose é o método clássico para selecionar cepas de ***Listeria*** sp psicrofílicas e é proposto por vários autores[1,7,12,15]. A eficácia dessa metodologia também foi constatada no presente trabalho onde verificou-se que a temperatura de 4°C é capaz de inibir microrganismos competidores. Todavia, o método mostra-se desvantajoso por requerer longo período de incubação (30-60 dias) revelando pouca eficácia para situações onde há necessidade de resultados mais rápidos.

A utilização do caldo de enriquecimento resultou em método de boa produtividade, acrescido da vantagem do antibiótico adicionado possibilitar a

inibição de microrganismos que competem com a ***Listeria*** sp. O ácido nalidíxico, inibindo a síntese de DNA bacteriano, tem elevada atividade antibacteriana, principalmente, contra microrganismos pertencentes a família ***Enterobacteriaceae***.

O meio Agar BEA (Brucela Esculina Acriflavina) mostrou ser seletivo e diferencial, além de inibir grande parte das bactérias contaminantes. A adição de acriflavina possibilitou um aumento na eficiência do meio, sem substancial perda de seletividade. A característica diferencial obtida pela incorporação de esculina, manitol, sal férrico e vermelho de fenol é defendida por alguns pesquisadores[21,25].

L. monocytogenes tem sido isolada em 0,6 a 2,9% das fezes de indivíduos assintomáticos[4]. Na maioria dos casos o estado de portador não está relacionado com o trabalho ou profissão dos pacientes, embora alguns trabalhadores de matadouros e frigoríficos apresentem o microrganismo com maior frequência[10]. No presente estudo foram isoladas 3 cepas de ***Listeria*** sp (1,4%) de um total de 219 fezes humanas, de pacientes com solicitação de exame parasitológico.

A associação de listeriose esporádica ao consumo de alimentos não cozidos de origem animal como carne, salsicha e frango[23] talvez venha explicar a baixa taxa de isolamento por nós encontrada, tendo em vista que esse tipo de alimentação não está incluida entre os hábitos alimentares da região. A análise dos dados obtidos por MacGowan *et al*[16] em relação a ocorrência de ***L. monocytogenes*** em água de esgoto (60,0%), alimentos (10,5%), solo (0,7%) e fezes humanas (0,6%) mostram que apesar da frequência do microrganismo em alimentos prontos para o consumo, apenas 4 das 692 espécimes fecais processadas apresentavam o microrganismo. Tappero *et al*[24] obseraram redução na incidência de listeriose humana nos Estados Unidos por sorotipos virulentos sugerindo que medidas

profiláticas tomadas pelas indústrias, normas técnicas de higiene e campanhas educativas foram efetivas no controle da doença.

Recentemente, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de justificar a baixa incidência do microrganismo na população. Infecções experimentais em ratos, com várias espécies de ***Listeria***, demonstraram que cepas de ocorrência natural de baixa virulência são capazes de induzir proteção contra cepas virulentas de sorotipos homólogos ou heterólogos, sugerindo que a resistência humana às infecções por listerias virulentas poderia ser devido a infecções naturais assintomáticas, por cepas atenuadas, que protegeriam contra cepas virulentas[3]. Outra justificativa pode ser baseada na produção de bacteriocinas produzidas por ***Enterococcus faecium*** que inibe ***L. monocytogenes***[26].

Poucos são os trabalhos que demonstram a prevalência dos sorotipos de ***L. monocytogenes*** no Brasil. Em 1984, Hoffer *et al*[9] relataram predomínio do sorotipo 4b (50,70%) e 1/2a (26,19%) em amostras isoladas de processos patológicos e apenas 1 cepa 1/2b (1,4%) encontrada em fezes de paciente procedente do Rio de Janeiro. Nojimoto[20] comprovou a participação dos mesmos sorotipos (1/2a (2,04%) e 4b (1,36%) em casos clínicos de abortos repetitivos na cidade de Goiânia. Possivelmente, a frequência dos sorotipos isolados em processo patológicos possam sugerir maior virulência do microrganismo. Nesse trabalho, o sorotipo 1/2b isolado de 2 pacientes com solicitação clínica de exame parasitológico poderia ser responsável pelos distúrbios intestinais dos mesmos. Assim, apesar da baixa frequência de portadores gastrintestinais de listeria por nós encontrada, observamos que os sorotipos não são coincidentes aos isolados em

processos patológicos invasivos, sugerindo a possibilidade do sorotipo 1/2b estar relacionado apenas a quadros de gastrinterites.

Aproximadamente metade dos casos de listeriose humana tem sido relatado em mulheres gestantes e neonatos. Acredita-se que a colonização vaginal possa ser frequente em mulheres portadoras do microrganismo no trato intestinal e que alterações hormonais e depressão da imunidade celular, durante a gestação, favoreçam a colonização vaginal. Assim, é de se esperar que a incidência de vaginites por ***L. monocytogenes*** seja bem menor que a taxa de portadores assintomáticos no trato gastrintestinal.

Em estudo realizado por Krahe[13] não foi constatada presença de ***L. monocytogenes*** em secreção vaginal em 132 gestantes com clínica de aborto, no Estado do Rio Grande do Sul. Nojimoto[20], de um total de 147 gestantes com abortos repetitivos, isolou 5 cepas (3 do sorotipo 1/2a e 2 do sorotipo 4b). Apesar das pacientes por nós amostradas, na maioria das vezes, não serem gestantes não observamos presença de ***L. monocytogenes*** nas 77 culturas de conteúdo vaginal processadas.

Considerando a listeriose uma zoonose, isto é, ter o reino animal como reservatório natural e a doença humana ser causada pelo contato direto ou indireto com animais infectados, o reconhecimento de animais portadores do microrganismo é pré-requisito para elucidação dessa relação epidemiológica. Larsen[14], pesquisador pioneiro a apresentar resultados sobre a ocorrência de ***Listeria*** em fezes de várias espécies de animais (cavalo, porco, ovelha, chinchila, cachorro, pássaros, galinha, pato, ganso e peru), detectou ser a chinchila a espécie animal predominantemente infectada por ***Listeria***, sendo rara nas outras espécies de animais estudadas.

No presente trabalho, ***Listeria*** sp não foi isolada nas 107 fezes processadas oriundas de diversos animais da região. A possibilidade da ação de duas bacteriocinas produzidas pelo ***Enterococcus faecium***, isoladas e caracterizadas por Vlaemynck *et al*[26] não pode ser descartada como possível fator interferente na recuperação de listeria, uma vez que são termo-resistentes e estáveis em pH baixo, e cerca de 66% (70) dos materiais processados continham ***Enterococcus*** sp.

A listeriose humana parece estar estreitamente relacionada a sorotipos específicos veiculados por hospedeiros naturais. A frequência da doença é maior em países de baixas temperaturas cuja fauna, principalmente a silvestre, difere daquela encontrada em países de clima quente. A baixa incidência de listeriose no Brasil, país de clima tipicamente tropical, pode ser justificada, principalmente, pela característica psicrofílica da ***L. monocytogenes***.

Referências Bibliográficas

1.BUCHDAHL, R.; HIRD, M.; GANSU, H.; TAPP, A.; GIBB, D. & TZANNATOS, C. Listeriosis revisited: the role of the obstetrician. Br. J. Obstet. Gynecol., v.97, p.186-9, 1990.

2. CAMPEBELL, D.M. Human listeriosis in Scothland, 1967-1988. J. Infect., v.20, p.241-50,1990.

3. CHAKRABORTY, T.; EBEL, F.; WEHLAND, J.; DUFRENNE, J. & NOTERMANS, S. Naturally occurring virulence- attenuated isolates of ***Listeria monocytogenesi*** capable of inducing long term protection against infection by virulent strians of homologous and heterologous serotypes. FEMS. Imunol. Med. Microbiol., v.10, p.1-9, 1994.

4. DAVID CHARLES, M.M.D.; FRCS (C); FRCOG. Clínicas obstétricas e ginecológicas - Infecções em obstetrícia e ginecologia. Vol. 10, número 1. Rio de Janeiro. Editora Médica e Científica Ltda., 1983.

5. ENGEL, R.E.; ADAMS, C.E.; CRAWFORD, L.M. Foodborne listeriosis: risk from meat and poultry. Food-Control, v.1, p.27-31,1990.

6. GELLIN, B.G.; BROONE,C.V.; BIBB,W.F. *et al*. The epidemiology of listeriosis in United States. Am.J. Epidemiol., v.133, p.392-401,1991.

7. GRAY, M.L.; STAFSETH, H.J.; TRORF, F. Jr.; SHOLL, L.B. & RILLEY, W. A new technique for isolating ***Listerellae*** from the bovine brain. J. Bacteriol., v.55, p. 471-6, 1948.

8. HAYES, P.S.; GRAVES, L.M.; AJELLO, G.W. *et al*. Comparision of cold enrichment and U.S. Department of Agriculture mehtods for isolation of ***Listeria monocytogenes*** from naturally contaminated food. Apll. Environ. Microbiol., v.57, p. 2109-13, 1991.

9. HOFER, E.; PESSOA, G.V.A. & MELLES, C.E.A. Listeriose humana. Prevalência dos sorotipos de ***Listeria monocytogenes*** isolados no Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 44, p.125-31, 1984.

10. HOFER, E. Estudo epidemiológico da ocorrência de portadores de ***Listeria monocytogenes*** entre operários de matadouros e indivíduos com distúrbios entéricos. Rio de Janeiro, 1974. 114p. Tese. Universidade do Rio de Janeiro.

11. JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W. & GERNER SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. Scand J. Infect. Dis., v.26, p.171-8, 1994.

12. KAMPELMACHER, E.H. & VAN NOORLE JANSEN, L.M. Further studies on the isolation of ***Listeria monocytogenes*** in clinically healhty individuals. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg., v.221, p.70-1, 1972.

13. KRAHE, C. Abortamento listérico seguido de gestação perturbada. Hospital, v. 77, p.265-8, 1970.

14. LARSEN, E. Occurrence of ***Listeria monocytogenes*** in faeces. Acta Pathol. Microbiol. Scand., [B] Suppl., v.229, p.72-92, 1972.

15. LOVETT, J. Isolation and enumeration of ***Listeria monocytogenes***. Food Techonol., v. 42, p.172-4, 1988.

16. MacGOWAN, A.P.; CARTIAGE, P.H.T.; MACLEOD, F. & MacLAUGHLIN, J. Maternal listeriosis in pregancy without fetal or neonatal infection. J. Infect., v.22, p.53-7, 1991.

17. MacLAUCHLIN, J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis is no-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. Epidemiol. Infect., v.104, p.191-201, 1990.

18. McBRIDE, M.E. & GIRARD, K.F. A selective method for the isolation of ***Listeria monocytogenes*** from mixed bacterial populations. J. Lab. Clin.Med., v. 55, p.153-7, 1960.

19. MARRY, ASM. 1995.

20. NOJIMOTO, I.T.I. ***Listeria*** spp em gestantes com clínica de aborto repetitivo: isolamento, identificação, susceptibilidade **in vitro** aos antimicrobianos. São Paulo, 1993. 145p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

21. ROCOURT, J.; WEHMEYER, U. & STACKEBRANDT, E. Transfer of ***Listeria denitrificans*** to anew genus ***Jonesia*** gen. nov. as ***Jonesia denitrificans*** comb. nov. Inst. J. Syst. Bacteriol., v.37, p.226-70, 1987.

22. SCHUCHAT, A.; DEAVER,K.; HAYES,P.S. Gastrointestinal carriage of ***Listeria monocytogenes*** in household contacts of pacients with listeriosis. J. Infect. Dis., v. 167, p.1261-2, 1993.

23. SCHWARTZ, B.; BROONE, C.V.; BROWN, G.R.; HIGTOWER, A.W.; CIESIELSKI, C.A.; GAVENTA, S.; GELLIN, B. G.; MASCOLA, L. Associations of sporadic listeriosis with comsuption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. Lancet, v. II, p.779-82, 1988.

24. TAPPERO, J.W.; SCHUCHAT, A.; DEAVER, K.A.; MASCOLA, L. & WENGER, J.D. Reduction of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The Listeriosis Study Group. JAMA., v. 273, p.1118-22, 1995.

25. VAN NEETEN, P.; PERALES, I.; VAN DE MOOSDIJK, A.; CURTIS, G.D.W. & MOSSEL, D.A.A. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of ***Listeria monocytogenes*** and other ***Listeria*** spp. Inst. J. Food Microbiol., v. 8, p.299-316, 1989.

26. VLAEMYNCK, G.; HERMAN, L. & COUDIJZER, K. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by ***Enterococcus faecium*** strains inhibitory to ***Listeria monocytogenes***. Int. J. Food Microbiol., v. 24, p.211-25, 1994.

Ao Prof. Dr. Ernesto Hofer, nossos agradecimentos pelo apoio, incentivo e caracterização sorológica das amostras.

Heijden, I. M. van der; Devienne, K.F.; Raddi, M.S.G. Occurence of ***Listeria monocytogenes*** in Araraquara (SP) - Brazil. Rev.Ciênc.Farm., São Paulo, v. , p. , 1997.

ABSTRACT: A total of 219 human faeces, 77 vaginal specimens and 107 faeces from different animals were analysed for presence of the pathogenic bacterium ***Listeria monocytogenes***. Cold enrichment procedure and seletive agar medium (agar BEA) were employed. Serotyping of the isolates strains from humam faeces showed that two were ***L. monocytogenes*** serotype 1/2b and one was ***Listeria innoccua*** serotype 6B. None of the vaginal specimens or animals faeces contened the organism. Although the results of this study found low occurence of ***L. monocytogenes*** , especial attention requires to assess esporadic human listeriosis.

KEYWORDS: ***Listeria monocytogenes***, listeriosis.

Óxido Nítrico: Benéfico ou Prejudicial?

Luci Maria Sant'Ana Dusse*
***Professora da Faculdade de Farmácia/UFMG**
Pós-graduanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP

RESUMO

O óxido nítrico ($N^{\cdot}O$) constitui um importante mediador de processos biológicos. Dentre eles, a vasodilatação, a regulação da pressão sanguínea, a inibição da coagulação sanguínea por prevenir a agregação plaquetária, o processo de aprendizagem e formação da memória e a ereção do pênis. Participa também do mecanismo de defesa, com atividade citotóxica e citostática contra microrganismos e células tumorais. Entretanto, a célula produtora de $N^{\cdot}O$ e sua vizinhança não estão a salvo de sua toxicidade, podendo ser destruídas. Evidências estão se acumulando no sentido de admitir a participação do $N^{\cdot}O$ na destruição tissular em diversos processos inflamatórios.

Palavras chaves: Óxido nítrico, funções fisiológicas e patológicas.

SUMMARY

Nitric oxide ($N^{\cdot}O$) is an important mediator in biological processes. It mediates the vasodilator tone that is essential for regulation of blood pressure, the inhibition of blood clotting by preventing the aggregation of platelets, the learning and memory formation and the penile erectile function. $N^{\cdot}O$ also has a role in host defense with cytotoxic and cytostatic properties against microorganisms and tumoral cells. Nevertheless, $N^{\cdot}O$ may play a role in tissue damage, for it may be toxic for the cells that produce it, as well as for neighboring cells, suggesting the idea that it has a dualistic function in inflamation.

Key Words: Nitric oxide, physiological and pathological.

O óxido nítrico ($N^{\cdot}O$) constitui uma das mais intrigantes moléculas biológicas. Apesar de ser extremamente simples, ele está envolvido em uma infinidade de processos fisiológicos e patológicos.

O $N^{\cdot}O$ é um radical livre, formado por sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo, portanto, um elétron desemparelhado. Em sistemas biológicos, o $N^{\cdot}O$ reage rapidamente com o oxigênio molecular (O_2), gerando nitrito (NO_2^-), com o ânion superóxido (O_2^-), gerando peroxinitrito ($ONOO^-$) e com metais de transição, especialmente ferro e enxofre. Sua meia vida é extremamente curta, cerca de 10 a 60 segundos nos tecidos e 6 segundos no plasma [(1)]. Esse fato dificulta muito a sua determinação e as mais avançadas tecnologias têm sido propostas para determiná-lo, seja direta ou indiretamente, através de ensaios que reflitam a sua presença.

A síntese do $N^{\cdot}O$ ocorre no interior de várias células, através da oxidação do aminoácido L-arginina, com a produção de quantidades equimolares de L-citrulina e $N^{\cdot}O$. Essa reação é catalisada pela enzima, NO-sintase (NOS) e requer 4 cofatores, β-

Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH), Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Flavina Monucleotídeo (FMN) e Tetrahidrobiopterina (BH_4)[2].

As evidências mostram que há pelo menos dois tipos (isoformas) de NOS, a isoforma constitutiva (c-NOS) e a induzível (i-NOS). Essas isoformas diferem quanto à forma de ativação, à capacidade de síntese de $N^{\cdot}O$ e à função[2,3].

A isoforma constitutiva é cálcio/calmodulina dependente e está envolvida na sinalização celular. Compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios[5], e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares[2] e plaquetas[6].

A c-NOS produz pequenas quantidades de $N^{\cdot}O$ (da ordem de nano ou picomoles). Sua ativação depende da sua interação com a calmodulina que, por sua vez, é controlada pelos níveis de cálcio[3].

A NOS induzível (i-NOS) não é expressa sob condições normais. É induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo células imunes (macrófagos, linfócito T), endoteliais, musculares lisa, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas[7]. Essa isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de $N^{\cdot}O$ que a c-NOS (da ordem de micromoles) e a produção desse continua indefinidamente até que o substrato (L-arginina) ou os cofatores (NADPH, FAD, FMN, e BH_4) sejam depletados ou ocorra a morte celular[8].

O $N^{\cdot}O$, produzido pelas células endoteliais, tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo acetilcolina, bradicinina, ADP, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), levando à ativação da enzima NO-sintase (e-NOS), presente nessas células, e à consequente produção de $N^{\cdot}O$[9]. Admite-se que, em condições fisiológicas, haja uma constante liberação de quantidades ínfimas de $N^{\cdot}O$, resultando em uma discreta vasodilatação[10]. O fluxo pulsátil pode contribuir para regular a liberação de $N^{\cdot}O$ em condições fisiológicas[11].

O $N^{\cdot}O$ produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular ou para o lúmen vascular. A difusão rápida do $N^{\cdot}O$ e a facilidade com que penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas[2,12]. No interior da célula muscular, ele interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), tornando-a ativada (GCa). A GCa catalisa a formação de Guanosina Monofosfato cíclica (GMPc) a partir da Guanosina Trifosfato (GTP). O aumento da concentração de GMPc na célula muscular acarreta uma diminuição do cálcio livre intracelular e o consequente relaxamento dessa[8].

O mecanismo pelo qual o $N^{\cdot}O$ é liberado da GCa, após ocorrer a vasodilatação necessária, não é conhecido. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do $N^{\cdot}O$ da GCa[12].

O $N^{\cdot}O$ que deixa a célula endotelial em direção à corrente sanguínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso, ou nas hemácias[10]. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o $N^{\cdot}O$ promove um aumento de GMPc e consequente diminuição do cálcio livre. Como o cálcio é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo estará inibido, prevenindo, assim, a deposição de plaquetas nas paredes dos vasos[10].

As plaquetas humanas possuem e-NOS e são, também, produtoras de $N^{\cdot}O$[6]. Tanto o $N^{\cdot}O$ oriundo das células endoteliais quanto o produzido endogenamente são importantes no controle da função plaquetária[13,14]. Um estudo recente sugere que a propriedade de inibir a agregação das plaquetas, apresentada pelo alho, resulta unicamente da sua capacidade de estimular a c-NOS[15].

Se o $N^{\cdot}O$ penetra nas hemácias, ele é eliminado através de sua reação com o ferro da hemoglobina, tanto oxigenada ($Hb\text{-}O_2$), quanto desoxigenada (Hb)[2,10].

$Hb\text{-}O_2 + N^{\cdot}O \rightarrow$ Metemoglobina (MetHb) + nitrato (NO_3^-)

$Hb + N^{\cdot}O \rightarrow$ Nitrosil-Hemoglobina (NO-Hb)

$NO\text{-}Hb + O_2 \rightarrow MetHb + NO_3^-$[16]

Curiosamente, há mais de 100 anos, foi introduzido, de modo empírico, o uso de nitratos orgânicos e nitroglicerina no tratamento da angina, falha cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar e outras complicações vasculares. Hoje, sabe-se que tais compostos, por si só, são inativos, mas sua metabolização resulta na produção de $N^{\cdot}O$. O $N^{\cdot}O$ é, portanto, a molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, sendo o responsável pela dilatação das artérias coronarianas, melhorando o suprimento sanguíneo ao coração e, consequentemente, aliviando os sintomas[17].

É oportuno comentar que a nitroglicerina é o químico ativo da dinamite e que o inventor dessa, Alfred Nobel, ao ser vitimado por uma angina, escreveu a um amigo o seguinte: "Parece ironia o fato de eu estar de acordo em utilizar nitroglicerina internamente"[18].

Atualmente, está bem estabelecido que o $N^{\cdot}O$ resultante da NOS constitutiva tem um papel crucial na manutenção do tônus vascular[19], na regulação da pressão sanguínea[2,20], na prevenção da coagulação sanguínea[21], na regulação da interação leucócito-endotélio e na permeabilidade vascular[22].

As evidências sugerem que um comprometimento na síntese de $N^{\cdot}O$ pode ter um papel relevante na patogênese de várias desordens cardiovasculares incluindo a hipertensão essencial, doença hipertensiva específica da gravidez e aterosclerose [23, 21].

No sistema nervoso central, o $N^{\cdot}O$ resultante da n-NOS age como um neurotransmissor e é possível que tenha participação no processo de desenvolvimento do cérebro, aprendizagem e memória[2].

No sistema nervoso periférico, o $N^{\cdot}O$ atua como um dos neuromediadores para diminuir o tônus contrátil dos músculos cardíaco, liso e esquelético[18]. No trato gastrointestinal, as evidências sugerem que $N^{\cdot}O$ regula o fluxo sanguíneo na mucosa gastrointestinal, conferindo-lhe proteção[24]. No pâncreas, participa do processo de secreção de insulina estimulada pela glicose [24].

O $N^{\cdot}O$ participa, ainda, do mecanismo de ereção do pênis por promover o relaxamento dos vasos sanguíneos e do músculo liso do *corpus cavernosum* [25]

O $N^{\cdot}O$ resultante da ativação da i-NOS, que ocorre em condições patológicas, está envolvido no mecanismo de defesa e resposta imune. Nessa circunstância, o $N^{\cdot}O$ possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de vírus, fungos, bactérias, protozoários, helmintos e de células tumorais [26,27].

A citotoxidade do $N^{\cdot}O$ resulta de sua ação direta ou de sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório [28].

A base bioquímica para a ação direta do $N^{\cdot}O$ consiste, primariamente, da inativação de vias metabólicas críticas do microrganismo, parasita ou célula tumoral.

Essa inativação é consequente da reação do $N^{\cdot}O$ com metais, especialmente ferro e enxofre, presentes nas enzimas do seu alvo. Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular[26,28].

Em um processo infeccioso, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente $N^{\cdot}O$ e intermediários reativos do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa do $N^{\cdot}O$ e O^{2-} (ânion superóxido) tem sido demonstrada[29]. O produto dessa reação é o peroxinitrito ($ONOO^{-}$), que é um poderoso oxidante de proteínas[21]. O peroxinitrito pode, posteriormente degradar-se, na presença de íon hidrogênio (H^{+}), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil ($HO^{\cdot}$), aumentando, efetivamente, a ação tóxica do $N^{\cdot}O$ e do O^{2-}[28].

A célula produtora de $N^{\cdot}O$ e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas. Evidências estão se acumulando no sentido de admitir que o $N^{\cdot}O$ contribui para algumas condições patológicas como asma, septicemia, artrite reumatoide, lesões ateroscleróticas, tuberculose, gastrite induzida por *Helicobacter pylori*, rejeição de enxerto, doença de Alzheimer e esclerose múltipla[7].

Estudos realizados com modelo animal revelam que o uso de inibidores da síntese de $N^{\cdot}O$ tem mostrado um efeito benéfico em várias patologias. Na artrite experimental, ocorre uma atenuação dos sinais clínicos e histológicos da doença. Na glomerulofrite, há uma diminuição da deposição de complexos imunes[28]. Na diabetes dependente de insulina (Tipo I), induzida imunologicamente, os estudos demonstram que a destruição das células pancreáticas β é mediada por $N^{\cdot}O$[29] e as primeiras tentativas de inibir a i-NOS nessa patologia têm sido animadoras[24].

Na prática clínica almeja-se encontrar um marcador da síntese de $N^{\cdot}O$ que reflita a extensão da destruição celular e do processo inflamatório. A determinação de nitrito (resultante da reação do $N^{\cdot}O$ e O^{2-}) e nitrato (resultante da oxidação do nitrito) em fluidos biológicos tem sido utilizada[30,31]. Entretanto, os níveis de nitrato e nitrito variam com a dieta, o que compromete a especificidade do teste[7].

Um candidato promissor para se estimar a produção de $N^{\cdot}O$ tem sido a 3-nitrotirosina. Essa é formada pela ação do peroxinitrito (resultante da reação do $N^{\cdot}O$ e O^{2-}) sobre os resíduos de tirosina das proteínas. O *turn-over* de proteínas contendo resíduos 3-nitrotirosina gera resíduos livres de 3-nitrotirosina. Esses têm sido detectados, por HPLC, no plasma e no líquido sinovial como marcadores de inflamação e exposição ao peroxinitrito[32,33].

Concluindo, o $N^{\cdot}O$ apresenta um papel paradoxal, benéfico como mensageiro/modulador em processos biológicos essenciais e como mediador do sistema imunológico, mas potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários reativos do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante.

O campo está aberto para investigação do papel dúbio do $N^{\cdot}O$ em circunstâncias diversas e o número de publicações relacionadas a essa molécula tem aumentado exponencialmente. A determinação de ativadores e inibidores específicos da síntese de $N^{\cdot}O$ constitui o novo desafio para o entendimento e tratamento de várias patologias e tem sido um dos principais alvos da indústria farmacêutica[34].

Agradecimento:
Agradeço à Magda Barbosa Roquette de Pinho Taranto, pela revisão gramatical do manuscrito.

Referências bibliográficas:

1) KIECHLE,F.L. & MARLINSKI, T. Nitric oxide:Biochemistry, Pathophysiology and Detection. Am. J. Clin. Pathol., v.100, p.567-75, 1993.
2) MONCADA, S. et alli. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. Pharmacol.Reviews, .43(2):, 109-42, 1991.
3) MARLETTA,M.A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. Cell, v.78, p.927-30, 1994.
4) NATHAN,C. & XIE, Q-W. Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide. J. Biol. Chem., v.269, n.19, p. 13725-8, 1994.
5) BREDT,D.S & SNYDER,S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,86: 9030-33, 1989.
6) RADOMSKI, M.W. et alli. An L-arginine : nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, v.87, p.5193-7, 1990.
7) MOSHAGE, H. Nitric Oxide Determinations: Much Ado About ·NO - Thing? Clin.Chem, v.43, n.4, p.553-6, 1997.
8) DUSTING, G.J. Nitric Oxide in Cardiovascular Disorders. J.Vasc.Res., v.32, p. 143-161, 1995.
9) DUSTING, G.J. & MaCDONALD, P.S. Endogenous Nitric Oxide in Cardiovascular Disease and Transplantation. Ann. Med., 27: 395-406, 1995.
10) WENNMALM,A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. J. Int. Med., v.235, p.317-27, 1994.
11) NAVA,E. & LÜSCHER, T.F. Endothelium-derivated vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. J.Hypert., v.13(suppl 2), p. S 39-48, 1995.
12) BECKMAN,J.S & KOPPENOL,W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxinitrite: the good, the bad and the ugly. Am.J.Physiol.,v.271:(Cell. Physiol.40),p.C1424-37, 1996.
13) MEHTA,J.L. et alli. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. J.Lab.Clin.Med., v.125, p.370-7, 1995.
14) VASTA, V. et alli. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. Bioch. Biophys. Res. Commun., 206 (3): 878-84, 1995.
15) DAS,I. et alli. Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. Bioch.Soc.Trans., v.23, p.136 s, 1995.
16) HENRY, Y. et alli. Nitric oxide, a biological effector. Eur. Biophys. J., v.20, p.1-15, 1991.
17) ABRAMS, J. Benefical Actions of Nitrates in Cardiovascular Disease. Am.J.Cardiol., v.77, p.31C-7c, 1996.
18) SNYDER, S.H. & BREDT, D.S. Biological Roles of Nitric Oxide. Scientific American, v.May, P.28-35, 1992.
19) GRIENDLING, K.K. & ALEXANDER,R.W. Endothelial control of cardiovascular system: Recents advances. FASEB J. V.10, p.283-92, 1996.
20) TRESHAM,J.J., COOPER,E.J., BEDNARIK,J.A., DUSTING,G.J. & MAY,C.N. Prolongated regional vasoconstriction produced by N^G-nitro-L-arginine in the conscious sheep. J.Cardiovasc.Pharmacol., v.24, p.144-50, 1994.
21) LOSCALZO,J. & WELCH,G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Progress in Cardiovascular Diseases, v.XXXVIII, n.2, p. 87-104, 1995.
22) KUBES,P.; SUZUKI,M.; GRANGER,D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,v.88, p.4651-5, 1991.
23) LÓPEZ-JARAMILLO,P. et alli. Cyclic guanosine 3',5' monophosphate concentrations in pre-eclampsia: effects of hydralazine. Br. J. Obstet. Gynaecol.,v.103, p.33-8, 1996.
24) KUO,P. & SCHROEDER,R.A. The Emerging Multifaced Roles of Nitric Oxide. Ann. Surg., v.221, n.3, p.220-5, 1995.
25) BUSH,P.A. et alli. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. Bioch. Biophys. Res. Commun., v.1, p.308-14, 1992.
26) JAMES,S.L Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiological Rev., v.dez, p.533-47, 1995.
27) FERNANDES,P.D. & ASSREUY,J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. Bras.J Med.Biol.Res., v.30, p.93-9, 1997.

28) MOILANEN,E. & VAPAATALO,H. Nitric Oxide in Inflamation and Immune Response. Ann. Med., v.27, p.359-67, 1995).
29) KRÖNCKE, K.D. et alli. Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection - How, Why, When and Where? Nitric Oxide: Biology and Chemistry, v.1, p.107-120, 1997
30) UEKI,Y. et alli. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthrits. J.Rheumatol.,v.23,p.230-6,1996.
31)ARIAS-DIAZ,J. et alli. Nitrite/ nitrate, cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. Cancer, v.74, p.1546-51, 1994.
32) KAMISAKI,Y et alli. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liiquid chromatography. J.Chromatogr., v.685, p.343-7, 1996.
33)ISCHIROPOULOS,H. et alli. Reactive species in ischemic rat lung injury: contribuition of peroxynitrite. Am.J.Physiol., v.269, p.L158-64, 1995.
34) SPRINGALL,D.R. Nitric Oxide - Friend and Foe. J.Pathol.,v.175, p.165-6, 1995.

Endereço para correspondência:
Luci Maria Sant'Ana Dusse
Faculdade de Farmácia/ UFMG
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Av. Olegário Maciel, 2360/ 608- Belo Horizonte-M.G.
CEP: 31.180-112

PREVALÊNCIA DE PARASITOSES INTESTINAIS EM ESCOLARES NO MUNICÍPIO DE SÃO JOAQUIM, SC *

Intestinal parasites prevalence in scholars fron São Joaquim, Santa Catarina, Brazil.

MARCELO L. SCHMITT & MARCO ANTONIO S. PAES

RESUMO

São apresentados os resultados de 398 exames parasitológicos de fezes, realizados pelo método sedimentação em formalina - éter, em escolares de São Joaquim, SC. O estudo foi desenvolvido no período de maio a setembro de 1996, em pré escolares e escolares com idade variando de 0 a 17 anos, provenientes de 2 estabelecimentos de ensino públicos. A prevalência de parasitoses intestinais foi analisada estatisticamente, revelando uma percentagem de exames positivos de 22.36 %. Observou-se também que os monoparasitados foram maioria com 19.34 %, enquanto os biparasitados representaram 3.02 % das amostras examinadas. Não foram observados amostras tri ou poliparasitados. Entre os monoparasitados a maior prevalência foi de *Ascaris lumbricoides 7.28* %, seguido de E*ntamoeba coli* com 5.77 % e *Giardia lamblia* com 5.53 %. Entre os biparasitados a maior prevalência foi da associação *Entamoeba coli / Giardia lamblia* com 1.26 %. Os índices de parasitoses intestinais são analisados e discutidos em relação ao nível sócio econômico da população e a falta de saneamento básico da população atendida pelos estabelecimentos de ensino.

Unitermos: Parasitoses intestinais, exame parasitológico de fezes, escolares.

SUMMARY

The authors presents the results of a prevalence intestinal parasites. The study was carried out from may to september of 1996, in 398 scholars from under 0 to 17 year old, from two public schools, in São Joaquim, Santa Catarina, Brazil. The study shows a prevalence of 22.36 % of intestinal parasites. *Ascaris lumbricoides* was the predominant (7.28 %), following by *Entamoeba coli* (5.77 %) and *Giardia lamblia* (5.53 %). The results are discussed in terms of social - economic level of the studied population.

Key words: Intestinal parasites, school examinations, parasitism prevalence.

* Trabalho realizado no Laboratório de Análises Clínicas Biodiagnóstico LTDA.
Rua Maj. Jacinto Goulart, 115, São Joaquim - SC 88600-000

INTRODUÇÃO

A alta prevalência de parasitoses intestinais figuram como um dos principais fatores responsáveis pela má nutrição e morbidade na infância e, desta forma, prejudicam o desenvolvimento físico e mental das criança acometidas (07).

As campanhas de controle e erradicação das enteroparasitoses não requerem financiamentos exorbitantes, capacitacão humana nem equipamentos complexos mas, imediata concientizacão das populações sobre higiene, educação sanitária e de urgente campanha de tratamento em massa (03).

Precárias condições de moradia e alimentação , déficit de tratamento de água e esgoto, hábitos higiênicos inadequados, além de carência de conhecimentos básicos de educação comunitária, são alguns dos fatores responsáveis pelos elevados percentuais de parasitoses intestinais em várias cidades brasileiras, representando importante problema de saúde pública (01, 02, 03, 07). Além dos prejuízos que podem trazer à saúde do homem, as parasitoses intestinais, causam consideráveis perdas econômicas com assistência médica, redução do aprendizado e da produtividade, e em alguns casos a incapacitacão para o trabalho (07).

Alguns segmentos educacionais e de assistência da família, numa tentativa de minimizar os fatores que possam influenciar negativamente no processo de desenvolvimento, ensino e aprendizagem, tem procurado através do sistema de saúde, fazer o diagnóstico e tratamento destas parasitoses (07).

Com o objetivo de avaliar os níveis de contaminação de parasitoses intestinais em pré escolares e escolares, foram realizados exames parasitológicos de fezes em 2 estabelecimentos de ensino no município de São Joaquim, SC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram examinados 398 amostra de fezes de crianças e adolescentes de ambos os sexos, com idade variando entre 0 e 17 anos provenientes do Centro de Atenção Integral à Criança e ao Adolescente - CAIC e da creche municipal Nelo Souza, ambos localizados em São Joaquim, SC, no período de maio a setembro de 1996. As fezes foram coletadas em recipientes próprios, sendo processadas pelo método de sedimentação em formalina - éter, (04). Foram realizados também dois exames parasitológico de fezes em cada funcionário com trabalho relacionado com a preparação de alimentação fornecida aos escolares nestes estabelecimentos, um em maio e outro em setembro, com finalidade de

descartar a contaminação dos escolares nos próprios estabelecimentos de ensino. Ambas escolas fornecem água tratada aos seus freqüentadores.

RESULTADOS

Nos funcionários responsáveis pela alimentação (total de 09), 100 % das amostras não apresentaram parasitos intestinais.

Nos estudantes a prevalência de parasitoses intestinais foi de 22.36 % (Tabela 1), sendo que os monoparasitados foram maioria 19.34 %, os biparasitados foram 3.02 % (Tabela 2), não foram observadas amostras tri ou poliparasitadas. Entre os monoparasitados a maior prevalência foi de *Ascaris lumbricoides* com 7.28 % das amostras, seguido de *Entamoeba coli* com 5.77 %, *Giardia lamblia* com 5.53 % e E*ntamoeba histolytica* com 0.76 % (Tabela 3). Nos biparasitados a maior prevalência de parasitoses intestinais foi a associação *Entamoeba coli / Giardia lamblia* com 1.26 %, seguido da associação *Ascaris lumbricoides / Entamoeba histolytica* com 0.51 % e as associações *Ascaris lumbricoides / Giardia lamblia, Ascaris lumbricoides / Tricocephalus trichiurus, Giardia lamblia / Tricocephalus trichiurus, Giardia lamblia / Entamoeba histolytica* e E*ntamoeba coli / Entamoeba histolytica* obtiveram cada uma prevalência de 0.25 % (Tabela 4).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os índices de parasitoses intestinais observados neste trabalho estão de acordo com dados obtidos por outros autores (02 , 03 , 04 , 07). Reflete o baixo nível sócio econômico dos escolares e a carência de infra estrutura de saneamento básico nas comunidades atendidas. A ausência de *Enteróbios vermiculares* e *Taenia sp.* pode ser justificada pela baixa sensibilidade do método de exame de fezes para estes parasitos. A não observação de parasitos em 100 % das amostras provenientes dos funcionários responsáveis pela preparação da alimentação dos escolares, reforça a afirmativa de não contaminação destas crianças e adolescentes nos estabelecimentos de ensino. A alta prevalência de *Ascaris lumbricoides* poderia estar relacionada com o fato de que a maioria das famílias não dispõe de uma rede de esgoto, favorecendo o contato das crianças com o ambiente altamente poluído com fezes humanas. A maior incidência de contaminação por protozoários revelou-se uma surpresa, uma vez que, a maioria das famílias possui abastecimento de água tratada em suas residências, favorecendo assim, a hipótese de contaminação interpessoal, facilitada pelas altas densidades demográficas comumente

observadas nas famílias destes escolares e, em ambos os casos os precários hábitos higiênicos parecem ser fator determinante para a transmissão de parasitoses intestinais.

Pode-se salientar ainda, que a literatura mostra altos índices de reinfeccão (05, 06) não sendo portanto, suficiente apenas o tratamento de indivíduos com exames de fezes positivos, porem amplas ações de prevenção das parasitoses intestinais devem ser realizadas, tornando maior a abrangência da rede de água tratada, oferecendo-se a população um efetivo sistema de saneamento básico e ainda, investimento em recursos humanos, para que a partir da educação possamos melhorar os hábitos higiênicos. Medidas isoladas não são capazes de reduzir os elevados índices de contaminação deste grave problema de saúde pública, as parasitoses intestinais.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos a direção do Centro de Atencão Integral à Criança e ao Adolescente - CAIC e da creche Nelo Souza, pela colaboração na coleta do material e a Secretaria Municipal de Saúde - São Joaquim - SC, pela coordenação e incentivo ao nosso trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Campos, C. A. M., Campos, C. M. Prevalência de enteroparasitose na populacão urbana de São Tomé, RN. *Rev. Bras. Med. Trop., 10: 113-7, 1976.*

02. Costa, C. A., Santos, M. V., Rocha, M. O., Mello, R. T., Bodan, M. M. B. Parasitoses intestinais em criancas da creche Leonor Franco (Sesiminas - Contagem - MG) - Diagnóstico e Terapêutica. *Rev. Farm. Bioq. UFMG, 9:7-13, 1988.*

03. De Carl, G. A., & colaboradores. Incidência de enteroparasitoses entre colonos sem terra nos assentamentos de Charqueadas e Capela de Santana no Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Anál. Clín., 26(4): 123-125, 1994.*

04. Konemam, E. W., & colaboradores. *Diagnóstico Microbiológico, 2a ed. São Paulo: Panamericana, 1993, 660 p.*

05. Pessoa, S. B., Martins, A. V. *Parasitologia Médica. 11a ed. Rio de Janeiro*: *Guanabara Koogan*, *1982*, *872* p.

06. Rey, l. *Parasitologia. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731p.*

07. Rocha, M. O., Costa, C. A., Mello, R. T. & Moreira, M. C. C. G. Estudo comparativo da prevalência de parasitoses intestinais em escolares de Belo Horizonte, MG. *Rev. Bras. Anál. Clín., 26(4): 127-129, 1994.*

08. World Health Organization. *Intestinal protozoa and helminthic infections.* Geneva, WHO, 1981 (Technical Report Series, No 666).

TABELA 1
Prevalência global de parasitoses intestinais em escolares
no município de São Joaquim, SC

EXAMES	No ABSOLUTO	PERCENTUAL %
NEGATIVOS	309	77.64
POSITIVOS	89	22.36
TOTAL	398	100.00

TABELA 2
Relação entre o número de exames
e incidência de parasitos

PACIENTES	No ABSOLUTO	PERCENTUAL %
MONOPARASITADOS	77	19.34
BIPARASITADOS	12	3.02
TOTAL	89	22.36

TABELA 3
Prevalência de parasitos intestinais
em pacientes monoparasitados

PARASITOS	No ABSOLUTO	PERCENTUAL %
ASCARIS LUMBRICOIDES	29	7.28
ENTAMOEBA COLI	23	5.77
GIARDIA LAMBLIA	22	5.53
ENTAMOEBA HISTOLYT.	03	0.76
TOTAL	77	19.34

TABELA 4
Principais associações de parasitos encontradas em pacientes biparasitados

PARASITOS	PERCENTUAL %
ENTAMOEBA COLI / GIARDIA LAMBLIA	1.26
ASCARIS LUMBRICOIDES / ENTAMOEBA HISTOLYTICA	0.51
ASCARIS LUMBRICOIDES / GIARDIA LAMBLIA	0.25
ASCARIS LUMBRICOIDES / ENTAMOEBA COLI	0.25
ASCARIS LUMBLICOIDES / TRICOCEPHALUS TRICHIURUS	0.25
GIARDIA LAMBLIA / TRICOCEPHALUS TRICHIURUS	0.25
GIARDIA LAMBLIA / ENTAMOEBA HISTOLYTICA	0.25
ENTAMOEBA COLI / ENTAMOEBA HISTOLYTICA	0.25
TOTAL	3.02