

# RIBAC

## REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

### SUMÁRIO

<b>Plasma-fluoretado comparado ao soro na determinação da glicose sanguínea .....</b>	<b>167</b>
<i>Geraldo Picheth; Maria Cristina Guerra Jaworski; Adriana Pinho Pinto; Marcelo Yukio Kikuti; Marileia Scartezini; Vânia M. Acântara &amp; Cyntia M. T. Fadel-Picheth</i>	
<b>Fluoride-plasma compared with serum in blood glucose determination</b>	<b>171</b>
<b>Controle de qualidade da glicemia: um estudo interlaboratorial .....</b>	<b>171</b>
<i>Geraldo Picheth; Arnaldo A. Yokoo; Fabiane G. M. Rego; Cláudia Dib da Costa; Sandra F. de Melo &amp; Cyntia M.T. Fadel-Picheth</i>	
<b>Quality control for glucose determination: an interlaboratory study</b>	<b>175</b>
<b>Esfregaços endocervicais por escova: avaliação citológica e correlações clínico-colposcópicas .....</b>	<b>175</b>
<i>José Eleutério Junior; Rita de Cássia Carvalho Barbosa; Neyara Nogueira Costa; Ana Beatriz Fontenele Cesar &amp; Suely Bezerra Sampaio</i>	
<b>Endocervical brush smears: cytologic assess and clinical-colposcopic correlation</b>	<b>179</b>
<b>Análise do perfil de resistência de enterobactérias produtoras de <math>\beta</math>-lactamases de espectro ampliado (ESBL) isoladas em João Pessoa, PB .....</b>	<b>179</b>
<i>Luciana Coutinho Honóris, Isabele Beserra Santos; Alexandro Manguiera Lima de Assis &amp; Lauro Santos Filho</i>	
<b>Resistance profile of enterobacteriaceae producing extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamases (ESBL) isolated in João Pessoa/PB, Brazil</b>	<b>183</b>
<b>Exame do líquido pleural nos laboratórios do estado de Santa Catarina .....</b>	<b>183</b>
<i>P. Haas, K. Thiesen &amp; C. L. Vituri</i>	
<b>Pleural liquid examination in the state of Santa Catarina</b>	<b>189</b>
<b>Padronização da técnica antigenemia para a detecção do Citomegalovirus .....</b>	<b>189</b>
<i>L. R. R. V. Tsuchiya; V. M. Hakim; M. B. Nogueira; G. A. R. Takahashi &amp; S. M. Raboni</i>	
<b>Padronization of antigenemia methodology for detection of Citomegalovirus</b>	<b>193</b>
<b>Sistema automatizado para análise de cariótipos humanos .....</b>	<b>193</b>
<i>R. M. C. Brancalhão; P. A. Michel; N. Kunkel; M. A. M. Soares; L. F. C. Ribeiro; A. P. Brandalize; M. R. Cochak; T. L. Costa &amp; A. Largura</i>	
<b>Automated system for human karyotyping</b>	<b>199</b>
<b>Avaliação da fita indicadora de pH na determinação da capacidade tampão da saliva .....</b>	<b>199</b>
<i>Cinthia Regiane Kotaka, Aline Cláudia de Mello, Lourdes Botelho Garcia &amp; Celso Luiz Cardoso</i>	
<b>Evaluation of pH indicator paper in salivary buffer capacity determination</b>	<b>205</b>
<b>Características hematológicas e bioquímicas da doença falciforme no estado do Rio Grande do Norte .....</b>	<b>205</b>
<i>Sandra Rezende de Andrade; Édvis Santos Soares Serafim; Syrllei Rodrigues de Macêdo; Eliene Soares de Albuquerque; Maria Zélia Fernandes; Enildo Alves; Marcos Dias Leão &amp; Tereza Maria Dantas de Medeiros</i>	
<b>Hematological and biochemical features of sickle cell disease in the state of Rio Grande do Norte</b>	<b>211</b>
<b>Diagnóstico fortuito de traço falcêmico em amostra de líquido .....</b>	<b>211</b>
<i>Cláudio Fonseca Saucedo</i>	
<b>Sickle Cell anemia found accidentally in cerebral spinal fluid sample</b>	<b>215</b>
<b>Detecção do vírus da hepatite C: avaliação de três testes de enzaimunoensaio anti-HCV comparados com Ensaio de Imunoblot Recombinante de Segunda Geração (RIBA-2) .....</b>	<b>215</b>
<i>Elvira M. Doi &amp; Geraldo Picheth</i>	
<b>Detection of hepatitis C virus: evaluation of three anti-HCV enzymeimmunoassays compared with Second Generation Recombinant Immunoblot Assay (RIBA-2)</b>	<b>221</b>
<b>Eosinofilia devida a parasitas .....</b>	<b>221</b>
<i>Mário Luiz de la Rue</i>	
<b>Eosinophilia due to parasites</b>	

# 4

VOLUME 33

2001

# Plasma-fluoretado comparado ao soro na determinação da glicose sanguínea\*

## Fluoride-plasma compared with serum in blood glucose determination

Geraldo Picheth<sup>1</sup>; Maria Cristina Guerra Jaworski<sup>2</sup>; Adriana Pinho Pinto<sup>2</sup>; Marcelo Yukio Kikut<sup>2</sup>; Marileia Scartezini<sup>1</sup>; Vânia M. Acântara<sup>1</sup> & Cyntia M.T. Fadel-Picheth<sup>3</sup>

**RESUMO** – Amostras, de plasma (fluoreto de sódio-EDTA, Vacuette, Greiner) e soro (gel separador e ativador de coagulação, Vacuette, Greiner), foram coletadas de 155 pacientes randomicamente selecionados e os resultados da glicose sanguínea comparados. As amostras foram dosadas na mesma bateria de ensaio após 55 a 325 minutos da coleta, utilizando a metodologia da glicose oxidase em sistema automatizado (Vitros 550/750, Johnson & Johnson). O tempo após a coleta foi definido como aquele decorrido entre a punção sanguínea e a centrifugação das amostras. Uma diferença estatística foi encontrada (teste "t", 95% de confiança,  $p < 0,01$ ) mostrando que as amostras de soro apresentaram valores mais elevados do que as amostras de plasma até 240 minutos após a coleta quando mantidas a temperatura ambiente (20 – 28°C). Porém, quando análises para evidenciar diferenças clínicas foram realizadas, pouca ou nenhuma diferença foi observada, em particular se a variabilidade biológica da glicose sanguínea foi considerada. Concluímos que as amostras de soro são adequadas para a determinação da glicemia, considerando o tratamento e o transporte da amostra descritos neste trabalho.

**PALAVRAS-CHAVE** – Fluoreto de sódio, estabilizantes da glicólise, métodos de coleta da amostra, glicemia.

**SUMMARY** – Samples of plasma (sodium fluoride and EDTA, Vacuette, Greiner) and serum (gel and clot activator, Vacuette, Greiner) simultaneously drawn from 155 patients randomly selected were compared for blood glucose measurement. These samples were assayed in the same batch after a delay over a time span of 55 to 325 minutes, using glucose oxidase methodology in automated systems (Vitros 550/750, Johnson & Johnson). The delay time was defined by the time between collection and centrifugation of the samples. A statistic difference was found ("t" test, 95% confidence,  $p < 0.01$ ) showing that serum samples were higher than plasma (fluoride) samples until 240 minutes after being drawn and exposed to room temperature (20 – 28°C). However, when an analysis for clinical differences was performed, little or no significant differences were observed, especially if biological variability for blood glucose was considered. We concluded that serum samples were suitable for glucose measurement with the specimen handling process described in this paper.

**KEYWORDS** – Sodium fluoride; glycolysis stabilizers, blood specimen collection methods, glycemia.

## INTRODUÇÃO

A quantificação da glicose sanguínea constitui um dos ensaios mais freqüentes no laboratório clínico<sup>11</sup>. A confiabilidade do resultado está intimamente correlacionada com os cuidados tomados na fase pré-analítica. Após a coleta da amostra, células presentes no sangue como eritrócitos, leucócitos e plaquetas continuam a degradar a glicose – glicólise – para atender suas necessidades energéticas. A velocidade de consumo da glicose é dependente do número destes elementos figurados presentes, da eventual presença de bactérias e da temperatura em que a amostra se encontra<sup>2</sup>. A Tabela I mostra a magnitude de consumo da glicose, relacionando características da amostra e temperatura em vários estudos.

A utilização de aditivos (Tabela II) para inibir e estabilizar a glicólise vem sendo usada de longa data.

A manose, um carboidrato epímero da glicose, inibe competitivamente a enzima hexoquinase, a primeira enzima do processo de degradação da glicose e permi-

te uma inibição mais precoce da glicólise, podendo ser associada ao fluoreto para uma estabilização mais permanente<sup>4,13</sup>. No entanto a inibição por manose é dose dependente e a possibilidade da presença de glicose como contaminante nos preparados deste açúcar são fatores que tornaram imprópria a sua utilização<sup>14</sup>. O gliceroaldeído também vem sendo estudado como agente estabilizante da glicólise, sem apresentar efeitos importantes em vários outros ensaios laboratoriais<sup>11</sup>.

Entre os agentes químicos utilizados como estabilizantes, também inibidores das enzimas da via glicolítica, os mais utilizados são o fluoreto de sódio e o iodoacetato. O íon fluoreto inibe a enzima enolase, enquanto o iodoacetato inibe a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, respectivamente as oitava e quinta enzimas da via glicolítica<sup>15</sup>. Como estes inibidores não atuam no início da via glicolítica, a estabilização dos níveis de glicose são retardados em cerca de 3 horas após o início da ação destes agentes e mantidos estáveis por até 24 horas<sup>14,19</sup>. A Figura 1 mostra redução da glicose no sangue na presença ou ausência destes agentes.

Recebido em 2/5/2001

Aprovado em 10/8/2001

\*Prêmio DOLES – XV Congresso Latinoamericano de Bioquímica Clínica e XXVIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2001 - Florianópolis, SC

<sup>1</sup>Professores de Bioquímica Clínica – Depto. de Patologia Médica – UFPR;

<sup>2</sup>Farmacêuticos-Bioquímicos do Setor de Bioquímica do Laboratório Frischmann Aisengart - Curitiba - PR;

<sup>3</sup>Professora de Biologia Molecular - Depto. Patologia Médica - UFPR

**TABELA I**  
**Estabilidade da glicose no sangue sem conservante**

Temperatura	Efeito sobre a glicose sangüínea	Referência
4°C	Redução de ~ 2 mg/dL/h	Henry, 1996
TA (~22°C)	Redução de até 24% em neonatos e de até 5% em adultos saudáveis após 1 hora.	Narayanan, 2000
	Redução de 5 a 7% (5 a 10 mg/dL)	Burtis e Ashwood, 1999; Kaplan e Pesce, 1996
	Redução ~ 5 a 10 mg/dL	Henry <i>et al.</i> , 1980
	Redução de ~ 7 mg/dL/h	Henry, 1996
	Reduções de ~ 6% (após 5 minutos); ~ 9% (após 30 minutos); ~ 12% (após 1 hora); ~ 16% (após 2 horas) e ~ 40% (após 4 horas) para sangue heparinizado obtido de adultos	Sonnenwirth e Jarett, 1980
	Redução de 14,4 mg/dL ( $\pm 2,8$ ) após 2 horas	Nakashima <i>et al.</i> , 1987
	Redução de 3,6 mg/dL e 6,0 mg/dL por hora, respectivamente, para adultos e recém-natos	Lin <i>et al.</i> , 1976
	Redução de ~ 12% em 1 hora	Anderson e Cockayne, 1993
37°C	Redução ~ 10 a 20 mg/dL/h	Henry <i>et al.</i> , 1980

TA = Temperatura Ambiente

**TABELA II**  
**Inibidores da glicólise de uso comum**

Agentes	Enzima inibida	Uso
Fluoreto de sódio	enolase	2 a 2,5 mg/mL associado a oxalato (2 mg/mL) ou EDTA (1 mg/mL)
Iodoacetato de sódio	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	0,5 mg/mL + heparina (14,3 U/mL)
Manose	hexoquinase	2 a 3 mg/mL frequentemente associado a fluoreto de sódio (2 mg/mL)

Concentrações em mg por mL de sangue total. Adaptado de Guder *et al.*, 1996 e Narayanan, 2000

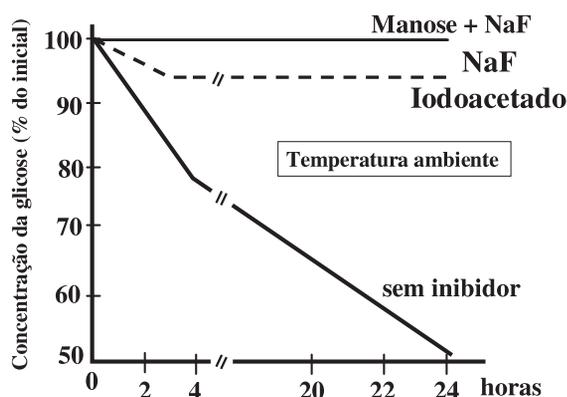


Figura 1. Eficácia dos inibidores da glicólise na preservação da glicose sangüínea em amostras mantidas à temperatura ambiente (adaptado de Guder *et al.*<sup>6</sup>).

O fluoreto de sódio é o agente antiglicolítico mais empregado em nosso meio. Pode ser utilizado isoladamente na concentração de 4,3 mg/mL de sangue ou em menores concentrações (2,5 mg/mL) associado ao oxalato de potássio (2 mg/mL) ou EDTA (sódico ou potássico, 1 mg/mL), o que melhora a ação do fluoreto, que é pouco solúvel e reduz a hemólise quase sempre presente, quando o fluoreto de sódio é utilizado isola-

damente<sup>4,14</sup>. Estudos anteriores, preconizavam a combinação de fluoreto de sódio (10 mg/mL) e timol (1 mg/mL), para melhorar a efetividade na inibição da glicólise e preservação da amostra, sendo a mistura abandonada por interferir em metodologias enzimáticas<sup>7</sup>.

Os procedimentos empregados para prevenir a glicólise, como a rápida separação da amostra, adição de agentes antiglicolíticos, resfriamento ou dosagem imediata da glicose com equipamentos portáteis, apresentam vantagens e limitações<sup>11,18</sup>.

O objetivo deste trabalho é comparar os valores da glicemia em amostras coletadas em presença de fluoreto-EDTA, e sem anticoagulante, na presença de gel separador e ativador da coagulação, em relação ao tempo de realização do ensaio após a coleta.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Plasma fluoretado-EDTA (tubos contendo 3 mg de fluoreto de sódio e 1,8 mg de EDTA por mL de sangue total, Vacuette, Greiner) e soro (tubos contendo gel separador e partículas de sílica micronizadas como ativador de coagulação, Vacuette, Greiner) obtidos na mesma tomada de amostra de 155 indivíduos, sem distinção de sexo,

idade ou patologia, foram selecionados ao acaso para o presente estudo. As amostras provenientes de vários postos de coleta foram transportadas ao laboratório central e mantidas à temperatura ambiente, que variou entre 20 e 28°C durante o experimento. As amostras de soro e plasma foram centrifugadas simultaneamente, e após 5 a 15 minutos da centrifugação as concentrações de glicose foram medidas na mesma bateria de dosagem. O tempo decorrido entre a coleta e a realização do ensaio foi estabelecido com base nos registros das etiquetas dos tubos de coleta (impressas imediatamente antes da coleta por emissão automática do *software* utilizado) e no momento da centrifugação das amostras.

### Dosagem

A glicose foi medida pelo método da glicose oxidase em sistema de Química Seca automatizado Vitros 550 ou 750 (Johnson & Johnson), utilizando reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante. A variabilidade analítica interensaio e intraensaio, respectivamente, para o sistema é de aproximadamente 3,5% e 1,5% como Coeficiente de Variação (CV). Os valores de CV foram obtidos da média das análises de soros controles em prazo superior a um ano.

TABELA III

Estadística descritiva da amostra em estudo. Estão mostrados os resultados obtidos do tempo de permanência da amostra a temperatura ambiente (20 – 28°C) e os resultados das dosagens de glicose nas amostras de plasma-fluoretado e soro

Variáveis (N = 155)	média	mediana	mínimo	máximo	DP
Tempo entre a coleta e o ensaio (minutos)	166,2	160	55	325	49,0
Glicemia no plasma fluoretado (mg/dL)	169,3	147	42	514	82,8
Glicemia no soro (mg/dL)	177,2	155	44	518	86,2

DP = desvio-padrão

TABELA IV

Varição na concentração de glicose nas determinações realizadas em plasma fluoretado e soro, em função do tempo decorrido entre a coleta e o ensaio

Intervalo de tempo entre a coleta e o ensaio	N	Diferença entre a glicemia no plasma-fluoretado e soro			
		teste "t"	p	mg/dL	%
< 120 minutos	21	-6,43	< 0,000003	-8,8	-5,5
121 a 180 minutos	96	-14,2	< 0,000000	-9,2	-5,5
181 a 240 minutos	24	-3,46	0,0021	-5,3	-2,9
> 240 minutos	14	-0,91	0,38	1,8	0,1

## DISCUSSÃO

Historicamente inibidores da glicólise, em particular o fluoreto de sódio, vêm sendo utilizados e recomendados para estabilizar a glicose sanguínea<sup>12</sup>. A possibilidade de utilização do soro em substituição ao plasma-fluoretado na determinação da glicemia apresenta pelo menos três vantagens no laboratório moderno:

- 1) melhor aproveitamento da amostra pela sua utilização em ensaios potencialmente influenciados pela presença do fluoreto e menor volume de sangue a ser coletado,
- 2) redução nos custos da coleta (dispensa do tubo com fluoreto), e
- 3) aumento na produtividade com a redução dos tubos a serem centrifugados e maximização do espaço para as amostras em analisadores automáticos. Em nossa experiência este ganho na produção pode atingir cifras expressivas como 20 a 40% na produtividade do setor de Bioquímica.

Henry<sup>8</sup> recomenda a utilização de soro apenas se este for separado das células dentro de 30 minutos após a coleta, e caso as amostras não apresentem leucocitose marcante ou contaminação bacteriana, o soro seria viável se separado até 90 minutos após a punção venosa. Segundo Burtis e Ashwood<sup>2</sup> provavelmente não é necessário nas análises de rotina o uso de fluoreto se o soro for separado dentro de 60 minutos após a coleta, enfatizando que quantidades marcadamente elevadas de leucócitos podem produzir diferenças de até 65 mg/dL após 1 a 2 horas na amostra não estabilizada.

Neste trabalho amostras randomicamente selecionadas e enviadas ao laboratório central de vários postos de coletas foram comparadas quanto aos valores da glicemia em plasma fluoretado e soro. O objetivo foi avaliar a interferência do transporte de amostras a temperatura ambiente (20 – 28°C) para determinação da glicose em tubos contendo soro na presença de gel separador e ativador da coagulação, sem centrifugação, dos postos de coletas para o laboratório central.

Quando os resultados de 155 amostras ensaiadas entre 55 e 325 minutos após a coleta foram comparados através do teste "t" mostraram diferença significativa (Tabela III,  $p < 0,001$ ) evidenciando que a média no soro foi maior que a do plasma fluoretado.

A variação entre as determinações de glicose no plasma fluoretado (tomado como referência) e soro, evidencia que na amostra estudada, a diferença aumenta inversamente ao tempo de realização do ensaio após a coleta. As dosagens deixaram de ser significativamente

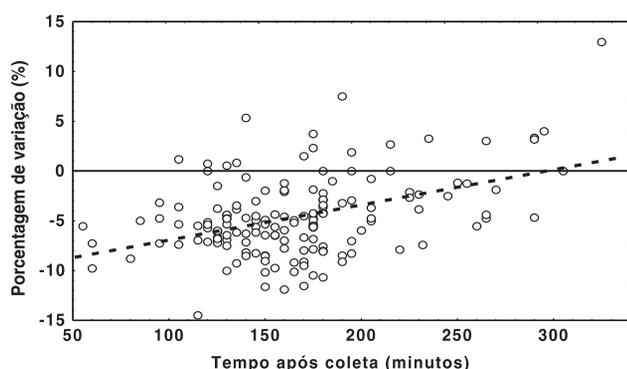


Figura 2. Porcentagem de variação entre a glicemia determinada em plasma fluoretado e soro em relação ao tempo após a coleta. A porcentagem foi calculada como:  $[(\text{plasma fluoretado} - \text{soro})/\text{plasma fluoretado}] \times 100$ . A linha tracejada mostra a reta de regressão entre os pontos.

## Análises estatísticas

Foram realizadas com o software Statistica 5.0.

A variação entre as amostras foi avaliada pela equação:

$$[(\text{plasma-fluoretado} - \text{soro})/\text{plasma-fluoretado}] \times 100$$

O plasma fluoretado foi considerado como referência ou 100%, portanto valores negativos nesta equação indicam amostras em que os valores no soro foram maiores que os obtidos no plasma fluoretado, e valores positivos o contrário.

O limite de mudança significativa foi estimado pela equação:

**média das determinações  $\pm$  2,8 x desvio padrão usual** conforme descrito em Kaplan e Pesce<sup>10</sup>. O desvio padrão usual foi estimado com base no coeficiente de variação de 3,5%. Quando a diferença entre dois resultados superou o limite de mudança significativa (limites de confiança de 95%) estes resultados foram considerados clinicamente diferentes.

## RESULTADOS

A Tabela III apresenta a estatística descritiva da amostra estudada. Quando comparados pelo teste "t", plasma fluoretado e soro apresentaram diferença significativa ( $N = 155$  e  $p < 0,001$ ).

diferentes após o intervalo de 240 minutos ( $p = 0,38$ ) entre a coleta e o ensaio (Tabela IV). O efeito do fluoreto de sódio como estabilizante da glicose não é imediato. Na presença de fluoreto a glicose sofre uma redução contínua – glicólise – até 3 ou 4 horas após a coleta, permanecendo após este tempo estável por até 3 dias<sup>14,20</sup>. Esta redução na glicose é mais acentuada na primeira hora, e vários estudos mostram uma perda de cerca de 9 mg/dL em um período de 3 horas e outros de até 8,1% em até 2 horas<sup>20</sup>.

A estimativa do limite de decisão clínica é uma ferramenta estatística que permite distinguir mudanças nos resultados que são causadas pela variabilidade analítica do ensaio<sup>10</sup>. Os limites para mudanças significativas foram calculados pela média  $\pm 2,8$  x desvio padrão usual, considerando um CV analítico de 3,5%. Apenas sete amostras (4,5% do total) apresentaram mudança significativa dentro dos critérios descritos, com diferenças (em mg/dL) entre plasma fluoretado e soro de -26, -25, -24, -15, -10, -9 e +7. As diferenças clinicamente relevantes, segundo Zhang *et al.*<sup>21</sup>, devem ser calculadas não apenas com o coeficiente de variação analítico, mas também devem considerar o efeito da variabilidade biológica intraindividual. Dados obtidos da literatura<sup>5,16</sup> evidenciam para a glicemia um coeficiente de variação biológico intraindividual médio de cerca de 10%. Quando aplicado apenas o coeficiente de variação biológico intraindividual médio (10%) na discriminação de diferenças clinicamente relevantes, não foi observado nenhum resultado diferente entre plasma e soro na amostra estudada.

Nossos achados diferem daqueles descritos por Szazama *et al.*<sup>17</sup>, que ao compararem soro com plasma obtido com fluoreto/oxalato observaram valores maiores para o plasma de 4,2 mg/dL  $\pm$  3,5 (média  $\pm$  desvio padrão) em relação ao soro. Uma diferença relevante entre os trabalhos, é a utilização do gel separador e do ativador de coagulação no tubo de coleta do soro, no presente estudo. Sugerimos a possibilidade de que, apenas um ou ambos, destes componentes em contato com o sangue apresentem um efeito de retardar a glicólise. Também a possibilidade da menor difusão ou disponibilidade da glicose para as células nas amostras coletadas em tubo com gel, decorrente do processo de coagulação, pode ser postulado para explicar este achado.

Zhang *et al.*<sup>21</sup> ao estudarem o efeito do tempo de contato soro/coágulo relatam diferenças clínicas nos níveis de glicose após 3 horas de contato com o coágulo em amostras mantidas a 32°C. No presente trabalho, o transporte das amostras transcorreu em temperaturas variando entre 20 a 28°C, sem que variações clinicamente significativas fossem observadas. Situações clínicas que aumentam a velocidade de glicólise no sangue, como elevadas contagens de leucócitos (ex. leucoses) ou eritrócitos (ex. recém-natos) não se beneficiam da utilização do fluoreto de sódio como estabilizante da glicólise por este atuar de forma efetiva apenas após 3 a 4 horas da coleta. Recomenda-se nestas situações particulares o imediato resfriamento da amostra de sangue pela sua colocação sobre gelo, mantendo-a nestas condições durante o transporte. Lin *et al.*<sup>12</sup> observaram uma redução da glicose de 3,6 mg/dL/hora em adultos e 6,0 mg/dL/hora em recém-natos com as amostras mantidas à temperatura am-

biente, sendo que o mesmo experimento realizado com amostras mantidas em gelo, a velocidade de consumo da glicose foi, respectivamente, de 0,39 mg/dL/hora e 1,1 mg/dL/hora, para adultos e recém-natos.

Em resumo, quando através da determinação de glicose, comparamos amostras de plasma fluoretado e soro coletado em tubo contendo gel separador e ativador de coagulação, observou-se na amostra estudada, níveis em média maiores nos soros, em cerca de 5 a 8 mg/dL, até 3 horas após a coleta. Embora estatisticamente diferentes ( $p < 0,01$ ) até 4 horas após a coleta, as diferenças observadas não são clinicamente significativas quando a variabilidade biológica da glicemia é considerada. Concluímos que mantidas as condições de transporte da amostra descritas neste trabalho, soro coletado em tubo com gel separador e ativador da coagulação é adequado para a determinação da glicemia, em amostras de rotina.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Análises Clínicas Frischmann Aisengart, Curitiba-PR, pelas amostras, reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Anderson, S. C.; Cockayne, S. *Clinical chemistry. Concepts and applications*. Philadelphia: Saunders, 1993.
2. Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. (ED.) *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999.
3. Chan, A. Y.; Ho, C. S.; Chan, T. Y.; Swaminathan, R. D-mannose as a preservative of glucose in blood samples. *Clin. Chem.*, 38(3):41-3, 1992.
4. Chan, A. Y.; Swaminathan, R.; Cockram, C. S. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin. Chem.*, 35(2):315-7, 1989.
5. Fraser, C. G. Biological variation in clinical chemistry. An update: collected data, 1988-1991. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 116(9): 916-23, 1992.
6. Guder, W.G.; Narayanan, S.; Wisser, H.; Zawta, B. *Samples from patients to laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results*. Darmstadt: Git Verlag, p. 34-5, 1996.
7. Henry, R. J. *Química clínica. Princípios y técnicas*. v.2, Barcelona: Editorial Jims, p.745-5, 1969.
8. Henry, J. B. (ED.) *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 19th ed. Philadelphia: Saunders, 1996.
9. Henry, R. J.; Cannon, D. C.; Winkelman, J. W. *Química clínica. Princípios y técnicas*. 2nd ed. Barcelona: Editorial Jims, 1980.
10. Kaplan, L. A.; Pesce, A. J. *Clinical chemistry. Theory, analysis, correlation*. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1996.
11. Landt, M. Glycerinaldehyde preserves glucose concentrations in whole blood specimens. *Clin. Chem.*, 46(8):1122-49, 2000.
12. Lin, Y. L.; Smith, C. H.; Dietzler, D. N. Stabilization of blood glucose by cooling with ice: an effective procedure for preservation of samples from adults and newborns. *Clin. Chem.*, 22(12):2031-3, 1976.
13. Nakashima, K.; Takei, H.; Nasu, Y.; Andoh, Y. D-mannose as a preservative of glucose in blood samples. *Clin. Chem.*, 33(5):708-10, 1987.
14. Narayanan, S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am. J. Clin. Pathol.*, 113(3):429-52, 2000.
15. Nelson, D. L.; Cox, M. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000.
16. Ricós, C.; Jiménez, C. V.; Hernández, A.; Simón, M.; Perich, C.; Alvarez, V.; Minchinela, J.; Maciá, M. Biological variation in urine samples used for analyte measurements. *Clin. Chem.*, 40(3):472-7, 1994.
17. Szazama, K.; Robertson, E. A.; Chesler, R. A. Is antiglycolysis required for routine glucose analysis? *Clin. Chem.*, 25(12):2038-9, 1979.
18. Sonnenwirth, A. C.; Jarett, L. *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. 8th ed. St. Louis: Mosby, p.221-3, 1980.
19. Tietz, N. W. (ED.) *Clinical guide to laboratory testes*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1995.
20. Young, D. S. *Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests*. 2nd ed. Washington: AACC Press, 1997.
21. Zhang, D. J.; Elswick, R. K.; Miller, W. G.; Bailey, J. L. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results. *Clin. Chem.*, 44(6):1325-33, 1998.

Endereço para correspondência:

Prof. Geraldo Picheth

Disciplina de Bioquímica Clínica - Depto. de Patologia Médica - UFPR

Rua Prof. Lothário Meissner, 3400 - Subsele do Setor de Saúde - Jd. Botânico 80210-170 - Curitiba-PR - E-mail: gpicheth@subsele.ufpr.br

# Controle de qualidade da glicemia: um estudo interlaboratorial\*

## Quality control for glucose determination: an interlaboratory study

Geraldo Picheth<sup>1</sup>; Arnaldo A. Yokoo<sup>2</sup>; Fabiane G. M. Rego<sup>3</sup>; Cláudia Dib da Costa<sup>4</sup>; Sandra F. de Melo<sup>5</sup> & Cyntia M.T. Fadel-Picheth<sup>6</sup>

**RESUMO** – A performance de 36 laboratórios da região Sul do Brasil, que voluntariamente participaram neste estudo, foi avaliada através da quantificação da glicose. As amostras analisadas continham glicose, dissolvida em ácido benzóico saturado e 25% de glicerol, nas concentrações de 20, 200 e 1000 mg/dL. O erro total máximo permitido nas determinações foi estabelecido como 10% do valor esperado ou  $\pm 6$  mg/dL, o que for maior, como recomendado pelo critério do CLIA. As metodologias empregadas neste estudo foram glicose oxidase (80%), hexoquinase (17%) e glicose desidrogenase (3%). Para a amostra contendo 20 mg/dL de glicose, 8,4% dos laboratórios apresentaram resultados fora dos limites permitidos. Para a amostra de 200 mg/dL, 25,7% dos laboratórios relataram resultados incorretos, sendo importante ressaltar que o aprimoramento da qualidade analítica em valores próximos a esta concentração é necessário para o diagnóstico e monitoramento dos pacientes com diabetes. A amostra contendo a maior concentração de glicose (1000 mg/dL) foi incorretamente reportada por 55,9% dos participantes e os resultados mostraram uma forte tendência para resultados abaixo da concentração real. Apenas 38,8% dos laboratórios avaliados neste estudo atingiram simultaneamente resultados dentro dos limites de erro estabelecido nas três amostras analisadas.

**PALAVRAS-CHAVE** – Controle de Qualidade; glicemia; estudo interlaboratorial.

**SUMMARY** – The performance of 36 laboratories from Southern Brazil, which voluntarily participated in this study, was analyzed considering the measurement of glucose levels. The samples analyzed contained glucose, in concentrations of 20, 200 and 1000 mg/dL, dissolved in saturated benzoic acid plus 25% of glycerol. The CLIA criterion that recommends 10% or 6 mg/dL (whichever greater) for total allowable error limits for glucose was used. The methodologies used by the participants (express in %) were glucose oxidase (80%), hexokinase (17%) and glucose dehydrogenase (3%). For the samples containing 20 mg/dL glucose, the results of 8.4% of the laboratories were out of the permissible limit range. For the 200 mg/dL samples, 25.7% of the reports were unacceptable. Nevertheless it is important to remember that an improved analytical quality around this concentration is necessary for an accurate diabetes diagnosis and its management. The highest glucose level tested (1000 mg/dL) was incorrectly reported by 55.9% of the participants and the results showed a strong tendency for lower values. Only 38.8% of the laboratories evaluated in this study achieved the correct values simultaneously in the three samples analyzed.

**KEYWORDS** – Quality Control, glycemia, interlaboratory study.

## INTRODUÇÃO

A determinação da glicose em líquidos biológicos é um dos ensaios com maior frequência realizados no laboratório clínico<sup>1</sup>. Em situações patológicas os valores da glicemia podem sofrer alterações significativas em relação aos níveis de referência. Hipoglicemias, por exemplo, podem transcorrer com níveis de glicose sanguínea inferiores a 20 mg/dL e no coma não cetótico hiperosmolar pode-se encontrar valores superiores a 1000 mg/dL<sup>1</sup>.

O controle de qualidade na determinação de glicose deve abranger a ampla faixa diagnóstica deste

analito, avaliando além da consistência, a sensibilidade e linearidade dos procedimentos metodológicos. Carey *et al.*<sup>3</sup>, propõem que a glicemia seja monitorada em seus principais níveis de decisão clínica recomendando:

- 50 mg/dL relacionado a hipoglicemia;
- 126 mg/dL relacionado ao diagnóstico do *Diabetes mellitus* pela glicemia em jejum;
- 200 mg/dL relacionado ao diagnóstico do *Diabetes mellitus* pela curva glicêmica, e
- 300 mg/dL relacionado à terapia insulínica.

Os programas de Controle de Qualidade externos como os realizados pela Sociedade Brasileira de Aná-

Recebido em 2/5/2001  
Aprovado em 10/8/2001

\*Prêmio DOLES – XV Congresso Latinoamericano de Bioquímica Clínica e XXVIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2001 - Florianópolis, SC

<sup>1</sup>Professor de Bioquímica Clínica – Universidade Federal do Paraná; <sup>2</sup>Sócio gerente do Laboratório de Análises Clínicas Champagnat;

<sup>3</sup>Professora de Bioquímica – UNIANDRADE; <sup>4</sup>Professora de Bioquímica – UNIANDRADE, Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório da Pref. Mun. de Curitiba;

<sup>5</sup>Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório do Hospital de Clínicas – UFPR; <sup>6</sup>Professora de Bacteriologia Clínica e Biologia Molecular – Univ. Federal do Paraná

lises Clínicas (SBAC, programa PNCQ), Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SPBC, programa PELM) e *College of American Pathologists* (CAP, Survey), monitoram a determinação da glicemia através da comparação dos resultados de amostras de soros controles. As concentrações de glicose nestes controles oscilam entre 50 a 100 mg/dL, valores dentro da referência a valores elevados (usualmente inferiores a 300 mg/dL). Se o laboratório clínico não tiver um programa próprio de controle de qualidade para valores de glicemia abrangendo níveis diferentes dos citados acima, as performances do sistema em toda sua amplitude não serão conhecidas.

A análise dos resultados de trinta e seis laboratórios, que voluntariamente participaram deste estudo interlaboratorial, no qual foram utilizados padrões de glicose nas concentrações de 20, 200 e 1000 mg/dL, é discutida.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Soluções de glicose (D(+)-glicose anidra, Merck, cat n° 108337) foram preparadas em ácido benzóico saturado contendo 25% de glicerol, nas concentrações de 20, 200 e 1000 mg/dL. Estas soluções mostraram-se estáveis por pelo menos 6 meses quando estocadas a 4°C e no mínimo 30 dias a temperatura ambiente em frascos fechados. Quantificações utilizando glicose oxidase, realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR validaram as preparações. As soluções foram acondicionadas em tubos de 1,5 mL do tipo Eppendorf identificados por cores (vermelho, azul e amarelo) de forma a não caracterizar suas concentrações. Os laboratórios que participaram no trabalho foram identificados por números seqüenciais de 1 a 36 segundo a ordem de recebimento dos resultados, sendo que estes não continham a caracterização da instituição que realizou a dosagem.

### Procedimento

Todos os participantes do estudo foram orientados para:

- manter as amostras a temperatura ambiente no mínimo 30 minutos antes do ensaio e homogeneizá-las por inversão antes do uso;
- proceder às dosagens das três amostras de forma idêntica aquelas presentes na rotina para a determinação da glicose,
- reportar os resultados em mg/dL,
- indicar qual o princípio metodológico empregado e,
- caracterizar se a determinação foi manual ou automatizada.

### Limites aceitáveis de erro

Foram considerados valores de meta as concentrações das soluções de glicose fornecidas ou seja 20, 200 e 1000 mg/dL. Os critérios estabelecidos pelo CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments, 1992)

foram utilizados como limites aceitáveis de erro, sendo estes 10% ou 6mg/dL do valor de meta (o que for maior) como descrito em Kaplan e Pesce<sup>10</sup>, e Brooks<sup>2</sup>. Portanto os limites de erro permitidos foram: 14 a 26 mg/dL para a solução de 20 mg/dL, 180 a 220 mg/dL para a solução de 200 mg/dL e 900 a 1100 mg/dL para a solução de 1000 mg/dL.

### Análises estatísticas e gráficos

Foram realizadas com o *software* Statistica v. 5.0.

## RESULTADOS

Os resultados de trinta participantes deste estudo foram encaminhados por fax para a coordenação do projeto e seis participantes entregaram seus dados posteriormente, perfazendo um total de trinta e seis laboratórios (N = 36). Um laboratório relatou a perda do controle de 200 mg/dL, por vazamento durante o transporte, portanto configurando um "N" para este controle de 35. Dois laboratórios não reportaram os resultados do controle de 1000 mg/dL, assinalando como resposta "acima da linearidade" ou "não pode ser dosado", fornecendo um "N" para este controle de 34. Um laboratório não reportou o método e o sistema analítico empregados, configurando um "N" de 35 para este tópico. Este estudo foi realizado no segundo semestre de 1999 e os 36 laboratórios participantes estão situados essencialmente nos estados do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil.

Os métodos e o sistema de análise empregados pelos laboratórios participantes estão apresentados na Tabela I.

As performances dos laboratórios participantes deste trabalho em relação aos limites aceitáveis de erro estabelecidos podem ser observados nas Figuras 1 a 3. A ausência de um resultado indica que não houve reporte deste dado pelo laboratório.

A Tabela II mostra as freqüências de resultados classificados como aceitáveis e não aceitáveis, considerando-se os limites de erro permitidos assumidos neste estudo. Associado aos resultados não aceitáveis encontra-se o sistema analítico utilizado no ensaio.

Um teste de qui-quadrado não mostrou diferença significativa ( $\chi^2$ ,  $p > 0,57$ ), quando os resultados não aceitáveis foram analisados em relação ao sistema de análise, como observado na Tabela III.

## DISCUSSÃO

A glicose sangüínea é um parâmetro bioquímico susceptível a amplas e rápidas variações em alguns estados patológicos. Valores díspares como 20 ou 1000 mg/dL podem ser encontrados na rotina, em especial no ambiente hospitalar<sup>8,12</sup>.

Neste trabalho, procuramos de modo diferenciado, avaliar a performance analítica em concentrações não usuais de glicose através da quantificação de soluções aquosas de glicose estabilizadas com ácido benzóico e glicerol.

**TABELA I**  
Métodos e sistemas analíticos empregados pelos laboratórios participantes do estudo

Métodos	N	%	Sistemas	N	%
Glicose Oxidase	28	80	Manual	13	37
Hexoquinase	6	17	Automatizado	22	63
Glicose desidrogenase	1	3			

N = número de laboratórios

**TABELA II**  
Frequência de resultados aceitáveis e não aceitáveis considerando os limites de erros estabelecidos (CLIA, 10% do valor alvo ou 6 mg/dL, o que for maior)

Controles	N	Resultados aceitáveis		Resultados não aceitáveis	
		N	%	N	%
20 mg/dL	36	33	91,6	3	8,4
200 mg/dL	35	26	74,3	9	25,7
1000 mg/dL	34	15	44,1	19	55,9

**TABELA III**  
Comparação entre os sistemas manual e automatizado nas frequências de resultados não aceitáveis.

Controles	Manual	Automação	$\chi^2$
20 mg/dL	2	1	
200 mg/dL	5	4	
1000 mg/dL	10	9	

A maioria dos laboratórios (80%) que voluntariamente participou deste levantamento, realizou as determinações utilizando o método com glicose oxidase, sendo que apenas um laboratório utilizou a metodologia com glicose desidrogenase (3%), como observado na Tabela I. Este perfil difere dos laboratórios norte americanos que participam dos programas de proficiência do CAP, onde o ensaio com hexoquinase U.V. é empregado por mais de 50% dos participantes<sup>4</sup>.

A maioria dos laboratórios (63%) reporta a utilização de sistemas automatizados, dado que corrobora com a observação de um inegável crescimento tecnológico nos últimos anos.

O limite aceitável de erro proposto pelo CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments, lei federal norte americana editada pela primeira vez em 1988 e submetida a alterações em 1992), utilizado neste trabalho, foi uma escolha arbitrária, que teve como base à ampla utilização destes critérios a mais de uma década por vários laboratórios Norte Americanos. Os critérios do CLIA apresentam limites fixos como critérios de proficiência analítica suficientemente amplos para uma aplicação generalizada<sup>5</sup>. Critérios europeus que especificam o erro total permitido com base em variabilidade biológica<sup>6,7</sup> são mais restritivos, tolerando variações de 5,5 a 8,0% de erro total para a glicose sérica, que os utilizados no presente estudo.

Aplicando os critérios do CLIA, três laboratórios (8,4% do total) forneceram resultados não aceitáveis para a amostra contendo 20 mg/dL (Fig. 1). Os resultados sugerem que hipoglicemias estão sendo detec-

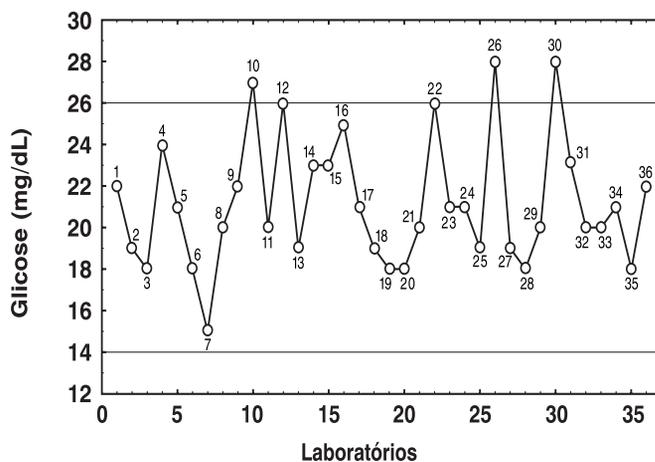


Figura 1 - Resultados das dosagens da solução de glicose 20 mg/dL obtidos de 36 laboratórios. As linhas cheias horizontais indicam os limites aceitáveis de erro ( $\pm 6$  mg/dL em relação ao valor do controle)

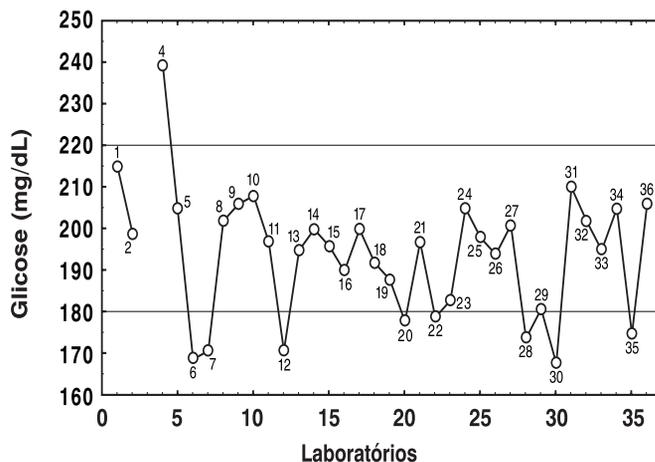


Figura 2 - Resultados das dosagens da solução de glicose 200 mg/dL obtidos de 35 laboratórios. As linhas cheias horizontais indicam os limites aceitáveis de erro ( $\pm 10\%$  em relação ao valor do controle)

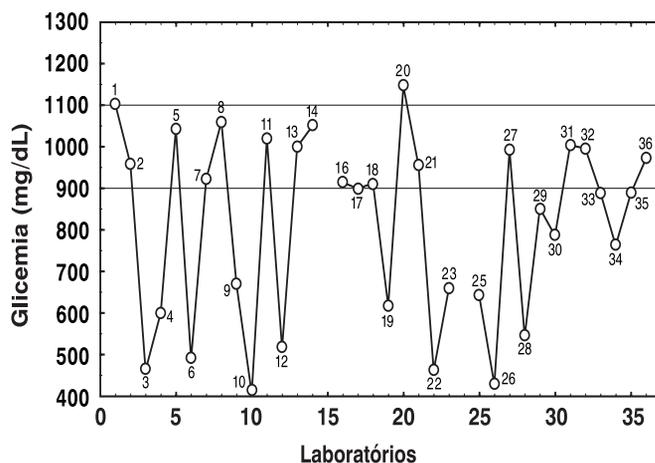


Figura 3 - Resultados das dosagens da solução de glicose 1000 mg/dL obtidos de 34 laboratórios. As linhas cheias horizontais indicam os limites aceitáveis de erro ( $\pm 10\%$  em relação ao valor do controle)

tadas com eficiência pela maioria dos participantes. Em relação as três amostras de controles avaliadas, a de 20 mg/dL foi a que apresentou maior percentual de resultados aceitáveis (91,6%, Tab. II). Uma possível explicação para o fato esta no próprio critério de exclu-

são utilizado. O CLIA recomenda para este nível de glicose valores fixos  $\pm 6$  mg/dL como limites aceitáveis de erro, o que produz uma aceitação de resultados com uma variação de até  $\pm 30\%$  em relação ao valor alvo, uma tolerância muito superior aos 10% aplicados às demais amostras de controle em estudo.

Para a amostra de 200 mg/dL os laboratórios mostraram 25,7% de resultados não aceitáveis (Fig. II, Tab. II). Este é um achado preocupante em termos de relevância clínica, considerando que a concentração de 200 mg/dL é um ponto importante de decisão no diagnóstico do diabetes e o expressivo número de laboratórios que não atingiu os limites desejáveis. Também é pertinente ressaltar que este nível de glicose é avaliado pelos programas de Controle de Qualidade mais utilizados em nosso meio como os patrocinados pela SBAC e SBPC.

Valores extremamente elevados como os encontrados na amostra de 1000 mg/dL não são usuais no laboratório clínico em relação à glicemia. Concentrações de glicose nestes níveis são mais facilmente observadas nas amostras de urinas de pacientes diabéticos. Mais da metade dos participantes (55,9%) não atingiram os valores desejáveis (Fig 3 e Tab. II). Entre os dezenove laboratórios que não atingiram o desejável nesta amostra, apenas dois reportaram resultados acima dos limites, com os demais dezessete, mostrando resultados abaixo do estabelecido. Esta tendência pode refletir uma específica falta de atenção no tratamento de amostras que superam a linearidade dos métodos empregados (usualmente entre 400 e 700 mg/dL para a glicose), e/ou a erros decorrentes de falhas na correção da diluição empregada, ou mesmo na transcrição do resultado.

Jenny e Jackson-Tarentino<sup>9</sup> categorizam os erros nos testes laboratoriais como: desvios na calibração; desvios (*bias*) metodológicos; erros no reporte das amplitudes metodológicas; instabilidade, e erros ao acaso. Os citados autores relatam os desvios ou erros na calibração como responsáveis pela maioria dos erros (48% do total) em performances de proficiência analítica, sendo as demais categorias, individualmente, responsáveis por 8 a 14% do erro encontrado.

Um caso particular de insucesso em atingir os limites exigidos pode estar na incompatibilidade entre as amostras utilizadas e o sistema reacional (reagente/equipamento) empregado na dosagem. Pudemos documentar este achado em apenas um laboratório, que utilizando o sistema de Química Seca (Vitros, Johnson & Johnson), reportou resultados incorretos (mais baixos) na presença das amostras em estudo, possivelmente decorrente da interferência do diluente utilizado e/ou da viscosidade da amostra. Este fenômeno não foi observado em sistemas manuais e nos analisadores Cobas mira (Roche), Hitachi 911 (Roche), Mega (Merck), Selectra II (Bayer) e Dimension (Dade) avaliados pelos autores deste trabalho (dados não mostrados).

Apenas quatorze laboratórios (38,8% do total) reportaram e atingiram a performance desejada simultaneamente nas três amostras em estudo. Não foi ob-

servada nenhuma correlação entre o sistema analítico, manual ou automatizado, com o insucesso nas dosagens quando as frequências foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (Tab. III). A qualidade analítica é uma parte do processo de qualidade total como ressaltado por Witte *et al.*<sup>13</sup>, que recomendam uma parceria entre laboratórios, indústrias e órgãos reguladores com o objetivo de ampliar a credibilidade dos resultados laboratoriais.

Estudos interlaboratoriais, como o aqui apresentado, permitem a comparação dos resultados entre vários sistemas e são formas práticas para a busca da exatidão e do aprimoramento analítico. Os laboratórios que participaram deste estudo passaram a conhecer melhor seu desempenho na dosagem de um dos principais analitos, em níveis não usuais, e receberam um estímulo objetivo para aprimorar seus sistemas de Controle de Qualidade.

Em síntese, a avaliação da quantificação da glicose, utilizando soluções estabilizadas deste açúcar em concentrações de 20, 200 e 1000 mg/dL, em trinta e seis laboratórios mostrou que a maioria dos participantes (cerca de 60%) necessita aprimorar os procedimentos de Controle de Qualidade objetivando acurácia analítica e a relevância clínica dos resultados.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a todos os laboratórios que participaram deste estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. (ED.) *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999.
2. Brooks, Z. C. *Quality control in six simple steps*. Washington: AACC Press, 1998, p.77-97.
3. Carey, R. N.; Garber, C. C.; Koch, D. D. *Concepts and practices in the evaluation of laboratory methods*. Chicago: AACC Workshop, 1998.
4. College of American Pathologists (CAP) – Survey CC, 2000.
5. Ehrmeyer, S. S.; Laessig, R. H.; Leinweber, J. E.; Oryall, J. J. 1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass. *Clin. Chem.*, 36:1736-1740, 1990.
6. Fraser, C. G. Biological variation in clinical chemistry. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 116:916-923, 1992.
7. Fraser, C. G.; Petersen, P. H.; Ricos, C.; Haeckel, R. Proposed quality specifications for imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 30:311-317, 1992.
8. Goldman, L.; Bennett, J. C. (ED.) *Cecil Textbook of medicine*. 21st ed., Philadelphia: Saunders, 2000, p.1277.
9. Jenny, R. W.; Jackson-Tarentino, K. Y. Causes of unsatisfactory performance in proficiency testing. *Clin. Chem.*, 46:89-99, 2000.
10. Kaplan, L. A.; Pesce, A. J. *Clinical chemistry. Theory, analysis, correlation*. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1996.
11. Landt, M. Glyceraldehyde preserves glucose concentrations in whole blood specimens. *Clin. Chem.*, 46:1122-1149, 2000.
12. Marshall, W. J.; Bangert, S. K. (ED.) *Clinical Biochemistry. Metabolic and clinical aspects*. New York: Churchill Livingstone, 1995, p.277.
13. Witte, D. L.; Vanness, S. A.; Angstadt, D. S.; Pennell, B. J. Errors, mistakes, blunders, outliers, or unacceptable results: how many? *Clin. Chem.*, 43:1352-1356, 1997.

Endereço para correspondência:

Prof. Geraldo Picheth

Disciplina de Bioquímica Clínica

Depto. de Patologia Médica - Universidade Federal do Paraná

Rua Prof. Lothário Meissner, 3400 - Jd. Botânico - 80210-170 - Curitiba - PR

E-mail: gpicheth@subsede.ufpr.br

# Esfregaços endocervicais por escova: avaliação citológica e correlações clínico-colposcópicas

## Endocervical brush smears: cytologic assess and clinical-colposcopic correlation

José Eleutério Junior<sup>1</sup>; Rita de Cássia Carvalho Barbosa<sup>1</sup>; Neyara Nogueira Costa<sup>2</sup>;  
Ana Beatriz Fontenele Cesar<sup>3</sup> & Suely Bezerra Sampaio<sup>3</sup>

**RESUMO** – Foram avaliados no serviço de citologia clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE), da Universidade Federal do Ceará (UFC), esfregaços de 94 pacientes que procuraram o serviço de ginecologia do Hospital Geral do Exército de Fortaleza, corados por método de Papanicolaou e analisados. Na amostragem, a idade média das pacientes foi de 35,5 anos. A busca de exame rotineiro de prevenção foi o motivo de consulta em muitas delas (44,68%). Todas foram submetidas a exame de colposcopia, que evidenciou desde achados normais até alterações definidas como ZTA (zona de transformação atípica). Dentre os achados do exame de Papanicolaou figuraram: normalidade (58,51%); cervicite aguda (20,21%); cervicite crônica (11,7%); reparo (6,38%); atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) (2,13%) e metaplasia tubal (1,06%). Foi ainda observada a presença de células glandulares endocervicais ciliadas em 13,83 % de todos os esfregaços, a maioria evidenciada na ausência de processos inflamatórios.

**PALAVRAS-CHAVE** – Endocérvice, esfregaço, Papanicolaou.

**SUMMARY** – The authors studied smears of 94 patients, from gynecologic service at Hospital Geral do Exército de Fortaleza, in clinical cytology laboratory at Toxicological and Clinical Analysis Department, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE), Universidade Federal do Ceará (UFC). The mean of age was 35.5 years old. Forty four point six eight per cent had no symptoms. All them were submitted to colposcopy that showed normal to abnormal findings. The Pap smears showed: normality (58.51%), acute cervicitis (20.21%), chronic cervicitis (11.7%), repair (6.38%), ASCUS (2.3%) and tubal metaplasia (1.06%). Ciliated endocervical cells was observed in 13.83% of the smears, principally without aspects of inflammation.

**KEYWORDS** – Endocervix, smear, Papanicolaou.

### INTRODUÇÃO

Anatomicamente o útero é composto por duas regiões divididas por seu istmo, o corpo e o colo. O colo é dividido pelo orifício externo em ectocérvice (em contato com a vagina) e endocérvice (canal cervical), e teria importantes peculiaridades, que o faz ser visto, à luz da fisiopatologia, quase que como um órgão independente<sup>2,3,8</sup>. Histologicamente o colo uterino possui dois epitélios de origem embriológica distinta. O que reveste a ectocérvice é o epitélio escamoso estratificado não queratinizado, para alguns com origem no seio urogenital, e o que reveste a endocérvice é o epitélio cilíndrico simples, oriundo dos ductos de Müller<sup>2,3,6,8,18</sup>. Esta peculiaridade de possuir dois epitélios em íntima junção, enseja um dinamismo próprio<sup>3,4,6,8,14,18</sup>, que provém da potencial modificação na localização da junção destes epitélios, denominada junção escamo-colunar. Em meio a esse processo, alguns reparos histológicos tornam-se necessários fren-

te a estímulos e lesões, como é o processo de metaplasia escamosa, que estaria intimamente envolvido com a criação de um novo epitélio escamoso denominado zona de transformação, onde tendem a aparecer as neoplasias escamosas<sup>3,6,8,18</sup>.

É de conhecimento universal que alguns patógenos têm preferência por epitélio glandular, ficando por vezes ao largo de colheitas rotineiras por espátula de Ayre. Isso é perfeitamente estendido às lesões neoplásicas, onde uma colheita não dirigida pode deixar passar uma lesão mais proximal<sup>1,10,13</sup>. Dentre os processos infecciosos estão, principalmente, aqueles causados por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*. Sua prevalência entre nós é desconhecida, embora estudos em outros centros tenham demonstrado ser entre 0,8 e 2,0%<sup>3,6,8,14,18</sup>, entretantes alguns relatam até 25% em mulheres sintomáticas e 21% em assintomáticas<sup>7</sup>. O custo de tais processos infecciosos passa despercebido, uma vez que são na maioria assintomáticos, podendo inclusive comprometer a possibilidade

Recebido em 6/6/2001  
Aprovado em 13/8/2001

<sup>1</sup>Professor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Universidade Federal do Ceará

<sup>2</sup>Estudante de Análises Clínicas – Universidade Federal do Ceará; <sup>3</sup>Médica do Hospital Geral do Exército de Fortaleza

de gestação, posto que uma de suas complicações é a salpingite crônica com a conseqüente disfunção tubária no processo de captação e progressão ovular<sup>2,3,6,7,8,14,18</sup>.

Ao mesmo tempo, o epitélio glandular, embora pareça menos freqüentemente albergar condições neoplásicas que o escamoso, tem ultimamente sido motivo de estudos no mundo todo, devido o aumento de incidência de adenocarcinomas, em contrapartida aos carcinomas escamosos que têm tido certa redução na freqüência em países com política preventiva séria para o carcinoma do colo do útero<sup>4,5,8,11,12,14,15,18</sup>. Estima-se que neoplasias endocervicais correspondam a 10 % dos cânceres do colo uterino, com um potencial para aumento desta incidência, quer por razões próprias, quer por melhoria de métodos diagnósticos<sup>2,3,4,5,6,8,12,14,15,18</sup>.

Frente a tais fatos a ASCCP (*American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) através da *ASCCP guidelines* sugere que o escovado teria um importante papel em escrutínio de lesões endocervicais, com uma sensibilidade melhor que a curetagem endocervical, embora uma menor especificidade<sup>4</sup>.

Deste modo é objetivo do presente trabalho a observação de fenômenos de epitélio glandular endocervical que possam de alguma forma passar despercebidos em exames colpocitológicos de rotina, valorizando a colheita direta por escova no diagnóstico e escrutínio de patologias do colo uterino.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 96 esfregaços citológicos colhidos por escova (cytobrush®) de pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia geral do Hospital Geral do Exército de Fortaleza, através de convênio firmado entre o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Universidade Federal do Ceará e aquela instituição. A população assistida consistia de mulheres entre 17 e 75 anos, atendidas no período de julho 1999 a janeiro de 2000.

Os esfregaços confeccionados foram fixados em álcool etílico a 95%. O material foi enviado para o setor de métodos e técnicas de análises citológicas do DACT

onde as lâminas foram submetidas a método colorimétrico de Papanicolaou e analisadas obedecendo-se os preceitos do Sistema Bethesda (1991)<sup>8</sup>.

Dados epidemiológicos, clínicos e colposcópicos são confrontados com estudos citológicos. O projeto de pesquisa foi aprovado pelos colegiados do DACT e da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

## RESULTADOS

As 94 pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia geral do Hospital Geral do Exército de Fortaleza, tinham idade média de 35,5 anos (variando de 17 a 75 anos), e um número médio de gestações de 2,11, com uma moda de 2 (variando de 0 a 9). Em sua maioria procuraram o serviço para consulta de rotina (44,68%), seguindo-se de outros motivos, tais como: corrimento, prurido, odor fétido, controle de tratamento, história de HPV, uso de terapia de reposição hormonal, etc. (Figura 1). Todas foram submetidas a exame de colposcopia, que evidenciou desde achados normais até alterações definidas como ZTA (zona de transformação atípica), conforme pode ser observado na Figura 2.

No estudo citopatológico de esfregaços corados pelo método de Papanicolaou, os achados na amostragem geral foram os seguintes: aspectos condizentes com a normalidade (58,51%); cervicite aguda (20,21%); cervicite crônica (11,7%); aspectos que sugerem processo reparativo (6,38%); atípicas em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) (2,13%) e metaplasia tubal (1,06%) (Figura 3). Foi ainda observada a presença de células glandulares endocervicais ciliadas em 13,83% de todos os esfregaços analisados.

Correlacionando-se os achados citológicos com as queixas clínicas observou-se que, em casos de normalidade ao exame de Papanicolaou, a maioria não apresentou queixas (52,73%). Dentre as sintomáticas as queixas apresentadas se seguem: corrimento (16,33%), corrimento + prurido (3,64%), corrimento + dor pélvica (3,64%), corrimento + uso de DIU (1,82%), corrimento + dor pélvica + dispareunia (1,82%), prurido (3,64%),

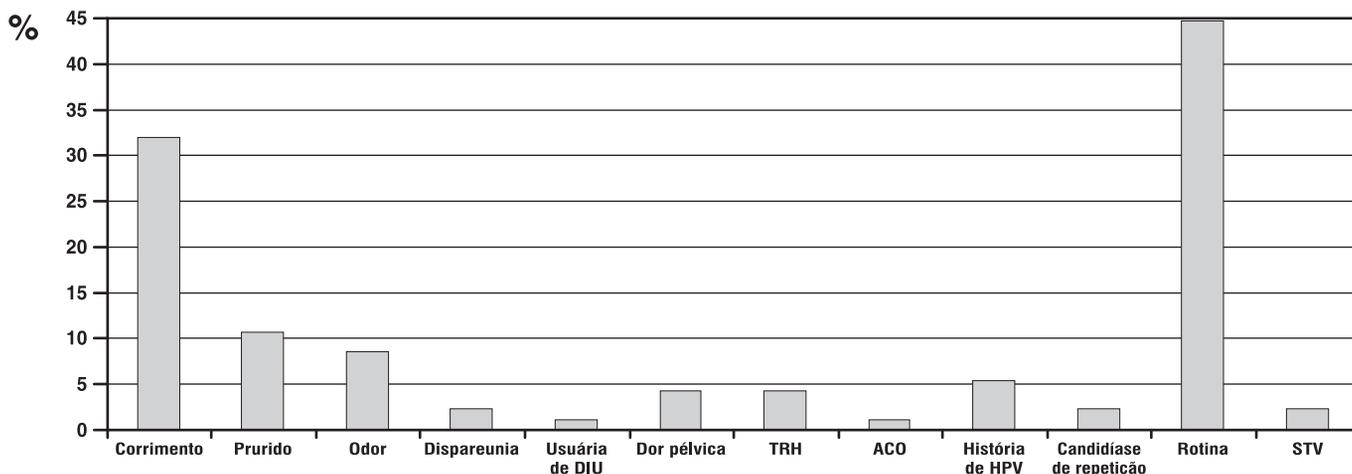


Figura 1. Dados de história clínica de 94 pacientes submetidas a estudo citológico de esfregaço endocervical colhido por escova.

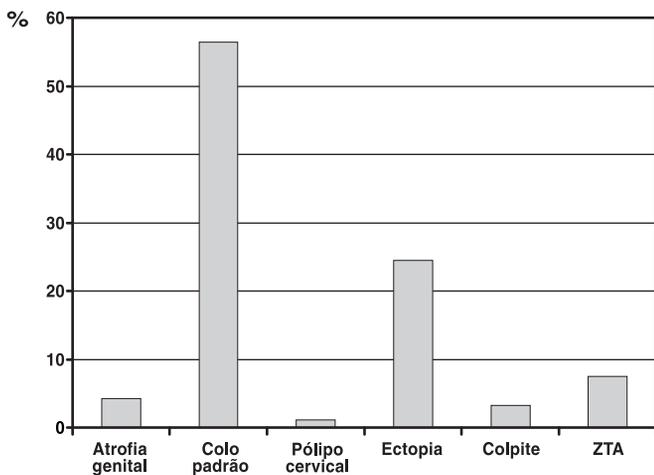


Figura 2. Dados de colposcopia de 94 pacientes submetidas a estudo citológico de esfregaço endocervical colhido por escova.

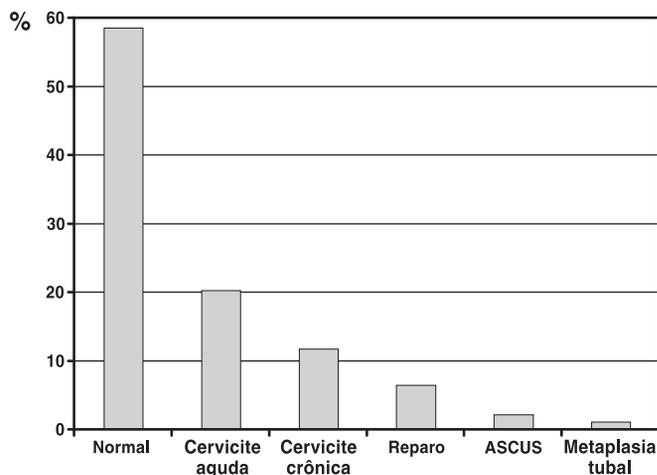


Figura 3. Achados de 94 pacientes submetidas a estudo citológico por método de Papanicolaou de esfregaço endocervical colhido por escova.

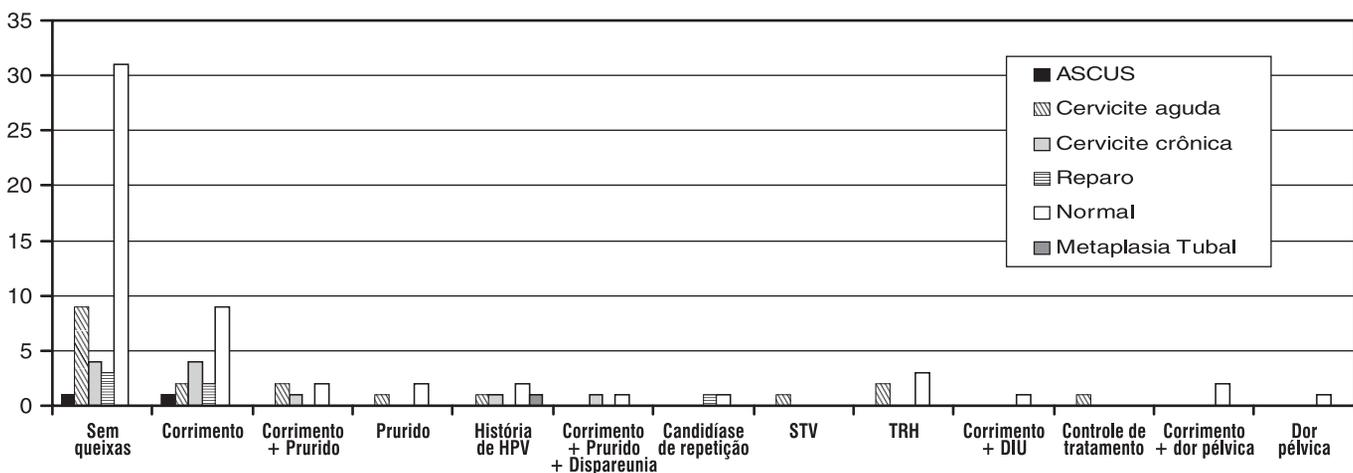


Figura 4. Relação entre queixas clínicas e achados citológicos de 94 pacientes submetidas a estudo citológico por método de Papanicolaou de esfregaço endocervical colhido por escova.

história de HPV (3,64%), dor pélvica (1,82%), candidíase de repetição (1,82%), sangramento uterino anormal (1,82%). Ainda foram motivo de consulta o uso de terapia de reposição hormonal (5,45%) e uso de DIU (1,82%). Nos casos em que se diagnosticou cervicite aguda, os motivos referidos à consulta foram os seguintes: sem queixas (36,84%), corrimento (10,53%), corrimento + prurido (10,53%), prurido (5,26%), controle de tratamento (5,26%), sangramento uterino anormal (5,26%), história de HPV (5,26%) e uso de terapia de reposição hormonal (10,53%). Já na cervicite crônica relacionaram-se os seguintes: sem queixas (45,45%), corrimento (36,36%), corrimento + prurido (9,09%), corrimento + prurido + dispareunia (9,09%), e história de HPV (9,09%). Nos casos de reparo: sem queixas (50%), corrimento (33,33%) e candidíase de repetição (16,67%). Dentre os casos diagnosticados como ASCUS: sem queixas (50%) e corrimento (50%). O caso de metaplasia tubária tinha história de HPV. (Figura 4)

Na abordagem dos aspectos citológicos comparados com achados de colposcopia foram observadas as relações: citologia normal (colo padrão = 69,09%; ectopia = 21,82%; ZTA = 3,64%; atrófico = 3,64% e póli-

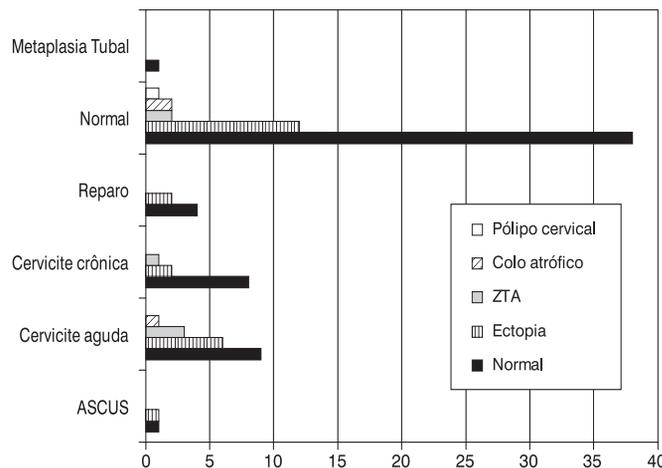


Figura 5. Relação entre colposcopia e achados citológicos de 94 pacientes submetidas a estudo citológico por método de Papanicolaou de esfregaço endocervical colhido por escova.

po cervical = 1,82 %), cervicite aguda (colo padrão = 47,37; ectopia = 31,58%; ZTA = 15,79% e atrófico = 5,26%), cervicite crônica (colo padrão = 72,73%; ectopia = 18,18% e ZTA = 9,09%), reparo (colo pa-

drão = 66,67% e ectopia = 33,33%), ASCUS (colo padrão = 50% e ectopia = 50%) e o caso de metaplasia tubal com colo padrão. (Figura 5)

## DISCUSSÃO

O estudo da endocérvice de forma direcionada através de escova (cytobrush®), permite identificar processos fisiológicos e patológicos que escapam ao bojo da colheita tradicional por espátula de madeira ou "swab"<sup>1,10,13,17</sup>. Ao mesmo tempo, a colheita em "pool" pode impedir uma avaliação mais específica desta região. Segundo Kristensen e cols. (1989)<sup>11</sup> a escova atinge porções da endocérvice não rotineiramente atingidas de forma que o material obtido apresenta peculiaridades frente a fenômenos reativos e reparativos. Para Segovia e cols. (1987)<sup>17</sup> os fracassos terapêuticos em casos de leucorréias, não se devem apenas a reinfecções ou outros fatores epidemiológicos, mas também a diagnósticos incompletos, visto algumas alterações ocorrerem na endocérvice, não acessada adequadamente.

Observamos uma incidência de cervicite de 31,91%, que corresponde aos achados de trabalhos como o de Heredia e cols (1990)<sup>7</sup> com 48% de cervicites. Ressaltamos que mesmo esta diferença tende a ser subjetiva já que não há critérios estritos para este diagnóstico.

As queixas referidas pelas pacientes podem ser ecléticas, independente do quadro citológico diagnosticado. Vale ressaltar que dentre aquelas com cervicites e mesmo ASCUS muitas eram assintomáticas (Figura 5). Os quadros citológicos demonstraram ter pobre correlação com as queixas referidas, fato também encontrado por Heredia e cols. (1990)<sup>7</sup>, onde das pacientes assintomáticas 21% tinham cervicite. Queixas outras, tais como leucorréias, muitas vezes relacionadas a colpites, têm, segundo Segovia e cols. (1987)<sup>17</sup>, relação com quadros endocervicais em até 1/3 das vezes.

A colposcopia apresenta falhas no reconhecimento de lesões glandulares endocervicais, quer por limitações do método, quer por não reconhecimento de alterações<sup>11,18</sup>. Por vezes, deixa passar quadros de cervicite, devido a dificuldade em alcançar adequadamente o canal cervical, imputando ainda mais a citologia direcionada uma melhor sensibilidade para detecção de quadros endocervicais, mormente as endocervicites crônicas, que foram observadas em 11,7% dos casos.

## CONCLUSÃO

Muitos são os estudos que têm demonstrado ser o escovado endocervical essencial no exame rotineiro do colo uterino<sup>1,7,10,11,13,17</sup>. A análise de esfregaços corados pelo método de Papanicolaou, de material oriundo da endocérvice, tem evidenciado uma sensibilidade de 90%, especificidade de 92,1% e valor preditivo positivo de 87,5%<sup>11</sup>.

As possibilidades diagnósticas com uso da escova endocervical são amplas, o que pode ser evidenciado pelo presente estudo, ressaltando-se uma amostra não viciada, posto que as pacientes eram oriundas de ser-

viço de ginecologia geral. A incidência de quadros inflamatórios na endocérvice parece ser relativamente alta (31,28%) e muitos podem passar despercebidos em exames de rotina. Ao mesmo tempo as queixas, ou sua ausência, tiveram relações pouco específicas com os achados. O fato de infecções endocervicais podem ser assintomáticas e terem, eventualmente, complicações enaltece a necessidade de estudo direcionado para diagnóstico precoce e adequado tratamento<sup>7,17</sup>.

A colposcopia, embora seja um método propedêutico de grande valia, possui limitações no que diz respeito a diagnóstico de processo na endocérvice.

Sendo o uso de escova endocervical um método fácil, inócuo e econômico, com boa margem de segurança, demonstra ser uma técnica recomendável.

## REFERÊNCIAS

1. **Approbato, M. S.; Moura, K. K. V.; Araújo, C. L.; Vencio, C. M.; Souza, R. C.; Garcia, R. G.; Costa, G. M.** Estudo comparativo de três métodos de coleta de material do colo uterino: swab de algodão, escova e espátula de Aylesbury. *J. Bras. Ginecol.* 1997;107(1/2):27-30.
2. **Broso, P.R. & Buffetti, G.** Dalla classificazione de Papanicolaou al Bethesda system. *Minerva Ginecol.*; 45(11)557-63. 1993.
3. **Cox, J. T.:** ASCCP practice guidelines : endocervical curettage. *J. Low Gen. Trac. Dis.*; 1(4): 251-6. 1997.
4. **Cox, J. T.** Epidemiologia da neoplasia intra-epitelial cervical: papel do Papilomavirus humano. Neoplasia intra-epitelial cervical – *Bellièrre Clinical Obstetrics and Gynecology*. Vol 9. Nº 1. 1995.
5. **Gompel, C. & Koss, L. G.** *Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclinicas*. 1ª ed. Ed. Manole. 1997.
6. **Gupta, P. K.** Microbiology, inflammation and viral infections. In **Marluce Bibbo – Comprehensive Cytopathology**. WB Saunders Cia. USA, 1991.
7. **Heredia, R.; Agudelo, C. I.; Castaneda, E.** Prevalencia de los agentes etiologicos de la vaginitis y la cervicitis en pacientes de consulta ginecologica general. *Acta Méd. Colomb.* 15(2):92-9. 1990.
8. **Kurman, R. J. & Solomon, D.** The Bethesda System – for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. Springer-Verlag New York. 1994.
9. **Longatto Filho, A.; Maeda, M. Y. S.; Santos, D.; Andréa Filho, A.; Cavaliere, M. J.; Shih, L. W. S.; Oyafuso, M. S.** Comparação dos métodos de cytobrush e espátula de Ayre na concentração de células endocervicais. *Rev. Paul. Med.* 109(3):93-6. 1991.
10. **Lotfi, H. O.; Doti, N.; Saffe, I.; Rodrigues, R.; Porreta, N.; Olcese, J. E.** *Chlamydiae*: criterios de compatibilidad citológica e histopatológica. *Obstet. Ginecol. Latinoam.* 43(11/12):381-5. 1985.
11. **Martin, D.; Umpierre, S. A.; Villamarzo, G.; Sánchez, O.; Sánchez, J.; Carrodegua, J.; Adamsons, K.** Comparison of the endocervical brush and the endocervical curettage for the evaluation of the endocervical canal. *P. R. Health Sci. J.* 14(3):195-7. 1995.
12. **McKee, G. T.** Anormalidades glandulares da cérvice. *Citopatologia. Artes médicas*; 66. 1997.
13. **Mendoza, G. O.; Bustamante, A. A.; Morales, M. D.; Acosta, V. G.** Citología cervical: hallazgos dependientes del biolector. *Ginecol. Obstet. Méx.* 65(12):515-9. 1997.
14. **Mitchell, H.** Improving consistency in cervical cytology reporting. *J. Natl. Cancer Inst.* 85(19):1592-6. 1993.
15. **Mitchell, M. F.** Neoplasia intra-epitelial cervical e câncer cervical. *Clínicas Ginecológicas e Obstétricas da América do Norte*. Vol. 23, Nº 2. 1996.
16. **Sánchez, G. M.; López, L. S.; Mejía, J. M.; González, E. C.** Eficacia del cepillo cervical en obtención de muestra endocervical en comparación con el abatelenguas. *Ginecol. Obstet. Méx.* 65(7):305-9. 1997.
17. **Segovia, S. P.; Gómez, O. H.; Fernández, A. V.; Martínez, M. A. T.; Pinto, M. E. C.** Estudio microbiológico de vaginitis y cervicitis. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 52(3):165-77. 1987.
18. **Taylor, R. R.; Guerrieri, J. P.; Nash, J. D.; Henry, M. R.; O'Connor, D. M.** Atypical cervical cytology. Colposcopic follow-up using the Bethesda system. *J. Reprod. Med.* 38(6):443-7. 1993.

Endereço para correspondência:

José Eleutério Junior

Rua Tenente Benévolo, 1560 – Apto 202 – Meireles  
Fortaleza Ceará – 60160-045

E-mail: eleuterio@secrel.com.br

# Análise do perfil de resistência de enterobactérias produtoras de $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) isoladas em João Pessoa, PB\*

## Resistance profile of enterobacteriaceae producing extended-spectrum $\beta$ -lactamases (ESBL) isolated in João Pessoa/PB, Brazil

Luciana Coutinho Honório<sup>1</sup>, Isabele Beserra Santos<sup>1</sup>; Alexandro Mangueira Lima de Assis<sup>1</sup> & Lauro Santos Filho<sup>2</sup>

**RESUMO** – A prevalência crescente de amostras produtoras de betalactamases de espectro ampliado ESBL representa um impacto significativo na prescrição de antimicrobianos, considerando-se que a produção dessas enzimas constitui o principal mecanismo de resistência das enterobactérias. Foram estudadas 545 linhagens de enterobactérias isoladas de amostras clínicas, oriundas de diferentes laboratórios na cidade de João Pessoa/PB, no período de janeiro a novembro de 2000, as quais foram identificadas bioquimicamente por técnicas de rotina. Realizaram-se testes de sensibilidade aos antimicrobianos, procedendo-se a uma identificação presuntiva inicial de amostras ESBL com base no perfil de resistência apresentado, utilizando-se critérios aprovados pelo NCCLS. Os testes confirmatórios da produção dessas enzimas foram executados pelas técnicas de disco aproximação e E-test (AB BioDisk®). Os dados foram analisados determinando-se a prevalência de bactérias produtoras de ESBL, fazendo-se um paralelo entre o aparecimento dessas amostras e o insucesso terapêutico de antimicrobianos usados no tratamento de rotina de enterobactérias. Foram caracterizadas na triagem preliminar 108 (19,8%) amostras suspeitas de serem produtoras de ESBL, dessas 45 (41,7%) evidenciaram resistência cruzada à ceftazidime e ceftriaxona, com uma confirmação de 11 (10,2%) linhagens caracterizadas como ESBL a partir de testes confirmatórios. Este fato deverá provocar alterações na terapêutica adotada, considerando-se o elevado perfil de resistência desse tipo de microrganismos.

**PALAVRAS-CHAVE** – Resistência, enterobactérias, beta-lactamases (ESBL).

**SUMMARY** – The production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) is considered the main resistance mechanism in Gram negative bacteria and confer resistance to oxyimino-cephalosporins (third generation). Tests were performed with 545 clinical isolates of Gram negative bacteria collected from different laboratories in João Pessoa, Paraíba/Brazil, during the period from January through December 2000. Species identification was done by routine tests and the susceptibility to antibiotics, as well the screening to ESBL were determined by the standard preservative disk diffusion method described in the NCLS guidelines. The ESBL production was confirmed by the double-disk synergy and E-test (AB Biodisk®). The records evaluated the bacterial resistance impact in the antibiotic utilization, monitoring the ESBL-producing strains prevalence. The results of this preliminary screening indicate the preservative isolation of 108 ESBL strains (19,8%), among these 45 showed cross resistance to ceftazidime and ceftriaxone (41,7%) and only 11 strains (10,2%) were confirmed by specific tests, and presented a antibiotic multiresistant profile. This study demonstrate a still low prevalence of these bacteria, but will produce important changes in the therapeutics approach of these infections. Considering that the advent of ESBL producers has represented a great treat to the use of many classes of antibiotics, particularly cephalosporins.

**KEYWORDS** – Resistance, enterobacteriaceae, beta lactamases (ESBL).

### INTRODUÇÃO

As cefalosporinas de amplo espectro, com uma cauda lateral oximino, tais como a cefotaxima, ceftazidime e ceftriaxona (terceira geração), e o monobactâmico aztreonam, inicialmente eficazes na terapêutica de Gram negativos, são inativados por beta-lactamases de espectro ampliado, ESBL<sup>2</sup>. Devido a sua excelente atividade e tolerabilidade, os antibióticos

$\beta$ -lactâmicos eram, talvez, os mais amplamente usados nos dias anteriores à produção de  $\beta$ -lactamases por patógenos comuns se tornar generalizada. A prevalência crescente de amostras produtoras dessas enzimas, tanto em patógenos da comunidade como, principalmente, em hospitais, representa um impacto significativo na prescrição de antimicrobianos. Considerando-se que a produção dessas enzimas constitui, atualmente, o principal mecanismo de resistência das en-

Recebido em 31/7/2001

Aprovado em 8/8/2001

<sup>1</sup>Bolsistas do Programa PIBIC/CNPq, Acadêmicos do Curso de Farmácia da UFPB

<sup>2</sup>Professor de Microbiologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB

\*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Medicina Tropical /CCS/UFPB

terobactérias, provocando uma alteração no perfil de resistência desse grupo bacteriano.

As cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) foram inicialmente identificadas na década de 80 na Alemanha e logo se tornaram prevalentes na Europa, disseminando-se em todo o mundo<sup>8,11,16,20</sup>. O esquema de classificação proposto para as  $\beta$ -lactamases é baseado nas características funcionais apresentadas, e deste modo três grupos principais de enzimas são definidas de acordo com seu substrato e com seu perfil de inibição. As  $\beta$ -lactamases do grupo 1 também conhecidas como AmpC, consideradas como enzimas típicas produzidas por enterobactérias, são produzidas constitutivamente e conferem resistência às penicilinas e também às cefalosporinas de primeira geração<sup>1</sup>. O grupo 2 é constituído pelas penicilinas e cefalosporinas de largo espectro, que são geralmente inativadas por inibidores de  $\beta$ -lactamases. Em um terceiro grupo existem as denominadas metalo  $\beta$ -lactamases, as quais hidrolizam penicilinas, cefalosporinas e carbapenens<sup>2</sup>.

As ESBLs resultam de mutações das enzimas clássicas (TEM-1 e SHV-1), e são provenientes de pressão seletiva em ambientes onde há utilização abusiva de antimicrobianos de amplo espectro como cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Devido ao fato da maioria das ESBL serem codificadas por genes localizados em plasmídeos, que, geralmente, carregam genes de resistência a outros antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos e outras classes de drogas, as cepas produtoras dessas enzimas são na maioria dos casos multirresistentes<sup>9,10</sup>.

Algumas ESBLs conferem alto nível de resistência às cefalosporinas de amplo espectro, em outras a resistência é apenas ligeiramente elevada ou aumentada seletivamente para apenas alguns compostos. Deste modo, a detecção de organismos produtores de ESBL pode se tornar difícil pelo fato da presença dessas enzimas nem sempre produzir um fenótipo de resistência detectável pelo critério interpretativo do método da difusão com discos proposto pelo NCCLS<sup>10</sup>.

Membros da família *Enterobacteriaceae* comumente expressam a presença de  $\beta$ -lactamases (ex: TEM-1, TEM-2 e SHV-1) que conferem resistência à penicilinas mas não às cefalosporinas de amplo espectro<sup>2,16</sup>. Estas enzimas são, predominantemente, encontradas em amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, sendo também detectadas em *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* e outros membros da família *Enterobacteriaceae*, assim como em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*<sup>3,8</sup>.

Em virtude das dificuldades técnicas de detecção, a prevalência de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado é geralmente subnotificada e permanece desconhecida na maioria dos laboratórios de rotina<sup>4,10</sup>. Desse modo, a falha na identificação de ESBL através de testes de rotina pode levar a uma utilização inapropriada de cefalosporinas de terceira geração com consequente aumento de mortalidade<sup>17,19</sup>.

Existem vários relatos mostrando falha terapêutica quando infecções causadas por cepas produtoras de

TABELA I  
Bactérias gram-negativas estudadas

Bactérias	Número	%	ESBL Positivas	%
<i>Escherichia coli</i>	221	40,6	03	27,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	106	19,4	03	27,3
<i>Proteus spp.</i>	95	17,4	02	18,1
<i>Enterobacter spp.</i>	54	9,9	01	9,1
<i>Morganella morganii</i>	24	4,4	01	9,1
<i>Serratia spp.</i>	14	2,6	--	--
<i>Klebsiella spp.</i>	13	2,4	01	9,1
<i>Citrobacter spp.</i>	12	2,2	--	--
Outros	06	1,1	--	--
Total	545	100	11	100

ESBL são tratadas com cefalosporinas de 3ª geração (ceftriaxona, ceftazidime), mesmo quando os testes de sensibilidade apontam essas cepas como sensíveis aos antimicrobianos utilizados. Assim como, a alteração na forma de produção de  $\beta$ -lactamases afetou o uso de penicilinas e cefalosporinas, também o uso clínico de diferentes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem influenciado na evolução molecular das  $\beta$ -lactamases. Por exemplo, à crescente incidência da produção de ESBLs seguiu-se ao uso aumentado das cefalosporinas.

O presente estudo foi conduzido com finalidade de realizar o monitoramento da prevalência de bactérias produtoras de ESBL, e avaliar o impacto do aparecimento dessas amostras no perfil de resistência bacteriana com relação às drogas antimicrobianas usadas no tratamento de rotina de enterobactérias.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Amostragem** - Foram estudadas 545 linhagens de enterobactérias isoladas de diversas amostras clínicas, de origem comunitária e/ou hospitalar, oriundas de diferentes laboratórios na cidade de João Pessoa/PB, no período de janeiro a novembro de 2000. As linhagens bacterianas, selecionadas para estudo do perfil de resistência foram remetidas, para processamento no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Medicina Tropical/CCS/UFPB.

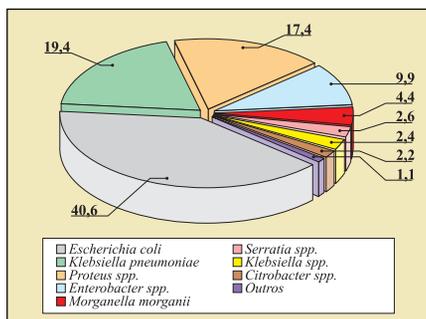
### Métodos

#### Isolamento e Identificação

As amostras de enterobactérias foram isoladas e identificadas através de métodos adotados nos diferentes laboratórios, constando de inoculação primária em meios de rotina e identificação, utilizando uma bateria padronizada de testes de identificação bioquímica.

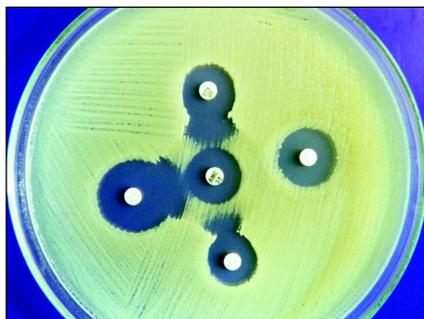
#### Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Realizaram-se testes de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão com discos, procedendo-se uma triagem presuntiva inicial de amostras ESBL com base no perfil de resistência apresentado utilizando-se critérios recomendados pelo NCCLS (2000). Utilizou-se um conjunto definido de antimicrobianos constando das seguintes drogas: Amicaci-



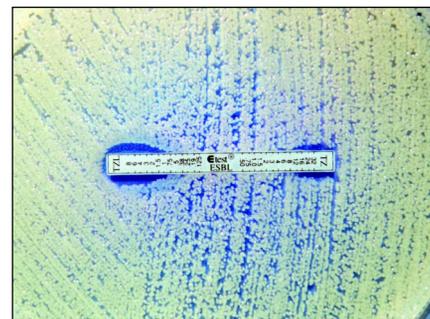
**GRÁFICO 1**

Prevalência de bactérias gram-negativas



**FIGURA 1**

Teste do disco aproximação (double disk)



**FIGURA 2**

Fita E-test ESBL

na, Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Cefalotina, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidime, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem e Sulfametoxazol-Trimetoprim (Oxoid). Os discos padronizados contendo essas drogas foram colocados em meio não suplementado de Agar Mueller-Hinton (Oxoid), preparado em placas de 150mm de diâmetro guardando-se uma distância de 30mm entre eles, para melhor evidência dos halos de inibição do crescimento. A leitura foi realizada com auxílio de paquímetro, sendo o resultado anotado em termos do diâmetro do halo em milímetros. Os dados foram processados através do programa informatizado denominado WHONET, com finalidade de análise e elaboração de gráficos e tabelas<sup>15</sup>.

#### Triagem para a detecção de amostras ESBL

Foram utilizados os critérios preconizados pelo NC-CLS (M100-S9)<sup>13</sup>, onde são estabelecidos os valores para os tamanhos dos halos de inibição, no teste de difusão com discos, para a triagem presuntiva de amostras potencialmente produtoras de ESBL: Ceftazidime (22 mm), Aztreonam (27 mm), Cefotaxima (27 mm), Ceftriaxona (25 mm).

#### Testes confirmatórios

Os testes confirmatórios da produção dessas enzimas foram executados pelas técnicas de disco aproximação (double-disk) e E-test (AB BioDisk®).

**Disco Aproximação (double-disk)** - este teste consiste em colocar um disco de clavulanato (amoxicilina/ac. clavulânico - Oxoid) no centro de uma placa de Petri, e a uma distância de 30mm (centro a centro), colocar discos contendo antibióticos beta lactâmicos, representados por cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona, ceftazidime, cefotaxima) e aztreonam (Oxoid). Uma deformação característica, denominada "zona fantasma", ocasionando um aumento extra nos halos de inibição ao redor desses discos é indicativo da produção de ESBL<sup>6,9</sup>.

**Fita E-test ESBL** (AB Biodisk, Solna, Sweden) - a fita teste carrega dois gradientes, em uma extremidade Ceftazidime, e na extremidade oposta Ceftazidime acrescido de Ácido Clavulânico (4 mg/ml). Após crescimento "overnight" em placa de agar, as bactérias teste foram inoculadas no Agar Mueller-Hinton, de maneira semelhante ao teste de difusão com discos. Após secagem foram aplicadas as fitas de E-test de acordo

com orientações do fabricante. A concentração inibitória mínima (CIM) de ambos os lados da fita foram interpretados como o ponto de intersecção da elipse de inibição com a escala, de modo que uma relação Ceftazidime versus Ceftazidime/Ac. Clavulânico, igual ou maior que 8,0 é indicativo da presença de ESBL<sup>12</sup>.

## RESULTADOS

Em nossa amostragem foram caracterizadas na triagem preliminar 108/545 amostras suspeitas (19,8%). Dessas, 45 evidenciaram resistência cruzada à ceftazidime e ceftriaxona (41,7%), com uma confirmação de 11 linhagens caracterizadas como ESBL (10,2%). Este fato deverá provocar alterações na terapêutica adotada, considerando-se o elevado perfil de resistência desse tipo de microrganismos.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Além de estarem mais relacionadas à indução das  $\beta$ -lactamases cromossômicas da classe 1, as cefalosporinas de terceira geração, em particular a ceftazidime, têm sido relacionadas à seleção de cepas produtoras de ESBL, que representam um potente grupo de  $\beta$ -lactamases não induzíveis. Desse modo, a inclusão de ceftazidime no painel teste de triagem aumenta, de maneira significativa, a detecção da presença de ESBL<sup>21</sup>.

O rápido aumento no isolamento de enterobactérias com essas características e os inúmeros relatos que mostram a disseminação de clones produtores de ESBL, vêm enfatizar a necessidade de métodos de triagem e detecção eficazes para essas amostras bacterianas<sup>5</sup>. Assim, métodos específicos como o teste do disco duplo, teste tridimensional e, mais recentemente, o E-test® foram desenvolvidos com esta finalidade<sup>9,22</sup>. Porém, a prevalência de bactérias produtoras de ESBL ainda permanece desconhecida na grande maioria dos casos, apesar do registro de surtos devidos a estes microrganismos<sup>10</sup>. A detecção de ESBLs que não são caracterizadas fenotipicamente pelos padrões estabelecidos pelo NCCLS constitui um desafio para os laboratórios clínicos.

No entanto, alguns estudos têm questionado a sensibilidade deste teste e algumas modificações foram recomendadas, tais como alterações no tipo de drogas testadas (cefalosporinas) e a distância entre os discos,

que é alterada de estudo para estudo, variando de 25mm até 30mm repetindo-se o teste usando 20mm quando os resultados obtidos com estas distâncias são negativos<sup>3,7,19,22</sup>.

A fita de E-test para detecção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado, constitui uma alternativa prática e de fácil execução, consistindo em uma fita plástica com um gradiente de concentração estável para ceftazidime em uma das extremidades, e o mesmo gradiente acrescido de uma concentração fixa de ácido clavulânico na outra extremidade. Desse modo, o método é baseado no reconhecimento de uma redução no MIC de ceftazidime na presença de uma concentração de 4mg/litro de ácido clavulânico<sup>3,23</sup>.

Grande parte do aumento dramático da resistência bacteriana aos antibióticos beta lactâmicos tem sido associada com o espalhamento das ESBL. Além de gerar dados incorretos de prevalência, a ausência de detecção dessas amostras leva à utilização de uma terapêutica incorreta com conseqüências graves para o paciente. A resistência bacteriana decorrente da produção de ESBL pode também ser induzida durante a terapêutica, criando-se um problema que independe do procedimento laboratorial adotado anteriormente.

A exemplo de outros trabalhos, nossos achados indicam, primeiramente, a importância em se adotar uma metodologia que possibilite a detecção fenotípica dessas amostras e que esta informação possa ser utilizada como orientação da terapêutica a ser instituída. Considerando-se inclusive a escolha dos carbapenems, que são os antibióticos mais efetivos frente às enterobactérias produtoras de ESBL, em virtude do seu espectro mais ampliado e estabilidade à hidrólise. Por outro lado, deve-se moderar seu uso em virtude do aumento da resistência por outras espécies bacterianas como a *Pseudomonas aeruginosa*.

De grande importância também é o trabalho dos profissionais responsáveis pela prescrição de antibióticos, que sempre têm de pesquisar estratégias para o uso dos antibióticos que considerem a presença preponderante de amostras produtoras de ESBL, que uma vez confirmadas exigem uma postura terapêutica específica.

A partir de nossos resultados podemos concluir que dentro desta amostragem a incidência de linhagens de enterobactérias produtoras de ESBL em nosso meio ainda não constitui um problema significativo, conseqüentemente, os problemas terapêuticos advindos desse fato praticamente inexistem. Por outro lado, é necessário uma constante vigilância em termos laboratoriais para que seja evitada uma subnotificação decorrente de técnicas de rotina incapazes de determinar o problema, conduzindo a resultados falso negativos.

## REFERÊNCIAS

1. Bush, K. Classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:259-263, 1989.
2. Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233, 1995.
3. Cormican, M. G.; Marshall, S. A.; Jones, R. N. Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains by E-test ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* 34:1880-1884, 1996.
4. Emery, C. L.; Weymouth, L. A. Detection and clinical significance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol.* 35:2061-2067, 1997.
5. Gales, A. C. Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado. (Dissertação de Mestrado, Escola Paulista de Medicina). São Paulo, 1997.
6. Hsiung, A.; Oplustil, C.; Sinto, S.; Nicodemo, A. C.; Mendes, C. Importância da detecção de  $\beta$ -lactamases em bacilos Gram negativos. *Laes-Haes*, 121:86-94, 1999.
7. Jacoby, G. A.; Han, P. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34:908-911, 1996.
8. Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1697-1704, 1991.
9. Jarlier, V.; Nicolas, M. H.; Fournier, G.; Philippon, A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring resistance to the newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10:867-878, 1998.
10. Katsanis, G. P.; Spargo, J.; Ferraro, M. J. et al. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 32:691-696, 1994.
11. Liu, P. Y.; Tung, J.; Ke, S.; Chen, S. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 36:2759-2762, 1998.
12. M'zali, F. H.; Chanawong, A.; Kerr, K. G.; Birkenhead, D.; Hawkwey, P. M. Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* comparison of MAST DD test, the double disk and E-test ESBL. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:881-885, 2000.
13. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: ninth Informational Supplement. *Approved Standard M 100-S9*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 1999.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. *Approved standard M-7 A-5*, 5th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2000.
15. O'Brien, T. F.; Stelling, J. M. Wonet. Removing obstacles to the full use of information about antimicrobial resistance. *Diag. Microbiol. Infect Dis.* 25:163-168, 1996.
16. Phillipon, A.; Labia, R.; Jacoby, G. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1131-1136, 1989.
17. Reis, A. O.; Gales, A. C.; Miranda, E. A.; Sader, H. S. Avaliação da acurácia do teste de adição de clavulanato ao disco para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL). *J. Bras. Patol.* 34:85-92, 1998.
18. Silva, C. H. P. M. Beta-lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial. *Rev. Bras. de Análises Clínicas* 32:215-219, 2000.
19. Siu, L. K.; Lu, P.; Hsueh, P. Hsueh, P.; Lin, F. M. et al. Bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J. Clin. Microbiol.* 37:4020-4027, 1999.
20. Szabó, D.; Filetóth, Z.; Szentandrassy et al. Molecular epidemiology of a cluster due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in the premature intensive care unit of a hungarian hospital. *J. Clin. Microbiol.* 37:4167-4169, 1999.
21. Tenover, F. C.; Mohammed, M. J.; Gorton, T. S.; Dembek, Z. F. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.* 37:4065-4070, 1999.
22. Thomson, K. S.; Sanders, C. C. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* comparison of the double-disk method and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1877-1882, 1992.
23. Vercauteren, E.; Descheemaeker, P.; Ieven, M.; Sanders C. C. et al. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in a belgian teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 35:2191-2197, 1997.

Endereço para correspondência:  
Prof. Lauro Santos Filho  
Rua José Jardim, 373 - Bairro dos Ipês  
João Pessoa - PB. CEP: 58.028 160  
E-mail: santos@openline.com.br

# Exame do líquido pleural nos laboratórios do estado de Santa Catarina

## Pleural liquid examination in the state of Santa Catarina

P. Haas<sup>1</sup>, K. Thiesen<sup>1</sup> & C. L. Vituri<sup>1</sup>

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento, em relação ao perfil metodológico do exame do líquido pleural no Estado de Santa Catarina. Já que existem numerosos métodos para o estudo do líquido pleural. Para avaliar a metodologia aplicada nos laboratórios do Estado, foram enviados questionários para os laboratórios das maiores cidades, quanto as análises citológicas, bioquímicas, microbiológicas e provas complementares. Observamos que nas análises citológicas, bioquímicas e microbiológicas da amostra de líquido pleural não há uma homogeneidade nos protocolos entre os laboratórios para a maioria das análises. Isso se deve provavelmente a uma adaptação da rotina de acordo com as condições do serviço e do paciente atendido.

**PALAVRAS-CHAVE** – Líquido pleural.

**SUMMARY** – The objective of this project was to carry out a study pertaining to the methodological profile of the pleural liquid examination in the state of Santa Catarina, in as much as there are a number of methods used for the study of pleural liquid. In order to evaluate the methodology applied in the laboratories of the State, questionnaires were sent to the laboratories in the largest cities, regarding cytological, biochemical and microbiological analyses, as well as complementary tests. It was observed that in the cytological, biochemical and microbiological analyses of pleural liquid samples, the protocols among the laboratories differed for most of the analyses. This was due, most likely, to an adaptation of the routine according to the service and the patient attended.

**KEYWORDS** – Pleural liquid.

### INTRODUÇÃO

A pleura é uma cavidade fechada do organismo, que é revestida por uma membrana serosa que envolve o pulmão e a caixa torácica<sup>2, 13</sup>, sendo esta membrana composta por dois folhetos, denominados de: pleura parietal (a porção que reveste as paredes da cavidade) e a pleura visceral (a porção que reveste os pulmões)<sup>2,9,12,13</sup>. Cada um desses folhetos é constituído por uma camada de células mesoteliais repousando sobre um suporte de tecido conjuntivo<sup>2,9</sup>. Entre esses folhetos contém uma pequena quantidade de líquido, denominado líquido pleural<sup>2,9,12,13</sup>. Esse líquido tem como função lubrificar as membranas para diminuir os efeitos do atrito, durante o movimento ventilatório<sup>2,9,12,13</sup>.

O líquido pleural é formado na membrana parietal e reabsorvido pela membrana visceral<sup>9,12</sup>, como ultrafiltrado do plasma, sem a participação de nenhum outro material formado pelas células das membranas que revestem a cavidade<sup>2,9,12</sup>, sendo sua produção e reabsorção dependente da pressão hidrostática exercida pelos capilares, a pressão coloidal (oncótica) exercida pelo plasma, reabsorção linfática e a permeabilidade capilar<sup>9,12</sup>. O volume desse líquido normalmente não se altera, pois a velocidade de produção e de reabsorção são proporcionais<sup>13</sup>. A quantidade de líquido en-

contrado na cavidade pleural é de aproximadamente 1ml<sup>2</sup>, mas pode chegar a 15ml onde ainda é considerado um valor normal por alguns autores<sup>2,9,13</sup>.

Em casos de derrame do líquido pleural, há um acúmulo anormal de líquido nessa cavidade<sup>2,4,9,12</sup>, denominado efusão<sup>4</sup>. Os derrames podem ser classificados em dois grupos com base na causa do acúmulo de líquido: transudato e exsudato<sup>1,2,4,9,10,12,13</sup>. Um transudato é um derrame causado por fatores mecânicos ou sistêmicos, rompendo o equilíbrio entre a filtração e a reabsorção (doenças não inflamatórias)<sup>2,4,8,10,12,13</sup>. Um exsudato é um derrame que causa comprometimento direto dos revestimentos mesoteliais (doenças inflamatórias, infecções e neoplasias)<sup>2,4,9,10,12,13</sup>. A classificação do líquido pleural como transudato ou exsudato pode ser um importante passo para o diagnóstico e a evolução das análises laboratoriais, já que em geral não são necessárias outras análises para os transudatos<sup>4,13</sup>. O líquido para a realização dos exames laboratoriais é colhido por aspiração e esse procedimento recebe o nome de toracocentese<sup>1,2,4,9,10,12,13</sup>. Esse procedimento no entanto não serve somente para fins de diagnóstico, mas também como método terapêutico para aliviar os sintomas da compressão causada pelo acúmulo de líquidos<sup>1,4</sup>.

Os exames de rotina são realizados da mesma ma-

Recebido em 17/5/2000

Aprovado em 13/8/2001

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas - UFSC

neira em todos os líquidos serosos, entretanto, o significado dos resultados e a necessidade de realizar provas especiais variam de um líquido para o outro<sup>13</sup>.

Os protocolos de rotina, da análise do líquido pleural incluem cuidados que vão desde o acondicionamento da amostra<sup>4,12</sup>, aspectos físico-químicos, exames citológicos, bioquímicos e microbiológicos<sup>1,2,4,7,8,9,11,12,13</sup>; tendo também como possibilidade para avaliação, provas complementares, os quais possuem uma variabilidade das técnicas entre os laboratórios.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento, em relação ao perfil metodológico do exame de líquido pleural no Estado de Santa Catarina, quanto ao acondicionamento da amostra, as análises citológicas, bioquímicas, microbiológicas e quando realizadas, as provas complementares.

## MATERIAL E MÉTODOS

Enviamos 77 questionários para os laboratórios de análises clínicas das maiores cidades de cada região do Estado de Santa Catarina (Sul, Norte, Centro-Oeste, Oeste, Vale do Itajaí e Capital). Os questionários foram elaborados abrangendo as análises recomendadas para rotina de laboratórios tais como:

- **Físico-químicos** – pH, cor, aspecto e densidade
- **Citológicas** – citologia global, citologia diferencial
- **Bioquímicas** – dosagem de glicose, proteínas, desidrogenase láctica, adenosina deaminase
- **Microbiológicas** – bacteroscopia, cultura e pesquisa de fungos

Além de aspectos relacionados ao acondicionamento da amostra biológica, recomendado pelas literaturas especializadas.

Destes 77 questionários enviados, 13 laboratórios que realizam exame de líquido pleural em suas rotinas, responderam aos questionários.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da metodologia utilizada na análise do líquido pleural no Estado de Santa Catarina, foi realizada com base nas respostas dos 13 laboratórios que participaram da pesquisa. A pesquisa considerou as cinco regiões do Estado de Santa Catarina e capital. Selecionamos a maior cidade de cada região de acordo com dados demográficos e enviamos correspondência para todos os laboratórios destas cidades. Das 77 correspondências enviadas 13 responderam ao questionário, ou seja, 16,9% dos laboratórios investigados. Mesmo sendo uma proporção pequena, consideramos representativa, tendo em vista que a rotina de líquido pleural é pequena em vista o exame de outros líquidos corpóreos como por exemplo : o líquido cefaloraquidiano (líquor).

Dos laboratórios que responderam ao questionário

pode-se avaliar que há uma variação entre as formas de acondicionamento da amostra biológica. O anticoagulante utilizado para análises citológicas é o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) em 38,47%, a heparina em 23,07% dos laboratórios e não responderam a pergunta 38,46% dos laboratórios. A literatura recomenda<sup>4</sup> que para a amostra colhida para contagem e diferenciação celular deve ser feita em um tubo contendo EDTA<sup>4</sup>, se necessário a amostra fresca pode ser armazenada por até 48 horas no refrigerador com resultados satisfatórios com relação a integridade celular<sup>4</sup>. Quanto ao anticoagulante utilizado para análises bioquímicas: a heparina é utilizada por 23,07% dos laboratórios; é utilizado heparina e/ou separação natural em 7,7%; é utilizado anticoagulante G Winer em 7,7%; e não responderam 61,53%. Com relação as amostras para provas bioquímicas o recomendado é que se use tubos heparinizados<sup>4</sup> embora a maioria das avaliações não necessite do uso de anticoagulantes, pela não interferência do coágulo em algumas análises bioquímicas<sup>4</sup>. Apesar de o uso de anticoagulante ser recomendado<sup>4</sup>, o líquido pleural normal não tem a característica de coagular espontaneamente<sup>4</sup>. Os líquidos oriundos de processos exsudativos coagulam com frequência<sup>4</sup>.

Com relação às avaliações físico-químicas pode-se verificar que há uma ligeira variação entre os laboratórios que as realizam (Figura 1). O pH é analisado por 84,6% dos laboratórios; 15,4% não responderam a essa pergunta. O pH inferior a 7,2 pode indicar a necessidade de intubação torácica e o uso de antibióticos em casos de pneumonia<sup>4,13</sup>; é mais freqüente observar pH acima de 7,4 nas neoplasias; em casos onde o pH tem seus valores próximos a 6,0, há indício de ruptura esofágica com infiltração de suco gástrico<sup>2,4,9</sup>, no entanto, o empiema também pode se apresentar com pH baixo<sup>4</sup>. Para a medição do pH, o líquido deve ser coletado anaerobicamente e encaminhado ao laboratório conservado em gelo<sup>4</sup>. A densidade é analisada em 92,3% dos laboratórios; 7,7% não responderam. A densidade é um outro critério para a diferenciação entre transudato e exsudato, já que ela se altera a medida que os demais parâmetros também são alterados; como a quantidade de células e a concentração de glicose e proteínas no líquido, fazendo com que a densidade aumente ou diminua. A aparência do líquido pleural é avaliada através da cor e do aspecto. A densidade normal do líquido pleural é 1,016, inferior a isso é característica de transudato e acima disso característica de exsudato<sup>1,4,9,12,13</sup>. A cor é avaliada em 84,6% dos estabelecimentos; 15,44% não responderam, e o aspecto caracterizado em 92,3% dos laboratórios; não responderam 7,7%. Através da avaliação da aparência da amostra pode-se obter um grande número de informações sobre a origem do derrame pleural<sup>13</sup>. Os líquidos normais e os transudatos são transparentes e amarelo-claro ou cor palha, geralmente claros. A turvação que está presente em alguns líquidos está ligada a presença de leucócitos, que é indicativo de uma infecção bacteriana, tuberculose ou um distúrbio imunológico, como artrite reumatóide<sup>13</sup>, e também da

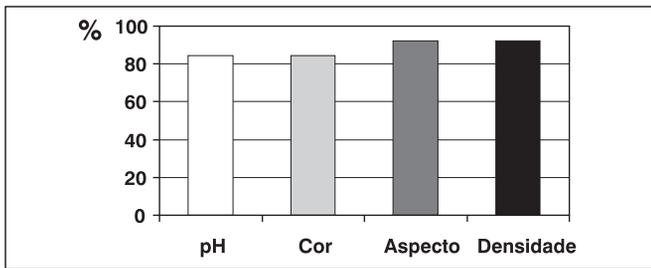


Figura 1 - Exames físico-químicos realizados no líquido pleural no estado de Santa Catarina

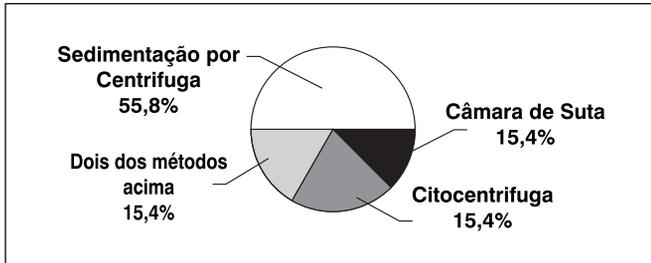


Figura 3 - Métodos utilizados para concentração celular no estado de Santa Catarina

presença dos próprios microrganismos<sup>13</sup>. Agora quando o líquido apresentar sangue, este pode ser decorrente de um hemotórax (lesão traumática), de uma lesão da membrana (que pode ocorrer em algumas neoplasias), ou pode ser decorrente de um acidente de punção, sendo que o sangue proveniente de uma punção traumática é, como em outros líquidos corpóreos, filamentosos e sem uniformidade<sup>13</sup>, com clareamento do líquido com a aspiração continuada ou formação de pequenos coágulos sanguíneos<sup>4</sup>. Esta diferenciação da punção traumática dos demais é necessária para evitar problemas na emissão dos resultados<sup>13</sup>. Para se estabelecer a diferença entre um hemotórax e um exsudato hemorrágico, é necessário que seja realizado um hematócrito do líquido; se o sangue for proveniente de hemotórax (transudato), o hematócrito será superior a 50% do hematócrito do sangue total<sup>4,13</sup>, uma vez que o derrame esteja ocorrendo por infiltração do sangue pela lesão<sup>13</sup>. No caso de uma doença crônica (neoplasias) da membrana, há presença de sangue, mas também uma grande quantidade de líquido pleural ocasionando um hematócrito bem inferior ao sérico<sup>13</sup>. As amostras turvas, leitosas ou hemorrágicas devem ser centrifugadas e o sobrenadante examinado, se for claro, provavelmente a turvação é devida presença de restos celulares<sup>4</sup>. Se o líquido se apresentar leitoso indica a presença ou aumento dos lipídeos, tendo como causa mais freqüente a formação de material quiloso ou quilotórax (vazamento do ducto torácico) ou de material pseudo quiloso (inflamação crônica), o que pode facilmente ser diferenciado através da coloração por Sudan III que é positiva em caso de material quiloso<sup>2,4,13</sup>.

Quanto as análises citológicas o que se observou foi: a citologia global (Figura 2) é realizada através da contagem em câmara de Neubauer por 38,46% dos estabelecimentos, através da câmara de Fuch-Rosental por 38,46%, é utilizado dois dos métodos citados

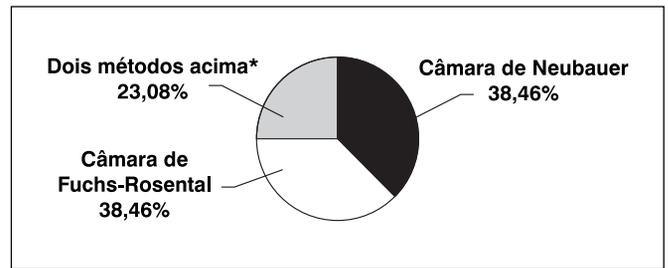


Figura 2 - Métodos utilizados para contagem celular no líquido pleural. \*É a associação de um método manual com um método automatizado (62,72%) ou dois métodos manuais

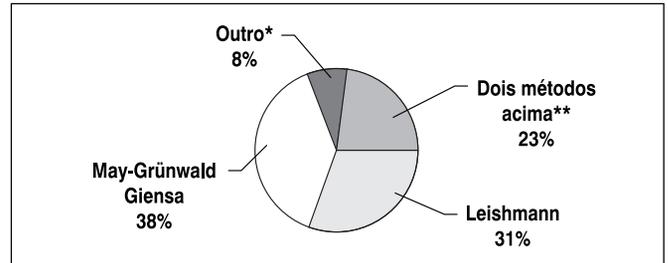


Figura 4 - Método utilizado para a coloração celular. \*Atavés da coloração por Leishmann ou panótico

por 23,08% dos laboratórios, 66,72% realizam a contagem através da associação de um método manual e através de automação. Os métodos automatizados devem ser utilizados com cautela para contagem celular, sendo necessária uma correção, devido a inclusão de células teciduais na contagem; também deve se ter cuidado com o entupimento das tubulações do aparelho por resíduos contidos no líquido<sup>9,12,13</sup>. A contagem leucocitária tem sido utilizada como limite entre transudato (menos de 1000 células/ml) e exsudato (mais de 1000 células/ml)<sup>2,4,10,13</sup>, mas uma sobreposição considerável torna esse critério não confiável<sup>4</sup>. Já na citologia diferencial (Figura 3), é utilizado como método de concentração celular a centrífuga em 53,86%, através da câmara de Suta em 15,4%, por citocentrífuga em 15,4%, são utilizados dois dos métodos de concentração celular acima em 15,4% dos estabelecimentos que participaram da pesquisa. A coloração das células (Figura 4) para a leitura diferencial é feita através dos seguintes corantes: Leishmann em 30,77%; May-Grünwald Giensa em 38,46%; através da coloração por Leishmann e/ou panótico em 7,7%; são utilizados dois dos métodos acima em 23,07% dos laboratórios. A coloração indicada pela maior parte das literaturas é a Wright<sup>9,12,13</sup>. A citologia diferencial tem utilidade no diagnóstico da tuberculose e das infecções bacterianas<sup>13</sup>. Nos derrames tuberculosos observa-se um predomínio de linfócitos e presença de plasmócitos; nas infecções bacterianas, por sua vez, são os neutrófilos que estão em maior quantidade<sup>13</sup>. Em 10% dos casos de derrames transudativos apresentam um predomínio de neutrófilos sem significado clínico<sup>4</sup>. Também é freqüente encontrar predomínio de linfócitos em achados de derrames neoplásicos<sup>9</sup>. Há efusões eosinofílicas (acima de 10% de eosinófilos) que tem como causas mais comuns a presença de ar ou sangue na cavidade pleural, um pequeno número de mastócitos ou de basófilos freqüentemente acompanha os eosinófi-

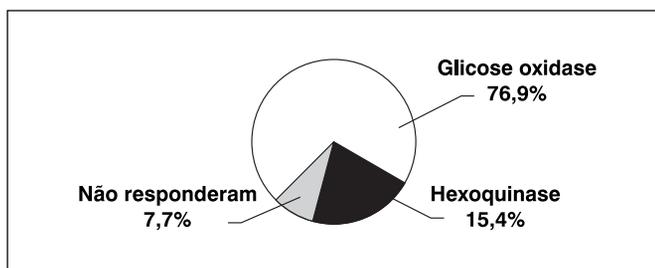


Figura 5 - Métodos utilizados para dosagem de glicose no líquido pleural

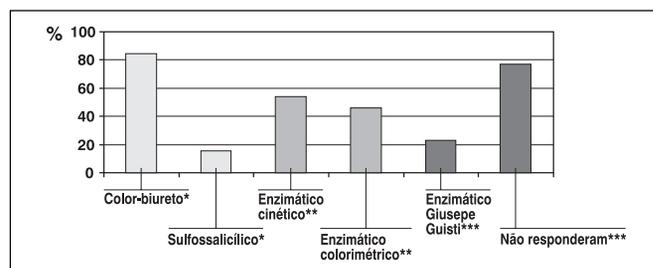


Figura 6 - Métodos utilizados para diversa dosagens bioquímicas \*dosagem de proteína; \*\*dosagem de LDH; \*\*\*dosagem de adenosina desaminase

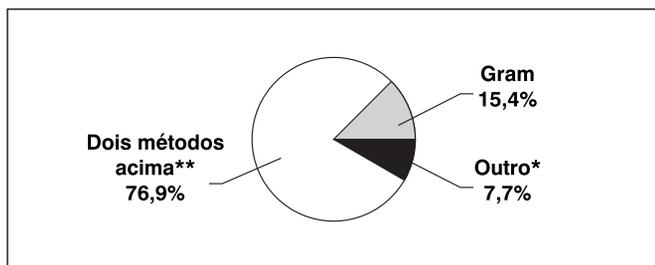


Figura 7 - Métodos utilizados para realização da bacteroscopia no estado de Santa Catarina

\*Através dos métodos de Gram e Ziel Nielsen

\*\*Através dos métodos de Gram/Ziel Nielsen/Papanicolau

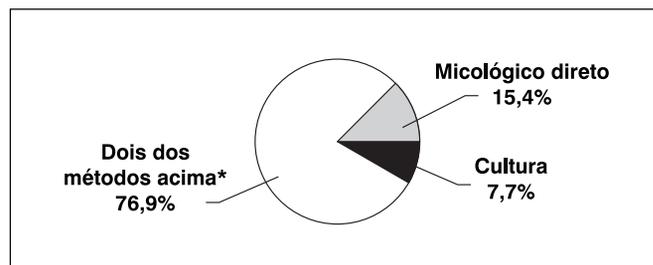


Figura 8 - Métodos utilizados para a determinação da presença de fungos no líquido pleural. \*Incluindo também as análises feitas com o corante tinta da China

los<sup>4</sup>. As células do lúpus eritematoso podem ser observadas numa minoria de efusões em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico<sup>4</sup>. Também são encontrados células mesoteliais provenientes da membrana pleural, tendo sua contagem mais expressiva em casos de inflamação não-bacteriana, sendo raramente encontradas em casos de tuberculoses e infecções bacterianas<sup>4,13</sup>, porque a deposição de fibrina e fibrose impedem a exfoliação das células mesoteliais<sup>4</sup>, deve-se tomar o devido cuidado para evitar possíveis confusões entre células neoplásicas e mesoteliais. Por esta última, muitas vezes apresentar-se em grumos, sendo necessário a observação da uniformidade celular para a diferenciação<sup>13</sup>. Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico é possível observar a presença neutrófilos típicos dessa doença<sup>13</sup>.

Nas avaliações bioquímicas do líquido pleural, os laboratórios foram questionados nas suas análises de glicose, proteínas, desidrogenase láctica (LDH), adenosina deaminase (ADA), quanto a forma como são realizadas estas provas. Como o líquido pleural tem origem estritamente plasmática (oriundos de uma ultrafiltração plasmática<sup>2,9,12</sup>), os resultados normais deste líquido são praticamente os mesmos dos níveis plasmáticos<sup>13</sup>. Sendo necessário correlacionar os valores encontrados nas análises feitas no líquido pleural e os valores séricos<sup>13</sup>. Quanto a glicose (Figura 5), foi observado que nos laboratórios pesquisados este teste é realizado através do método da glicose oxidase em 76,9% deles; o método da hexoquinase é utilizado por 15,4% dos laboratórios; 7,7% dos laboratórios não responderam. Os níveis de glicose normal dos transudatos e da maioria dos exsudatos é similar aos séricos<sup>4</sup>. Embora encontram-se diminuídos em algumas patologias, devido ao aumento da utilização da glicose pelo processo patogênico<sup>1</sup>, como: infecções bacterianas, neo-

plasias, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, derrame parapneumônico, entre outros<sup>1,2,4,9,10,13</sup>. Nos casos em que os níveis de glicose encontram-se elevados no líquido pleural, essa elevação é decorrente de aumento nos níveis séricos como em casos de diabetes e hiperglicemia<sup>1</sup>, não tendo importância clínica. Em outras dosagens bioquímicas (Figura 6); como a dosagem de proteínas, 84,6% utilizam o método de color-biureto; 15,4% utilizam o método do sulfossalicílico. Sozinha a determinação de proteínas totais no líquido pleural tem pouca utilidade clínica, exceto quando esses valores são combinados com outros parâmetros para diferenciar transudato e exsudato<sup>4,13</sup>. Antigamente a combinação entre densidade e o nível de proteínas era considerado o critério mais importante para a classificação dos derrames; mas hoje a razão entre os níveis de proteína e de LDH encontrado no líquido e o sérico é considerado o mais confiável<sup>13</sup>. Já quanto a dosagem de LDH (Figura 6), 53,85% utilizam o método enzimático cinético; 46,15% utilizam o método enzimático colorimétrico; a LDH é uma enzima intracelular, e seus níveis elevados é indicativo de dano tissular<sup>6</sup>, estando presente em patologias que envolvem injúria celular<sup>6</sup>. A LDH auxilia na diferenciação entre transudato e exsudato<sup>9</sup>, sendo que nos exsudatos seus valores são geralmente superiores aos níveis séricos do paciente<sup>1</sup>, enquanto que nos transudatos esses valores não ultrapassam os valores séricos<sup>1,4</sup>. Ela não só serve como um parâmetro para a diferenciação entre os tipos de efusão mas, também, indicam solução da inflamação quando seus níveis apresentam-se diminuídos<sup>4</sup>, enquanto que os níveis aumentados indicam deterioração da condição requerendo mudanças na conduta terapêutica<sup>4</sup>. Este teste sofre interferência quando é utilizado oxalato como anticoagulante ou a amostra é refrigerada ou congelada, ou se a

amostra sofreu hemólise<sup>6</sup>. Quanto a dosagem de ADA (Figura 6), 23,7% realizam a dosagem através do método de enzimático de Guisepe-Guisti; 76,93% não responderam. A enzima ADA, é uma enzima conversora da adenosina em inosina (metabolismo das purinas)<sup>5</sup>, catalisa a diferenciação de linfócitos e macrófagos durante a resposta imune celular, tendo um papel de destaque<sup>5,6</sup>. Níveis séricos elevados são observados em diversas patologias, incluindo tuberculose, em casos onde a ADA se encontra acima de 60U/I indica tuberculose ativa com sensibilidade de 100% e especificidade de 91,4%<sup>5,6,13</sup>. A hemólise prejudica sensivelmente o exame devido a sua atividade da ADA sobre os eritrócitos<sup>9</sup>. Esse teste é muito útil, atualmente, no diagnóstico diferencial dos derrames pleurais<sup>5</sup>.

Quanto as avaliações microbiológicas o que observou-se foi a bacteroscopia (Figura 7) é realizada através do método de Gram por 15,4% dos laboratórios; através do Gram/Ziel-Nielsen/Papanicolau por 7,7%; através do Gram e Ziel-Nielsen por 76,9% dos laboratórios. As bactérias mais comumente associadas com efusões parapneumônicas são o *Staphylococcus aureus* e certos bacilos gram-negativos<sup>4</sup>. A sensibilidade da coloração pelo Gram não está muito bem documentada no que concerne a líquido pleural, segundo a literatura<sup>4</sup>, raramente excedendo a sensibilidade de 70%<sup>4</sup>. A coloração direta para bactérias álcool-ácido-resistentes possui uma sensibilidade pequena (aproximadamente 10%), fazendo com que a associação entre bacteroscopia, cultura e biópsia se faça necessária para tornar a prova confiável<sup>4</sup>, aumentando com isso a sensibilidade para até 95%. Sendo que o diagnóstico definitivo da tuberculose depende do isolamento de bacilos do paciente e da identificação destes como sendo uma cepa virulenta; isso envolve a demonstração de que o bacilo sintetiza a vitamina niacina, reduzem nitrato a nitrito e se arranjam em forma de corda quando crescem em meios de cultura<sup>8,12</sup>. A cultura é realizada em 84,6% dos estabelecimentos e 15,4% não responderam. A presença de bactérias anaeróbias é detectada em uma quantidade significativa de casos (cerca de 40%), fazendo-se necessária a cultura tanto para anaeróbio como para aeróbios<sup>4</sup>. As infecções por bactérias anaeróbicas não tratadas podem levar a bacteremia<sup>1</sup>. A sensibilidade para cultura de bactérias tuberculínicas somente são positivas em 30% dos casos<sup>4</sup>; a biópsia pleural fornece uma maior sensibilidade para a cultura, além de fornecer um rápido diagnóstico presuntivo pela demonstração histopatológica de granulomas<sup>4,5</sup>. Quanto a pesquisa de fungos (Figura 8) na amostra ela é realizada através das seguintes formas: pelo micológico direto em 15,4% dos laboratórios; através da cultura da amostra em 7,7%; utilizando dois ou mais métodos em 76,9%, sendo que aqui incluem-se também a pesquisa através de análise feita utilizando o corante tinta da china. A cultura é realizada em meio Sabouraud, com a finalidade de identificar o fungo, já que seu diagnóstico correto só pode ser estabelecido após a identificação do fungo<sup>10</sup>. A cultura de fungos é feita em estufa a 25°C para suas formas saprofitas (não patogênicas) e para a forma de levedura devem

ser cultivados a 37°C para que haja a indução da transformação do fungo na forma invasiva (leveduriforme ou patogênica)<sup>8</sup>.

São realizados também com testes complementares nos laboratórios que responderam a pesquisa, entre eles estão: prova do Látex para *Pneumococo* em 15,4%. A prova do Látex para *Haemophilus* em 15,4%. A provas do látex é uma análise imunológica feita através do método de macro aglutinação sendo as partículas do látex responsáveis pela visualização do resultado na amostra<sup>4</sup>. A cultura para BAAR em 7,7%. As amostras suspeitas de infecções por bacilos álcool-ácido-resistentes devem ser cultivada em um meio próprio, o meio de Lowestein-Jeinsen que tem como base de ovo<sup>8,11</sup>, por se tratarem de bactérias com uma necessidade nutricional especial<sup>8</sup>. Pode-se proceder a descontaminação prévia da através do método de Petroff<sup>5</sup>, porém pesquisas realizadas provam que a não realização da descontaminação aumenta a sensibilidade do método<sup>7</sup>. As micobactérias causadoras da tuberculose tem seu crescimento lento, levando duas a três semanas para formar colônias viáveis<sup>11</sup>. A pesquisa de células neoplásicas em 7,7%. A diferenciação entre as células mesoteliais e as células neoplásicas, nem sempre é possível, sendo necessário recorrer a utilização de um painel de colorações imunocitoquímicas para a confirmação dá presença de células neoplásicas<sup>4</sup>. A dosagem de colesterol e triglicerídeos em 7,7%, é um método útil para se diferenciar transudato de exsudato, se os níveis pleurais de colesterol forem superiores a 55mg/ml ou se a razão entre o nível pleural e o nível sérico for superior a 0,3, há dados confiáveis para crer que se trate de um exsudato<sup>13</sup>, já a presença de grande quantidade de triglicerídeos sem a presença de cristais de colesterol é um indicativo de quilotórax<sup>13</sup>. A dosagem de amilase em 7,7%, quando seus níveis encontram-se elevados há indício de lesão pancreática, ruptura esofágica ou efusão maligna<sup>4,13</sup>, como é comum que a amilase se eleve primeiro no líquido pleural, sua determinação é recomendada em todos os casos de etiologia questionável<sup>13</sup>. A dosagem de ácido úrico em 7,7%. Esse é um teste pouco específico pois aparece elevado em qualquer tipo de neoplasia onde o "turnover" celular estiver alto, não sendo específico para patologias pleurais<sup>6</sup>. A determinação da presença de fator reumatóide (FR) em 7,7%; o FR está usualmente associado a efusão pleural associada a artrite reumatóide, podendo estar presente em título altos (1:1280) nos casos de pleurite reumática, também foram encontrados em pacientes com pneumonia bacteriana, efusões malignas, tuberculose, tornando com isso o exame de FR de rotina de pouco valor<sup>4</sup>. A reação rivalta em 7,7%. A pesquisa de alfa feto proteína em 7,7%. Alfa feto proteína é a principal proteína produzida pelo fígado do feto, está presente durante a vida intra uterina e em gestantes devido a junção das duas circulações, após o nascimento sua concentração diminui muito<sup>13</sup>. Em alguns casos de neoplasias seus níveis podem estar elevados, sendo um marcador tumoral<sup>4</sup>. A proteína C reativa (PCR) em 7,7%. A PCR é conhecida como uma proteína de fase aguda presente em casos de in-

flamação aguda; por ter seu aparecimento quase que simultânea a inflamação e por seu desaparecimento também ser rápido é um bom marcador de processos agudos, embora seja um marcador inespecífico por aparecer elevada em qualquer processo inflamatório<sup>4</sup>. A determinação de mucoproteínas em 7,7%. O antígeno carcinoembrionário (CEA) em 7,7%, a presença elevada de CEA é indício de reações inflamatórias e neoplásicas, sendo este o melhor parâmetro diagnóstico no caso de neoplasias pela sua grande correlação<sup>13</sup>. A dosagem dos níveis do sistema complemento em 7,7%, a determinação dos níveis do sistema complemento auxilia conjuntamente com o CEA no diagnóstico de reações inflamatórias e neoplasias, tendo nesse caso seus valores diminuídos em relação aos níveis séricos<sup>13</sup>.

Observamos que as técnicas recomendadas pela literatura estão sendo realizadas em proporções variadas, pelos laboratórios prestadores desse serviço no Estado de Santa Catarina, na rotina de líquido pleural. As rotinas que dependem de aparelhagem, como por exemplo a citocentrífugação ainda não foram incluídas em um número significativo de laboratórios. Técnicas como a determinação do antígeno carcinoembrionário, e dosagem do sistema Complemento, além das dosagens de triglicerídeos e coletol; embora em pequenas proporções já vem sendo incluídas na rotina de líquido pleural em alguns laboratórios.

O exame de líquido pleural inclui grande número de análises sendo, portanto, distribuído para diversos setores do laboratório de análises clínicas. Este procedimento confere a esse fluído uma característica peculiar, porque tanto as dosagens bioquímicas como a citologia, não entram na mesma rotina do sangue. A implantação de um setor exclusivo para os fluídos orgânicos, é inviável para a maioria dos serviços, mesmo sendo uma alternativa altamente qualificada. Podemos considerar que a rotina de líquido pleural não possui um protocolo uniforme entre os laboratórios que participaram da pesquisa, a causa mais provável dessa variação possivelmente seja a adaptação da rotina

de acordo com as condições de serviço e o tipo de paciente atendido. Este padrão de adaptação das metodologias disponíveis foi observado, também, nos exames de líquido e espermograma, mostrando ser uma característica peculiar da análise dos fluídos<sup>3,14</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Aos laboratórios de Análises Clínicas que participaram da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

1. **Chernecky, C. C.** *Métodos de laboratório, procedimentos diagnósticos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995. p.124-9, 208, 224, 252-3, 279-80, 289-91, 388-92, 568-9.
2. **Guimarães, R. X., Guerra C. C. de C.** *Clínica e laboratório interpretação clínica das provas laboratoriais*. 4ª ed. São Paulo: Editora Sarvier, 1990. p.559-64.
3. **Haas, P. Thiesen, K., Vituri, C. L.** Exame do Sêmen nos laboratórios do Estado de Santa Catarina. *Revista Newslab*, São Paulo, p.143-151.
4. **Henry, J. B.** *Diagnóstico Clínico e conduta terapêutica dos exames laboratoriais*. São Paulo: Editora Manole, 1989. p.21,294,472-5,1135.
5. <http://www.labhpardini.com.br/lab/bioquimica/ada.htm>. Instituto de patologia clínica hpardini. 06/03/2000.
6. [http://www.lamina.com.br/p\\_manual-3.htm](http://www.lamina.com.br/p_manual-3.htm). *Laboratório de Análises Médicas e investigações anátomo-patológicas*. 06/03/2000.
7. <http://www.nib.unicamp.br/sbpt/jornal/1996/artmar/art01.html>. *Avaliação de modificações na rotina do líquido pleural no rendimento diagnóstico de tuberculose pleural*. 06/03/2000.
8. **Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.** *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. Editora Prentice Hall, 1997.
9. **Mcbride, L. J.** *Textbook of Urinalysis and body fluids*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, p.239-47.
10. **Miller, O.** *Laboratório para o clínico*. 8ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1997. p.159-64,424-29.
11. **Pelczar Jr, M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R.** *Microbiologia conceitos e aplicações*. 2ª ed. São Paulo: Editora Makron Books, 1997. Vol II.
12. **Ringscud, K. M., Linné J. J.** *Urynalysis and body fluids a color text and atlas*. Missouri: Editora Mosby, 1995, p.201-5.
13. **Strasinger, S. K.** *Uroanálise e fluidos biológicos*. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, 1991. p.168-71,174,180.
14. **Vituri, C. L., Haas, P.** Exame do líquido nos laboratórios do Estado de Santa Catarina. *Revista Laes & Haas*, São Paulo, p.112-122.

Endereço para correspondência:

Profª Patrícia Haas  
Universidade Federal de Santa Catarina  
haas@ccs.ufsc.br

## TEMAS LIVRES Prêmio SBAC

**Categoria: "Melhor trabalho apresentado no Congresso"**

**Valor equivalente a US\$ 1,500.00**

**Será concedido um prêmio aos trabalhos apresentados e selecionados na sessão de Temas Livres dos congressos promovidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.**

**A premiação será feita na sessão de abertura, com a entrega do diploma.**

**O trabalho vencedor desse prêmio poderá fazer parte da programação oficial do Congresso.**

**Para concorrer ao prêmio, os interessados devem solicitar as informações necessárias à**

**Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**  
**Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro, RJ • 20270-902**  
**Tel (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2234-4881**  
**e-mail: congresso@sbac.org.br**

# Padronização da técnica antígenemia para a detecção do citomegalovirus

## Padronization of antigenemia methodology for detection of Citomegalovirus

L.R.R.V. Tsuchiya<sup>1</sup>; V. M. Hakim<sup>1</sup>; M. B. Nogueira<sup>1,2</sup>; G. A. R. Takahashi<sup>1</sup> & S. M. Raboni<sup>1</sup>

**RESUMO** – Antigenemia para citomegalovirus (CMV) é um importante marcador de evolução de doença e eficácia de tratamento em pacientes imunocomprometidos. O objetivo desse estudo foi comparar diferentes técnicas de processamentos e de imunomarcagem para a detecção da proteína da matriz do CMV pp65 em leucócitos do sangue periférico. Amostras de sangue coletadas de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (TMO) foram processadas e imunomarcadas por diferentes metodologias. Separou-se leucócitos de sangue periférico, utilizando-se duas técnicas, sedimentação espontânea a 37°C (Processamento 1) e a sedimentação com Dextran (Processamento 2), após a lise eritrocitária procedeu-se a contagem dos leucócitos, ajuste da densidade celular e o preparo das lâminas que continham  $2 \times 10^5$  células, por citocentrifugação. As lâminas, obtidas através das diferentes técnicas de processamentos, foram coradas, utilizando-se a metodologia de Imunoperoxidase (IP) e os resultados obtidos foram analisados de acordo com parâmetros qualitativos e quantitativos. Também avaliou-se duas diferentes técnicas de imunomarcagem: IFI (Imunofluorescência Indireta) e IP onde comparou-se o número de células positivas. Obteve-se lâminas de melhor qualidade pelo processamento 1 e um maior número de células positivas com técnica de IP.

**PALAVRAS-CHAVE** – Citomegalovirus, antigenemia, padronização, imunomarcagem.

**SUMMARY** – CMV antigenemia is a useful marker of disease progression and treatment efficacy in immunocompromised patients. The aim of this study was compared different procedures and immunostaining techniques for the detection of CMV pp65 lower matrix protein in peripheral blood leukocytes (PBL). Blood sample collected from Bone Marrow Transplant patients were performed by different procedures techniques and immunostaining methodologies. PBL was separated through a spontaneous sedimentation at 37°C (Procedure 1) and separation of leukocytes was made using Dextran (Procedure 2), and after erythrocytes lysis, was performed cell counting, cell density adjustment and slides containing  $2 \times 10^5$  cells, was prepared by cytocentrifugation. After, slides were stained by immunoperoxidase technique and the results were compared qualitatively and quantitatively. Either were compared different immunostaining techniques: IFI and IP and observed the number of positive cells. We had the slides of best quality with procedure 1 and the most number of positive cells with immunoperoxidase technique.

**KEYWORDS** – Citomegalovirus, antigenemia, padronization, immunostaining.

## INTRODUÇÃO

As infecções por CMV são as maiores causas de problemas clínicos em pacientes imunossuprimidos, especialmente transplantados. O curso da infecção pelo CMV nesses pacientes caracteriza-se pela viremia e tem sido monitorada com a detecção precoce da proteína da matriz pp65 do CMV, possibilitando o início da terapia antiviral e o acompanhamento da sua eficácia. (Schrim *et al*, 1999). Aproximadamente 50% de todos os receptores de transplante alogênicos desenvolvem infecção por CMV, sendo que alguns desenvolvem pneumonite intersticial (Winston *et al*, 1990). Relatos comprovam que, pacientes de TMO têm uma alta mortalidade quando desenvolvem doença, assim tornou-se necessário a detecção da replicação viral, antes que o vírus se aloje em algum ór-

gão (Raboni, 1994). O diagnóstico laboratorial das infecções por CMV era realizado pelos métodos tradicionais: cultura convencional e sorologia, os quais apresentavam diversas limitações quando aplicados em pacientes imunossuprimidos. Entre elas a cultura apresenta alto custo, baixa sensibilidade e demora no resultado, e devido a uma resposta imunológica irregular, nesse grupo de pacientes, a detecção de anticorpos específicos torna-se ineficiente (Cheeseman, 1992). Métodos de cultivo celular incluindo a metodologia de centrifugação rápida tem sensibilidade muito baixa quando o objetivo é detectar a infecção por CMV precocemente ao desenvolvimento de sintomas clínicos (George *et al*, 2000). Segundo os dados da literatura as metodologias diagnósticas aplicadas a estes pacientes devem apresentar critérios específicos tais como: 1) alta sensibilidade; 2) quantificação dos re-

Recebido em 27/7/2000

Aprovado em 20/8/2001

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. <sup>2</sup>Departamento de Patologia Médica Universidade Federal do Paraná

sultados; 3) rapidez; 4) grande reprodutibilidade (Schrim *et al*, 1999). Com o desenvolvimento da biologia molecular e de técnicas de DNA recombinante desenvolveram-se os métodos de diagnóstico rápido de CMV, que consistem no uso de anticorpos monoclonais, técnicas de hibridização de DNA e a reação de polimerização da cadeia (PCR), os quais permitem um diagnóstico preciso, rápido e em uma fase precoce da infecção viral. (Kidd *et al*, 1993). Muitos estudos têm demonstrado, que a detecção da fosfo-proteína de 65KDa, do CMV em leucócitos polimorfonucleares, tem alta sensibilidade, com vantagens, tais como: o tempo de execução e semiquantificação. (Gerna *et al*, 1991; Weinberg *et al*, 2000). O diagnóstico precoce da infecção ativa por CMV é essencial para o manejo terapêutico desta condição. (Boeckh *et al*, 1992; Weinberg *et al*, 2000). A glicofosfoproteína pp65 do CMV consiste em uma das primeiras proteínas expressas durante a replicação viral em leucócitos polimorfonucleares circulantes. (ERICE *et al*, 1992). Modificações importantes no teste antigemia para CMV estão sendo propostas em recentes publicações. Estas modificações têm com objetivo aumentar a sensibilidade do teste, assim como, seus valores preditivos e níveis quantitativos, para obter uma correlação com associação de doença por CMV. (Boeckh *et al*, 1994). Este estudo tem por objetivo padronizar a metodologia de antigenemia para CMV, analisando diferentes procedimentos no processamento da amostra clínica, fixação e imunomarcagem em amostras clínicas coletadas de pacientes do Serviço do TMO do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Avaliou-se amostras de sangue heparinizado de pacientes submetidos a TMO do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de março a maio de 1998. Os pacientes após o TMO fazem controle semanal, principalmente nos primeiros 120 dias pós-TMO de reativação de infecção por CMV, por meio da detecção da proteína pp65 no sangue periférico (antigenemia para CMV). Inicialmente foram testados dois métodos de extração leucocitária, denominados processamento 1 e processamento 2, nos quais, foram avaliados dois tipos diferentes de fixação das lâminas. Posteriormente, comparou-se duas metodologias de imunomarcagem: imunofluorescência (IFI) e imunoperoxidase (IP), onde comparou-se o número de células positivas.

### Conceitos

Para avaliação dos resultados utilizou-se parâmetros qualitativos e quantitativos, para isto, foram estabelecidos alguns critérios conceituais:

**a) Avaliação Qualitativa** – as lâminas avaliadas foram classificadas pelo aspecto morfológico, sendo aplicados graus de qualidade:

<b>Grau 1</b>	Ruim	poucas células 10/50 por campo, morfologia alterada, excesso de grumos por campo (1/5)
<b>Grau 2</b>	Regular	quantidade de células de 50/100 por campo, distribuição não homogênea das células, alguns grumos por campo (1/3)
<b>Grau 3</b>	Bom	quantidade de células > 100 por campo, distribuição homogênea com poucas células na periferia, escassos grumos por campo
<b>Grau 4</b>	Ótima	quantidade de células > 200 por campo, distribuição homogênea central e periférica, sem grumos, morfologia preservada

Para avaliação dos métodos de processamento, utilizou-se a coloração de imunoperoxidase, a fixação foi realizada com acetona por 10 min a 4°C.

**b) Avaliação Quantitativa** – observou-se o número de células positivas em cada lâmina para uma concentração de 200.000 leucócitos.

### Metodologias

Processamento das Amostras: As amostras foram processadas como descrito anteriormente (Chou *et al*, 1990). Avaliou-se, na fase de sedimentação de eritrócitos, a sedimentação espontânea - Procedimento 1 (Garcia *et al*, 1996), e a sedimentação através de Dextran - Procedimento 2 (Chou *et al*, 1990). Resumidamente, o processamento das amostras deu-se em até 3 horas após a coleta; sedimentou-se os eritrócitos, pelos 2 procedimentos, centrifugou-se o sobrenadante, submeteu-se o sedimento à hemólise das hemácias pelo cloridrato de amônia, após centrifugação deu-se a contagem das células do sedimento e ajuste do número de células para  $2 \times 10^6$ /mL, citocentrifugou-se 100mL da solução ajustada, a lâmina obtida continha  $2 \times 10^5$  células. As lâminas foram fixadas através de dois procedimentos; utilizou-se a fixação das lâminas em acetona a 4°C por 10 minutos e em formaldeído 5%, contendo sacarose a 2%, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão salina fosfatada pH 7,2 (PBS) contendo 1% de soro bovino fetal por 3 minutos. As lâminas obtidas foram coradas através de 2 metodologias de imunomarcagem, IFI (Hackman *et al*, 1985) e IP (Gerna *et al*, 1991). Resumidamente, as lâminas foram incubadas com diluição adequada do anticorpo primário (Clonab- C10 e C11 Biotest, inc.), por 45 minutos à temperatura de 25 +/- 2°C, após lavagem das lâminas com PBS, 2 vezes de 5 minutos, deu-se a incubação com o anticorpo secundário, marcado com FITC ou HRP. As lâminas coradas por IFI foram montadas com glicerina tamponada e lamínula, a leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência, onde fez-se a contagem das células positivas e avaliação de inespecificidades. Para a coloração por IP, posteriormente a lavagem das lâminas com PBS, revelou-se a ligação específica utilizando-se o cromógeno AEC (amino-etil-carbazol) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) como substrato. As lâminas foram avaliadas ao microscópio óptico, onde fez-se a contagem de células positivas e avaliação do padrão de qualidade. Aplicou-se nesse estudo, como metodologia estatística os testes não-

**TABELA I**  
**Avaliação qualitativa dos processamentos 1 e 2**

Dados	Processamento 1 (n=19)		Processamento 2 (n=19)	
	Número	%	Número	%
Grau 1	02	10,5	04	21,1
Grau 2	01	5,3	02	10,5
Grau 3	05	26,3	03	15,8
Grau 4	11	57,9	10	52,6

paramétricos "Qui-Quadrado" e "Exato de Fisher" obtidos por meio do *software* "EPI-INFO" e os testes "Comparação entre duas Proporções" e Wilcoxon" pelo *software* "Primer of Biostatistics".

## RESULTADOS

Analisou-se 19 amostras de sangue submetidas aos 2 procedimentos de sedimentação, avaliou-se aspectos qualitativos e quantitativos das lâminas, as quais foram coradas através da metodologia de IP. Observou-se na avaliação qualitativa, um maior percentual de lâminas graus 3 ou 4 no processamento 1, (84,5% vs. 68,4%) (Tabela I). Na avaliação quantitativa não detectou-se diferença significativa para os resultados reagente (mediana de 5,0 células vs. 3,0 células). Quando correlacionou-se os achados qualitativos e quantitativos dos processamentos 1 e 2 detectou-se que 57,9% das lâminas obtidas pelo processamento 1 foram conceituadas com graus 3 ou 4, sendo que 42,1% das lâminas obtidas pelo processamento 2 ficaram com o mesmo padrão. Na avaliação quantitativa, 26,3% das lâminas obtidas pelo processamento 1 foram reagentes, e apenas 15,8% das lâminas obtidas pelo processamento 2 obtiveram o mesmo achado; houve uma maior concordância quando o número de células reagentes nas lâminas era superior a 5,0 células reagentes em  $2 \times 10^5$  células (Tabela II). Posteriormente avaliou-se 38 lâminas obtidas pelo processamento 1 e coradas por IFI e IP. Observou-se que a quantidade de células reagentes na coloração de IP foi maior ( $p > 0,048$ ) (6,0 x 20,0 – valores medianos) (Tabela III e Quadro 1). As demais comparações não apresentaram diferença significativa (Quadro 1). Os procedimentos de fixação não foram correlacionados, pois observou-se que o formaldeído bloqueava a reação de IP, e os resultados obtidos com a coloração por IFI não foram satisfatórios. No quadro 1 correlacionou-se os resultados dos teste estatísticos aplicados no estudo.

## DISCUSSÃO

A antigenemia para CMV tem sido empregada para diagnóstico rápido na infecção por CMV objetivando o diagnóstico precoce da reativação da infecção o início e o monitoramento da terapia antiviral. Os primeiros anticorpos desenvolvidos foram o C10/C11 descrito por The e colaboradores em 1988, estes são anticorpos utilizados no kit desenvolvido pela Biotest. Gerna *et al.*, 1992 subsequentemente padronizaram a técnica de antigenemia demonstrando resultados superiores utilizando a fixação

**TABELA II**  
**Correlação qualitativa e quantitativa dos processamentos 1 e 2**

Processamento 1			Processamento 2		
Avaliação Qualitativa	Nº	%	Avaliação Quantitativa	Nº	%
Grau 1	02	10,5	Grau 4	02	10,5
Grau 2	01	5,3	Grau 2	01	5,3
Grau 3	05	26,3	Grau 1 Grau 3	03 02	15,8 10,5
Grau 4	11	57,9	Grau 1 Grau 2 Grau 3 Grau 4	01 01 01 08	5,3 5,3 5,2 42,1
Quantitativa			Quantitativa		
Não Reagente	14	73,7	Não Reagente	13	68,4
			Reagente	01	5,3
Reagente	05	26,3	Não Reagente	02	10,5
			Reagente	03	15,8

**TABELA III**  
**Avaliação dos resultados das colorações**

Dados	IFI (n = 38)		IP (n = 38)	
	Número	%	Número	%
Não Reagente	20	52,6	22	57,9
Reagente	16	42,1	15	39,5
Indeterminada	02	5,3	01	2,6
Número de Células Positivas	16		15	
Média ± desvio padrão	39,7	± <sup>(1)</sup> 70,0	146,6	± <sup>(1)</sup> 297,5
Mínimo e máximo	1,0	257,0	1,0	e 1094,0
Mediana	6,0		20,0	

<sup>(1)</sup>Desvio Padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana

**QUADRO 1**  
**Resultado dos testes estatísticos aplicados**

Processamento	Resultado do Teste	Teste Aplicado	Valor Tabelado	Significância
Grau	1,55	Qui-Quadrado	$p = 0,6713$	NS
1	0,451	Proporção	$p = 0,652$	NS
2	- 0,007	Proporção	$p = 0,994$	NS
3	0,396	Proporção	$p = 0,692$	NS
4	0,002	Proporção	$p = 0,998$	NS
Resultado	-	Fisher	$p = 0,500$	NS
Reagente	15,0	Wilcoxon	$p < 0,062$	NS
Coloração				
Resultado	0,01	Qui-Quadrado	$p = 0,9199$	NS
Reagente	- 64,0	Wilcoxon	$p > 0,048$	S

com formaldeído e imunomarcagem por IFI. Também demonstrado por Gerna *et al.*, 1992 que com a utilização dos "pools" de anticorpos 2C6M1C3 e 4C1, detectava-se maior número de células positivas aumentando a sensibilidade na detecção de níveis baixos de viremia (<5 células infectadas), porém, como relatado por George *et al.*, 2000 não foi encontrada nenhuma diferença significativa, quando utilizados os diferentes "pools" de anticorpos monoclonais. Segundo estudos realizados no Brasil em pacientes submetidos a TMO, a antigenemia para CMV é um

teste sensível, específico e de alto valor preditivo e negativo, para adoecimento pelo CMV, pós transplante alogênico de medula óssea, reforçando a sua importância na rotina de vigilância viral favorecendo o diagnóstico e a intervenção precoce de terapia antiviral. De acordo com o estudo observou-se um valor preditivo positivo e negativo de 71,4% e 84,2% respectivamente (Machado, 1996). Muitas discrepâncias têm sido observadas quando se utiliza diferentes kits, especialmente em amostras que apresentam 1 célula reagente o que é clinicamente significativo em transplantados de medula óssea. Estas discrepâncias podem ser explicadas devido às variações observadas na metodologia, as quais, ocorrem desde a coleta da amostra do paciente, diferenças no número de células concentradas nas lâminas, processamentos de fixação e coloração (Schrim *et al*, 1999). Devido a um alto índice de mortalidade, em torno de 50%, pelo CMV em pacientes submetidos a TMO, têm-se estimulado o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico rápidas e sensíveis para detecção deste agente. Isto permite o início precoce do tratamento antiviral e, conseqüente, menor mortalidade. Neste estudo avaliou-se diferentes técnicas no processamento das amostras para a detecção da antigenemia, assim como metodologias de imunomarcagem. Testou-se os processamentos 1 e 2, sendo que na análise quantitativa não houve diferença significativa para os resultados reagentes. Na avaliação qualitativa observou-se um maior percentual de lâminas conceituadas Graus 3 e 4 no processamento 1, onde detectou-se um padrão morfológico conservado das células; provavelmente isto seja decorrente de um menor número de lavagens e menor manipulação da amostra. Os procedimentos de fixação não foram correlacionados pois, provavelmente houve um bloqueio na reação de IP quando utilizou-se a fixação pelo formaldeído e, quando utilizou-se a IFI, não observou-se resultados satisfatórios, contrariando alguns artigos que relatam ser o formaldeído e a IFI superiores a acetona e IP. Estudos mais detalhados utilizando diferentes fixadores devem ser elaborados. Posteriormente foi avaliado a imunomarcagem com IFI e IP. Observou-se que a IP apresentou resultados quantitativos superiores aos da IFI. Estas observações podem ser devidas a um maior treinamento técnico para execução da reação pelo método de IP. Também, com a IP, obtém-se lâminas onde pode avaliar-se com maior precisão o aspecto morfológico das células e distinguir com maior facilidade reações inespecíficas de fundo, ao passo que, nas lâminas obtidas por IFI estes padrões são menos evidentes. De acordo com os resultados obtidos nesta análise, a padronização das técnicas foram definidas e aplicadas no Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Concluiu-se que o processamento 1 permite uma melhor qualidade das lâminas de antigenemia. Não há diferença quantitativa nas lâminas preparadas pelos processamentos 1 e 2. A imunoperoxidase apresentou melhor resultado quantitativo quando comparada com a IFI.

## REFERÊNCIAS

1. Boeckh, M.; Bowden, J. M.; Goodrich, M. P. *et al*. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 80, n.5, p.1358-1364, 1992.
2. Woogerd, P. M.; Stevens-ayers, T. *et al*. Factores influencing detection of quantitative Cytomegalovirus antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, n.3, p.832-834, 1994.
3. Cheeseman, S. H. Cytomegalovirus *In: Gorbach, S. L.; Bartlett, J. G.; Blacklow, N. Infectious diseases*. 1st ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p.1715-1719.
4. Chou, S. Newer methods for diagnosis of Cytomegalovirus infection. *Reviews of Infectious Diseases*, 12, p.S727-S736, 1990. Supplement 7.
5. Erice, A.; Holm, M. A.; Gill, P. C. *et al*. Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, n.11, p.2822-2825, 1992.
6. García, A.; Nivbó, J.; Benitez, M. A. *et al*. Comparison of two leukocyte extraction methods for Cytomegalovirus antigenemia assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, n.1, p.182-184, 1996.
7. George, K. S. T.; Boyd, M. J.; Lipson, S. M.; Ferguson, D. *et al*. A multi-site trial comparing two Cytomegalovirus (CMV) pp65 antigenemia test kits, biotest CMV Brite and Bartels/Argene CMV antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, n.4, p.1430-1433, 2000.
8. Gerna, G.; Zipeto, D.; Parea, M. *et al*. Monitoring of human Cytomegalovirus infections and Ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 164, p.488-498, 1991.
9. Revello, M. G.; Percivalle, E. *et al*. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human Cytomegalovirus antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, n.5, p.1232-1237, 1992.
10. Hackman, R. C.; Myerson, D.; Meyers, J. D. *et al*. Rapid diagnosis of Cytomegalovirus pneumonia by tissue immunofluorescent with a murine monoclonal antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 151, n.2, p.325-329, 1985.
11. Ho, M. Epidemiology of Cytomegalovirus infections. *Reviews of Infectious Diseases*, 12, p.S701-S710, 1990.
12. Kidd, M. L.; Fox, J. C.; Pillay, D. *et al*. Provision of prognostic information in immunocompromised patients by routine application of the polymerase chain reaction for Cytomegalovirus. *Transplantation*, 56, n.4, p.867-871, 1993.
13. Machado, C. M. Baixas doses de ganciclovir na profilaxia da doença pelo citomegalovirus pós-transplante de medula óssea. São Paulo, *Dissertação (título de Doutor em Medicina) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, 1996.
14. Raboni, S. M. Infecção por citomegalovirus humano em pacientes de transplante de medula óssea: patogenia e diagnóstico. Curitiba, *Dissertação (especialização em imunologia) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná*, 1994.
15. Schrim, J.; Kooistra, A.; Van Son, W. J.; Van der Bij, W. *et al*. Comparison of the Murex Hybrid Capture CMV DNA (v.20) assay and the pp65 CMV antigenemia test for the detection and quantitation of CMV in blood samples from immunocompromised patients. *Journal of Clinical Virology*, 14, p.153-165, 1999.
16. The, T. H.; Van der Ploeg, M.; Van den Berg, A. P. *et al*. Direct detection of Cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes - A Review of the Antigenemia Assay and Polymerase Chain Reaction. *Transplantation*, 54, n.2, p.193-198, 1992.
17. Van der Bij, W.; Van den Berg, A. P. *et al*. Cytomegalovirus Antigenemia. *Reviews of Infectious Disease*, 12, p.S737-S744, 1990, supplement 7.
18. Van den Berg, A. P.; Van Son, W. J.; Jiwa, N. M. *et al*. Recent advances in the diagnosis of active Cytomegalovirus infection after organ transplantation. *Transplantation Proceedings*, 22, n.1, p.226-228, 1990.
19. Van der Bij, W. *et al*. Early identification of patients at high risk of severe Cytomegalovirus disease after renal transplantation using the immediate early antigenemia assay. *Transplantation Proceedings*, 22, n.4, p.1800-1802, 1990.
20. Van der Bij, W.; Schirm, J.; Torensma, W.; Son, W. J.; Tegzess, A. M. And The, T. H. Comparison between viremia and antigenemia for detection of Cytomegalovirus in blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, p.2531-2535, 1988.
21. Wattanamano, P.; Clayton, J. L.; Kopicko, J. J.; Kissinger, P. *et al*. Comparison of three assays for Cytomegalovirus detection in AIDS patients at risk for retinitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, n.2, p.727-732, 2000.
22. Weinberg, A.; Hodges, T. N.; Li, S.; Cai, G. *et al*. Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and preventions of Cytomegalovirus disease after lung transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, n.2, p.768-772, 2000.
23. Winston, D. J.; Ho; Champlin, R. E. Cytomegalovirus infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Reviews of Infectious Diseases*, 12, p.S776-S792, 1990.

Endereço para correspondência:

Hospital de Clínicas Universidade Federal do Paraná  
 Serviço de Análises Clínicas – Laboratório de Virologia  
 Setor de Ciências da Saúde - 2º andar, sala 203  
 R. Padre Camargo, nº 280 - C.E.P: 80.060-240 - Centro - Curitiba, PR  
 E-mail: virologi@saude.ufpr.br

# Sistema automatizado para análise de cariótipos humanos\*

## Automated system for human karyotyping

R. M. C. Brancalhão<sup>1</sup>; P. A. Michel<sup>1</sup>; N. Kunke<sup>1</sup>; M. A. M. Soares<sup>1</sup>; L. F. C. Ribeiro<sup>2</sup>; A. P. Brandalize<sup>1</sup>;  
M. R. Cochak<sup>2</sup>; T. L. Costa<sup>2</sup> & A. Largura<sup>2</sup>

**RESUMO** – A análise de cariótipos humanos, procedimento padrão em investigações genéticas, é uma técnica complexa que demanda tempo, custo elevado, aliada ao trabalho de especialistas para a realização de um diagnóstico seguro. Tendo em vista estas características foi desenvolvido um sistema automatizado para análise de cariótipos humanos, na linguagem *Delphi 3.0 Client/Server Suite* e em ambiente *Microsoft Windows 98*. O sistema captura imagens de cromossomos metafásicos, diretamente do microscópio acoplado a uma câmara filmadora. Estas imagens são enviadas para uma unidade central de processamento, onde o software, organiza os pares cromossômicos pelo tamanho. Durante este procedimento uma série de rotinas permitem ao usuário não só a manipulação da imagem como um todo, mas também, dos cromossomos individualmente. O cariótipo, assim obtido, pode ainda ser comparado com um padrão de bandas existente, permitindo os ajustes finais. O software agiliza a análise cariotípica, dispensando alguns procedimentos manuais como o registro fotográfico, o recorte e a montagem manual dos pares cromossômicos. Os custos da análise também são reduzidos, tanto em termos materiais, quanto humanos, uma vez que se reduz o tempo gasto pelo especialista nas análises.

**PALAVRAS-CHAVE** – Cariótipo humano; análise automatizada, software.

**SUMMARY** – The human karyotyping is a standard tools for genetic investigations, which is costly and time consuming, requiring a highly trained technician to produce an accurate reading. For those reasons, an automated system was developed, based on *Delphi 3.0 Clint/Server Suite* language and *Microsoft Windows 98*. The basis of the test is a standard karyotyping. The images of the chromosomes from the slide are sent to a computer's CPU. The software manipulates the images and organises the chromosomal pairs by size. The software also allows for moving and arranging the chromosomes individually, one at a time. The chromosomes pairs are then compared with reference pattern of bands and the karyotype is determined. At the end we found out that the karyotyping far more flexible, time and cost efficient, compared to the old manual system that required photographing, clipping, assembly and matching the chromosome pairs by hand.

**KEYWORDS** – Human karyotyping; automated analysis, software.

## INTRODUÇÃO

A análise de cariótipos humanos representa um papel importante no estudo de anomalias genéticas, permitindo a detecção de uma série de alterações cromossômicas. O estudo cromossômico em linfócitos de sangue periférico é uma técnica padronizada desde 1956 e usada como rotina em laboratórios de genética humana com algumas variações. Basicamente consiste em uma punção venosa com seringa heparinizada. O sangue é inoculado em meio de cultura. O uso posterior de fitohemaglutinina estimula a divisão dos linfócitos e aglutina as hemácias. Após 72 horas adiciona-se um inibidor de fuso, bloqueando a divisão celular. Segue-se a hipotonia, lise das hemácias, fixação e a coloração. Os cromossomos metafásicos são liberados e analisados na microscopia. Na seqüência são fotomicrografadas as melhores metáfases, reveladas e

após ampliação é realizado o recorte manual dos cromossomos e a montagem do cariograma. Nesta montagem utiliza-se normas de classificação internacional, onde os cromossomos são organizados em grupos, em função do seu tamanho, posição do centrômero e padrão de bandas<sup>1,2,3,6,7,11,12,13,16,17,18</sup>.

O cariótipo é um exame que a maioria dos laboratórios de genética ainda empregam métodos convencionais, suscitando a necessidade de automação de pelo menos parte do trabalho, já que manualmente cada cromossomo da fotomicrografia deve ser recortado e organizado nos grupos. Nos últimos 20 anos a automação da análise cromossômica tem sido aperfeiçoada, porém ainda há carência de maiores estudos para a sua definição.

Assim, objetivando a criação de soluções que agilizem a análise cariotípica, reduzindo o tempo despendido no diagnóstico, bem como o seu custo, alia-

Recebido em 1/11/2001

Aprovado em 5/11/2001

\*Projeto financiado pelo RHA/CNPq

<sup>1</sup>UNIOESTE – Campus de Cascavel; <sup>2</sup>Laboratório Álvaro

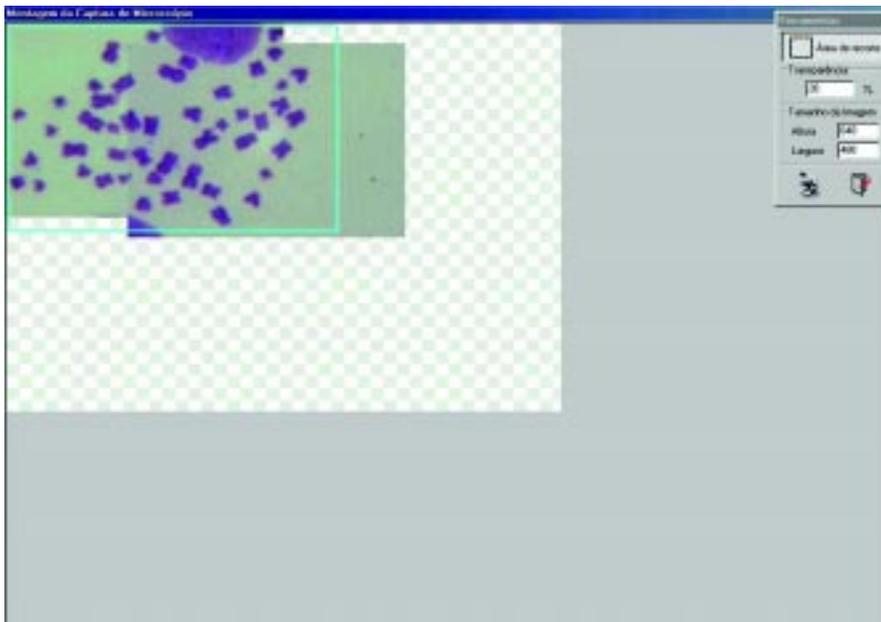


Fig. 1 - Módulo de junção das imagens metafásicas capturadas pelo microscópio. Em detalhe, a barra de ferramentas utilizada no tratamento destas imagens.

do à confiabilidade, foi desenvolvido um sistema automatizado para análise de cariótipos humanos, o **CarioAnálise**.

### MATERIAL E MÉTODOS

O *software* CarioAnálise foi desenvolvido em ambiente *Microsoft Windows 98*, utilizando a linguagem de programação *Delphi 3.0 Client/Server Suite*<sup>4</sup> e microcomputador *Pentium 233 MMX*. Este sistema opera utilizando imagens de cromossomos metafásicos humanos, que são capturadas diretamente do microscópio, através de uma câmara CCD. Estas imagens são então enviadas à unidade central de processamento.

Uma vez dentro do sistema a imagem metafásica passa por uma série de tratamentos, controlados pelo usuário, onde foram desenvolvidos módulos, rotinas, sub-rotinas e funções. Tais atividades foram desenvolvidas utilizando-se conceitos matemáticos<sup>9</sup> aliados a técnicas de computação gráfica<sup>5,10,14,15</sup>, que permitem não só o tratamento e a manipulação de toda a imagem metafásica, como também do cromossomo individualmente. Além disso, foi utilizado o site <http://www.efg2.com/><sup>6</sup> na elaboração de ferramentas e módulos do programa.

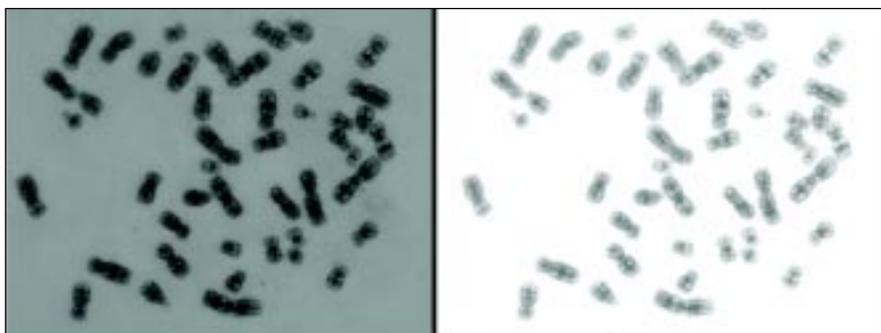


Fig. 2 - Imagem dos cromossomos metafásicos humanos, à esquerda, mostrando os "ruídos" gerados pela coloração de fundo. A direita, após tratamento pelo módulo balanço e pela ferramenta varinha mágica.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez obtida a imagem digitalizada, através de rotinas que fazem a interface de comunicação entre a placa digitalizadora e a câmara do microscópio, esta é armazenada no programa. No caso de imagens metafásicas com cromossomos muito dispersos, que não cabem na tela, foi desenvolvido um **módulo de junção** de duas ou mais imagens. Neste módulo uma barra de ferramentas permite a manipulação das imagens capturadas, com funções de: aumento do tamanho da tela, que permite a colocação de um número suficiente de imagens para posterior junção; transparência, útil na sobreposição das imagens capturadas para se obter a imagem final; deslocamento da imagem pela tela com o *mouse*; re-

corde (denominada área de recorte), permite a seleção da área de interesse; e teclas de ajuste fino e encaixe das imagens (Fig. 1).

A imagem capturada pode apresentar uma coloração de fundo heterogênea, devido as técnicas de preparo das lâminas de metáfase, o que dificulta a análise dos cromossomos. Além disso, esta coloração gera uma grande quantidade de "ruídos" na imagem, podendo ocasionar uma interpretação errônea pelo *software*. Neste sentido, visando a obtenção de imagens metafásicas que facilitem a análise foram desenvolvidos módulos e ferramentas, cuja somatória na aplicação geram uma imagem de fundo mais homogênea. Têm-se, assim, o **módulo balanço**, com as funções alterar brilho, contraste, saturação e tonalidade da imagem, que ressaltam a tonalidade dos cromossomos. A ferramenta **varinha mágica**, desenvolvida através de algoritmo de varredura linha a linha da imagem, permite que o usuário selecione, no índice de tolerância de cores, a cor que apresentar melhor homogeneização para a imagem de fundo. Esta rotina elimina uma grande parte do "ruído" encontrado (Fig. 2).

Entretanto, nem sempre a aplicação do módulo balanço e da ferramenta **varinha mágica** são suficientes

para se obter uma boa imagem para a análise. Neste caso, o *software* disponibiliza uma série de ferramentas para o tratamento da imagem metafásica: **borracha**, permite que pontos da imagem possam ser apagados; **retângulo**, possui funcionalidade similar a ferramenta borracha, diferindo apenas no tamanho da área tratada; **linha**, serve para separar cromossomos muito próximos ou unidos pelas bordas, pois eles podem ser interpretados como um só pelo *software*; **zoom**, serve

para aumentar/diminuir o tamanho da imagem, tornando mais precisas as operações sobre ela; **undo**, desfaz as últimas alterações feitas na imagem; **pincel**, captura a cor do ponto clicado para pintar outras áreas, esta ferramenta é útil para preencher pontos falhos (brancos) nos cromossomos; **recorte**, seleciona uma área qualquer da imagem para ser apagada, recortada, movida ou copiada. A área copiada ou recortada pode ser colada na própria metafase ou exportada para outras imagens. Esta ferramenta é muito útil para resolver o problema de cromossomos sobrepostos. Existe, também, a função **espessura** que define a espessura das ferramentas linha, pincel e borracha atingindo uma maior ou menor área de atuação (Fig. 3).

Os cromossomos da imagem metafásica podem ser circundados e contados pela aplicação da rotina **contar cromossomos**. Esta ferramenta pode ser utilizada em várias etapas do processo de análise cromossômica, ou seja, antes, durante e depois do tratamento dos cromossomos na imagem metafásica. O desenvolvimento desta rotina permite, também, a detecção de possíveis "ruídos" ainda presentes na imagem, facilitando sua remoção.

Após o tratamento, a imagem metafásica pode ser salva com o clique no botão salvar (Fig. 4), que ativa o item **analisar metafase** no menu funções, onde os cromossomos são extraídos e agrupados na tela Cariótipo (Fig. 5). Também foi desenvolvida a técnica de *Threads*,

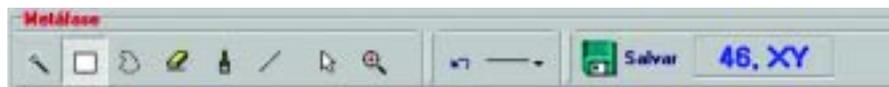


Fig. 3 - Forma de apresentação das ferramentas de tratamento da imagem metafásica humana no software.

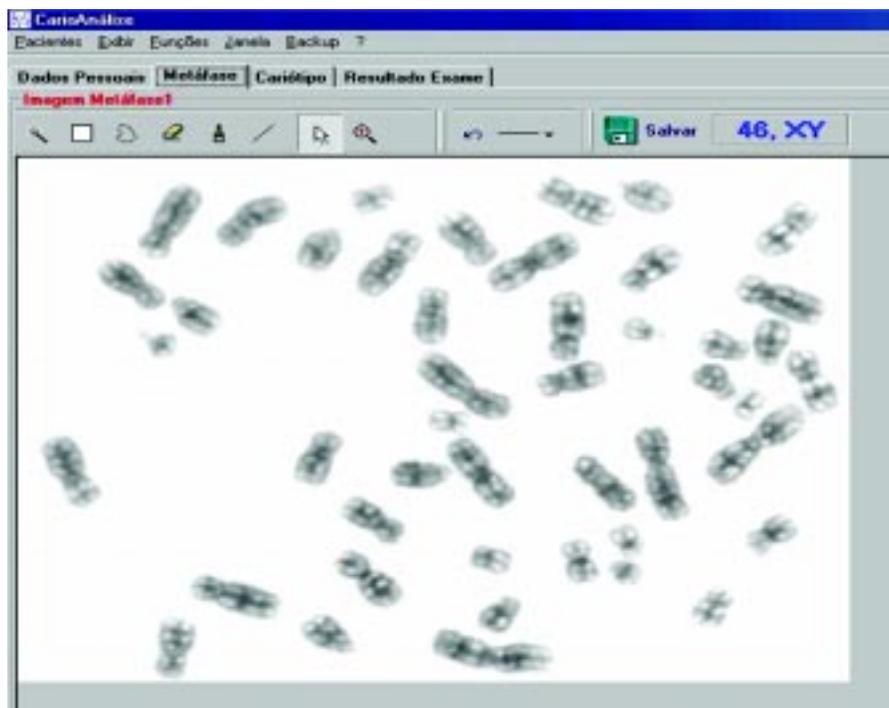


Figura 4 - Tela de tratamento da imagem metafásica.

que torna possível o cancelamento da análise da metafase em qualquer momento.

O software possibilita a manipulação individual dos cromossomos na tela de manipulação do cariótipo. Para tanto, foi desenvolvido o módulo **editar cromossomos**, contendo as ferramentas **borracha**, **pincel**, **zoom**, **borradinha**, **mover**, **undo** e **espessura**; cujas funções são similares às de tratamento da imagem metafásica como um todo (Fig. 6). Cabe ressaltar, que a ferramenta bor-

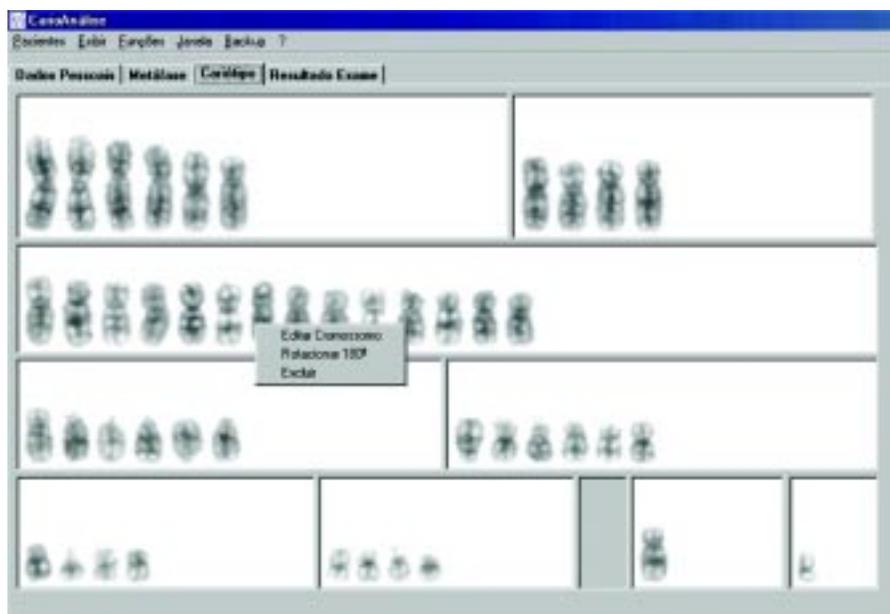


Fig. 5 - Imagem dos cromossomos metafásicos na tela de manipulação do cariótipo.

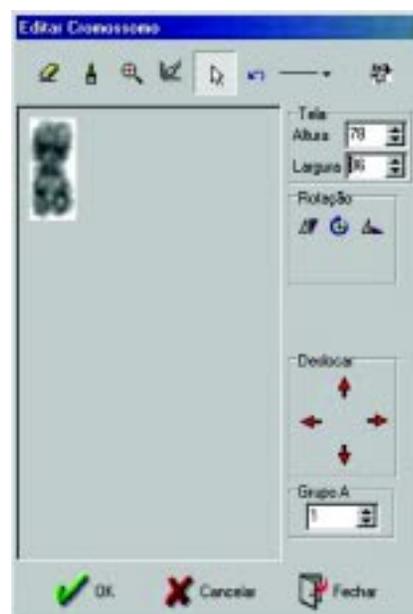


Fig. 6 - Forma de apresentação do módulo editar cromossomo.

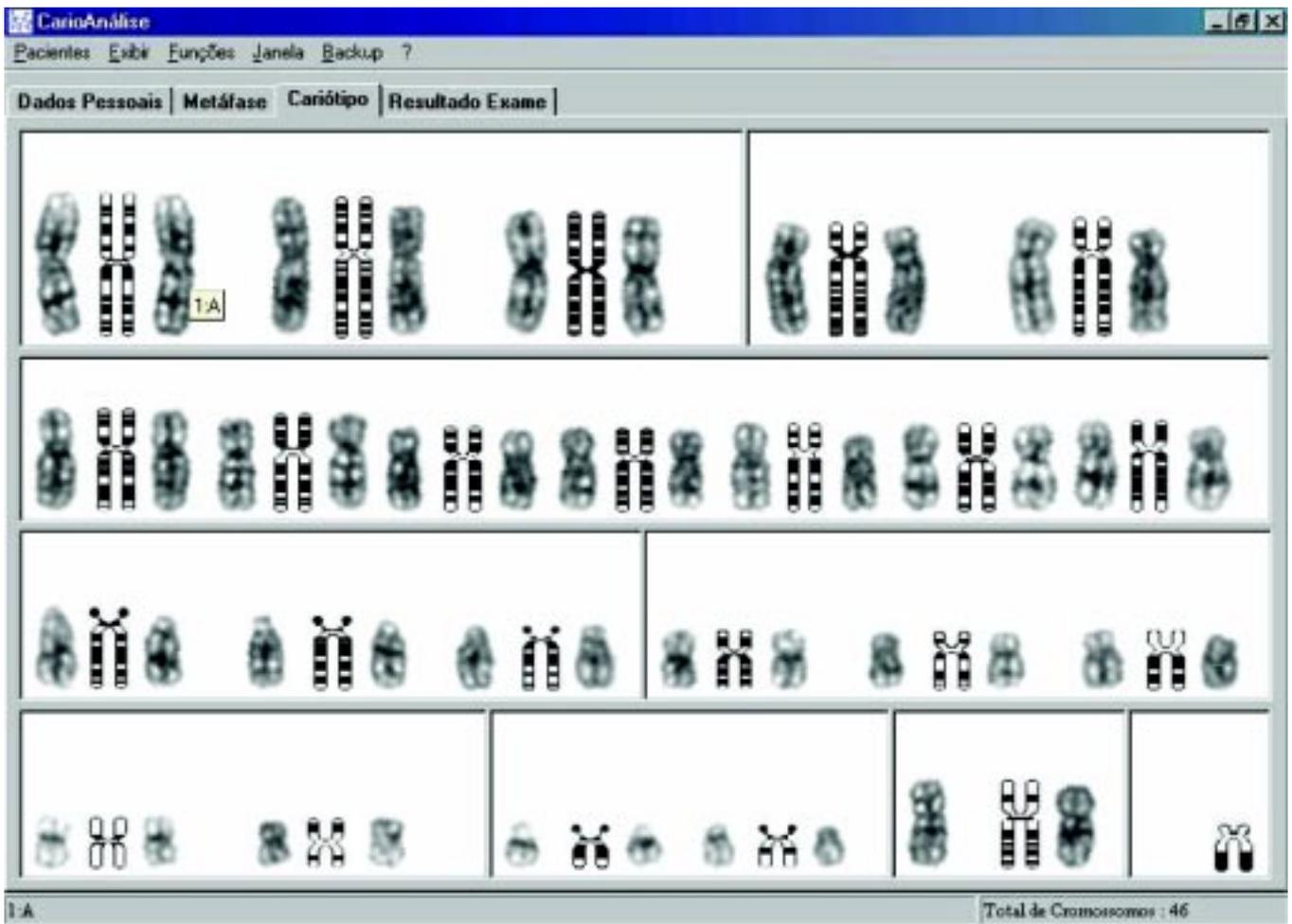


Fig. 7 - Imagem no software mostrando a função Exibir Padrões de Banda, que apresenta os cromossomos metafásicos humanos pareados e o seu respectivo padrão de bandas.

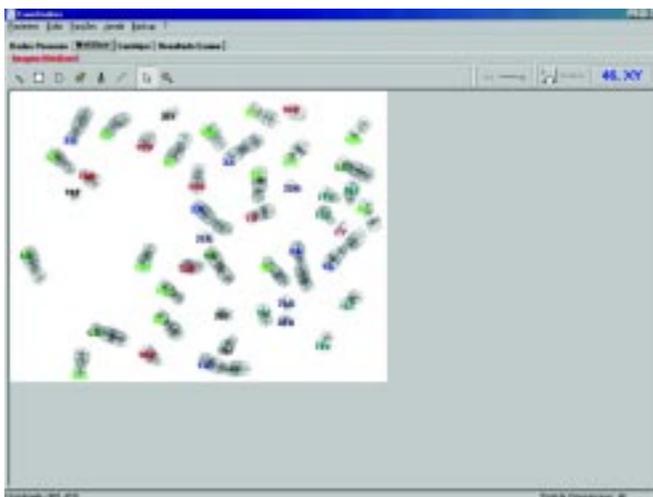


Fig. 8 - Imagem dos cromossomos metafásicos humanos com o uso da rotina Classificação de Grupos.

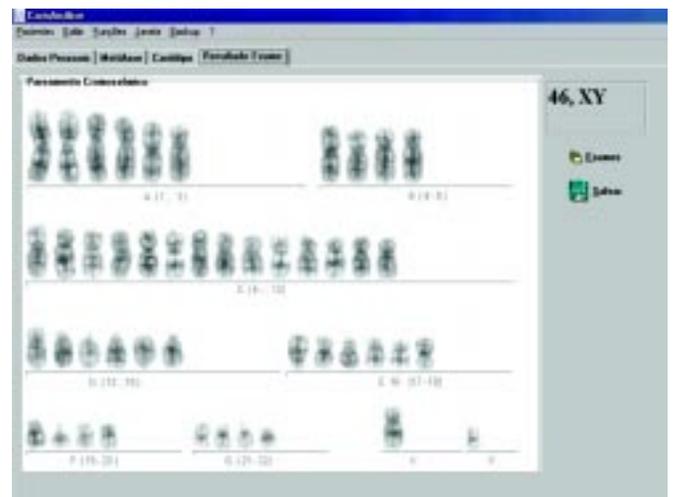


Fig. 9 - Imagem do resultado final do cariótipo humano.

radinha mescla cores circunvizinhas a um ponto clicado na imagem; desta forma, falhas ou pontos brancos são corrigidos.

Neste ponto da análise, ou seja, após os cromossomos serem extraídos da imagem metafásica e posicionados em ordem de tamanho, é possível executar a função **exibir padrão de bandas**; onde cada padrão de

banda é mostrado (inserido) entre cada par de cromossomos extraídos da imagem metafásica, possibilitando rearranjos manuais dos cromossomos analisados (Fig. 7).

Algumas vezes, pode ser necessário que a imagem metafásica seja impressa em um relatório ou mesmo visualizada na tela do monitor, com seus cromosso-

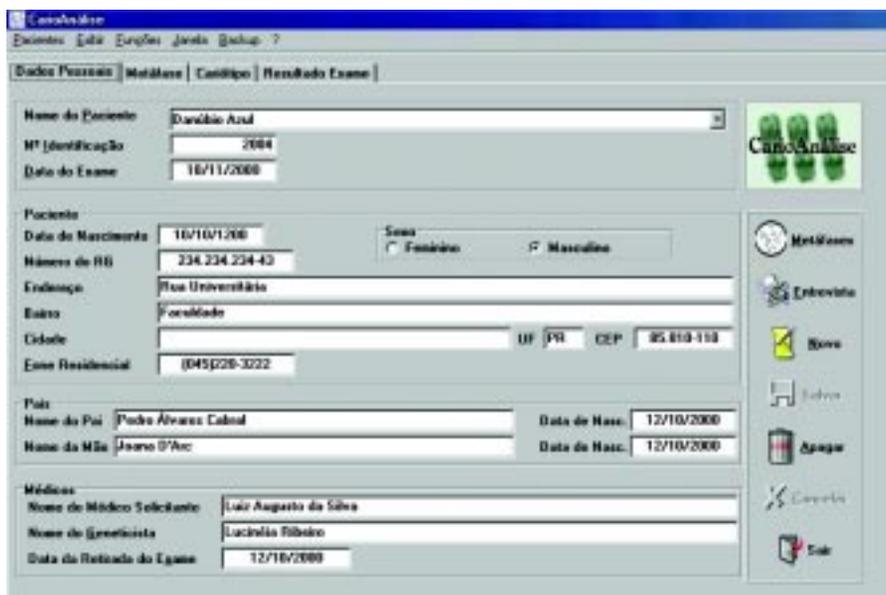


Figura 10 - Tela de cadastro de pacientes.

mos classificados de acordo com o número e o grupo. Para atender esta necessidade foi desenvolvida a rotina **classificação de grupos** (Fig. 8), onde cada grupo cromossômico é apresentado com uma cor diferente para uma melhor distinção.

Finalizado o tratamento da imagem o resultado do exame cariotípico é apresentado na tela de **resultado do exame** (Fig. 9). Este será o padrão do relatório impresso. Também, nesta tela é possível, através do botão **exames**, armazenar o resultado da análise do geneticista e salvar o pareamento, através do botão **salvar**.

No *software* foi desenvolvida a tela de cadastro de pacientes, que tem a finalidade de armazenar os dados cadastrais dos pacientes (Fig. 10). Esta tela traz um botão chamado **metáfases** onde é possível acessar o módulo gerenciador de metáfases do paciente e, a partir do gerenciador, pode-se selecionar as imagens associadas ao paciente cadastrado. Possui, também, o botão **entrevista**, necessário para acessar a tela de entrevistas com o paciente. Outros botões disponíveis são: **apagar**, para excluir o cadastro do paciente e suas respectivas imagens metafásicas; **novo**, para inserir um novo paciente; **salvar**, para gravar as alterações efetuadas no cadastro e **cancelar** para não efetivar as alterações.

Cabe ressaltar, que para todos os módulos e funções do programa foram desenvolvidos *Help on line*, que pode ser ativado pressionando o botão F1. Outra ferramenta que o *software* disponibiliza é o módulo *backup*, que efetua uma cópia de segurança da base de dados.

## CONCLUSÃO

A aplicação do *software* CarioAnálise coloca à disposição dos laboratórios de genética humana um nú-

mero apreciável de ferramentas para o tratamento da imagem metafásica, possibilitando a obtenção de um cariótipo, facilitando a análise do geneticista e permitindo a geração de diagnósticos confiáveis. Reduz-se o tempo despendido no processamento manual do material para a confecção do cariótipo, eliminando o processo de revelação e ampliação fotográfica, o recorte individual dos cromossomos, a colagem e a sua organização. Os resultados após a sua emissão são arquivados para futuras pesquisas. Conseqüentemente, há uma redução apreciável nos custos do exame, tanto material, quanto humano, já que o trabalho do geneticista e auxiliares são otimizados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o trabalho de professores, técnicos e ex-bolsistas que participaram em outras fases do projeto: Adriano de Castro Sabo, Amediana Tojevich Wronski, Anibal Mantovani Diniz, Elizabeth Leal da Silva, Fabiano Antunes, Ivaneliza Simionato de Assis, Luciana Roberta Felicetti, Marcos Vinícius Pires de Souza, Onildes Maria Taschetto e Ronald Felipe Wolochn.

## REFERÊNCIAS

1. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tenn., Editor: Mitelman, F. (Lund), 1994.
2. **Beiguelmam, B.** *Citogenética Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
3. **Borges, Osório, M. R.; Robinson, W. M.** *Genética Humana*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal, 1993.
4. **Cantú, M.** *Dominando o Delphi 3.0 "A Bíblia"*. Makron Books, 1997.
5. **Castleman, K. R.** *Digital image processing*. Prentice Hall, 1996.
6. **Cortés, F.** Bando de cromossomas. *Invest. y Ci.*, 97: 20-29, 1984.
7. **Curt, S.** *Genética Humana*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
8. **Earl F. Glynn II**, Overland Park, KS USA. Disponível em <http://www.efg2.com/> Acesso em: 3, 4, 5 fev., 15, 16, 17, 18 mar., 21, 22 abr., 2000.
9. **Facon, J.** *Processamento e análise de imagens*. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 1993.
10. **Gonzalez, R. C.; Woods, R. E.** *Digital Image Processing*. Addison-Wesley Publishing Company, 1992.
11. **Guerra, M. S.** *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.
12. **Guerra, M. S.** Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev. Brasil. Genet.*, 9:741-743, 1986.
13. **Mange, A. P.; Mange, E. J.** *Genetics: Human aspects*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc., 1990.
14. **Mascarenhas, N. D. A.; Velasco, F. R. D.** *Processamento digital de imagens*. São Paulo, Instituto de Matemática e Estatística, 1984.
15. **Pitas, I.** *Digital Image Processing Algorithms*. Prentice Hall, 1993.
16. **Seabright, M.** A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2:971-972, 1971.
17. **Summer, A. T.** A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75:304-306, 1972.
18. **Summer, A. T.; Evans, H. J.; Buckland, R. A.** New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.*, 232:31-32, 1971.

Endereço para correspondência:

Dr. Álvaro Largura  
Laboratório Álvaro Largura  
Rua General Osório, 3212 - Cascavel - PR

# Avaliação da fita indicadora de pH na determinação da capacidade tampão da saliva\*

## Evaluation of pH indicator paper in salivary buffer capacity determination

Cinthia Regiane Kotaka<sup>1</sup>, Aline Cláudia de Mello<sup>2</sup>, Lourdes Botelho Garcia<sup>3</sup> & Celso Luíz Cardoso<sup>3</sup>

**RESUMO** – Foi feito um estudo comparativo da determinação da capacidade tampão de 102 amostras de saliva utilizando potenciômetro e fita indicadora de pH. A influência da solução diluída de ácido clorídrico usada na técnica foi investigada comparando-se os resultados da solução de ácido clorídrico 0,005N padrão (titulada) com aquelas preparadas com ácido clorídrico novo e em uso. O fluxo salivar dos voluntários foi também estudado. A grande maioria (91,18%, 93/102) dos indivíduos apresentou fluxo salivar normal. Para as amostras de saliva cuja capacidade tampão foi determinada em potenciômetro houve concordância nos resultados de 97 amostras (95,09%) para as três soluções de ácido clorídrico testadas. Naquelas avaliadas com papel indicador de pH a concordância foi de 100%. Comparando-se os resultados da capacidade tampão obtidos pelos dois métodos observou-se resultados similares em 93,13% (95/102) das amostras. A maioria destes voluntários 74,73% (71/95) apresentou capacidade tampão normal e 25,26% (21/95) mostrou baixa capacidade tampão. Não houve diferença significativa entre a média dos valores de pH medidos no potenciômetro ou pela fita indicadora e nem das soluções diluídas de ácido clorídrico ensaiadas ( $P > 0,05$ ). Os resultados confirmam o uso da fita indicadora de pH para a realização do teste da capacidade tampão da saliva.

**PALAVRAS-CHAVE** – Capacidade tampão da saliva, fluxo salivar, fita indicadora de pH.

**SUMMARY** – A comparative study of the salivary buffer capacity determination of 102 saliva samples, using pH-meter and pH indicator paper, was carried out. The influence of the diluted solution of hydrochloric acid, used in the technique, was investigated comparing the results of the solution of 0.005N hydrochloric acid titrated standard, to those ones prepared with a new hydrochloric acid and another one which is in use. The volunteers' salivary flow was also studied. Most (91.18%, 93/102) of the volunteers presented normal salivary flow. For the saliva samples, whose buffer capacity was determined in pH-meter, there was an agreement in the results of 97 samples (95.09%) for the three tested solutions of hydrochloric acid. In those ones, evaluated with pH indicator paper, the agreement was of 100%. Comparing the results of the salivary buffer capacity, obtained by the two methods, we can observe similar results in 93.13% (95/102) of the samples. Most of these volunteers 74.73% (71/95) presented normal buffer capacity and 25.26% (21/95) of them showed a low buffer capacity. There was no significant difference, neither between the average of pH values measured in pH-meter or evaluated by the pH indicator paper, nor of the diluted tested solutions of hydrochloric acid ( $P > 0.05$ ). The results confirm the use of the pH indicator paper for the accomplishment of the salivary buffer capacity test.

**KEYWORDS** – Salivary buffer capacity, salivary flow, pH indicator paper.

## INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecciosa, crônica e transmissível, que resulta da perda localizada e progressiva de tecido mineralizado dos dentes afetados, causada pela ação de ácidos produzidos pela fermentação microbiana de carboidratos da dieta.<sup>2,8,20,32</sup> Embora a prevalência da cárie tenha diminuído muito nos últimos 20 anos, ela persiste como um grave problema de saúde pública em todo o mundo resultando na principal causa de perda dentária para adultos e crianças.<sup>8,25</sup>

A instalação do processo cariogênico resulta da presença de quatro fatores essenciais: o hospedeiro representado pelos dentes e pela saliva, a microbiota da cavidade oral, a dieta e o tempo. A cárie ocorre quando estes fatores de risco interagem em níveis críticos, i.e., um dente suscetível em um paciente colonizado por uma microbiota cariogênica - constituída principalmente por estreptococos do grupo mutans e por lactobacilos - consumindo uma dieta rica em sacarose em um determinado período de tempo.<sup>22,23,31,32</sup>

Assim, devido à etiologia multifatorial da cárie, uma combinação de exames, incluindo anamnese, exame

Recebido em 4/9/2001

Aprovado em 5/11/2001

\*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - Maringá, PR - Brasil

<sup>1</sup>Professora da Faculdade de Odontologia da UNINGÁ, Maringá, PR - Brasil; <sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Professor do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá

clínico, dieta, uso de flúor, testes salivares e bacteriológicos é usada na prática odontológica para avaliar o risco de cárie dos pacientes<sup>1,6,23,25,31</sup>. Entre os testes salivares, o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva merecem destaque porque são de fácil execução, rápidos, de baixo custo e apresentam uma relação inversa com a experiência de cárie<sup>1,5,17,18,23,25,31</sup>.

O fluxo salivar é responsável pela limpeza das superfícies orais, pela diluição dos ácidos e pelo transporte de microrganismos e restos alimentares que são deglutidos<sup>7,10,23,30,3</sup>. Indivíduos normais apresentam um fluxo salivar de 1 a 2 mililitros de saliva estimulada por minuto<sup>26</sup>. Por outro lado, bicarbonatos, fosfatos, uréia e proteínas da saliva fazem o tamponamento dos ácidos da cavidade oral, impedindo que o pH da saliva e da placa atinja limites inferiores a 5,5 e inicie o processo de desmineralização do dente<sup>4,12,21</sup>.

O teste da capacidade tampão da saliva é feito determinando-se em um potenciômetro o pH final de uma mistura de saliva e de ácido clorídrico diluído<sup>5</sup>. Valores de pH entre 5 e 7 são considerados normais<sup>21,26</sup>. Uma simplificação desta técnica para uso no consultório odontológico consiste no emprego de fita indicadora para avaliar o pH final da mistura saliva-ácido<sup>16,32</sup>. Entretanto, nós não encontramos na literatura um estudo sistemático validando este procedimento.

Outro aspecto desconhecido é se a solução diluída de ácido clorídrico usada na mistura saliva-ácido pode influenciar os resultados do teste da capacidade tampão considerando que, devido a baixa concentração de ácido nesta solução ela pode estar inadequada se for preparada a partir de um ácido clorídrico que, pelo tempo de uso, apresente uma concentração abaixo daquela especificada no rótulo do frasco.

No presente estudo comparamos os resultados do teste da capacidade tampão de 102 amostras de saliva determinadas em potenciômetro e pela fita indicadora de pH e investigamos a influência da solução diluída do ácido clorídrico (0,005 N) utilizada nos testes, comparando os resultados obtidos pelo emprego da solução de ácido clorídrico 0,005N padrão (titulada) com as soluções preparadas com ácido clorídrico novo e em uso. O fluxo salivar dos voluntários foi também incluído no estudo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Voluntários

Participaram como voluntários deste estudo 111 indivíduos adultos, sadios, de ambos os sexos, sendo a maioria constituída por acadêmicos, funcionários e professores da Universidade Estadual de Maringá. Nove voluntários foram excluídos porque produziram volumes de saliva insuficientes para a realização dos testes. Das 102 amostras de saliva analisadas, aproximadamente 72% (73/102) foram provenientes de voluntários do sexo feminino e 28% (29/102) obtidas de indivíduos do sexo masculino. A idade dos voluntários variou de 14 a 62 anos apresentando em média 28,91 ± 11,14 anos. Todos os voluntários foram informados sobre a natureza e o objetivo do trabalho e concorda-

ram de livre e espontânea vontade em participar do estudo.

### Colheita de saliva estimulada

A coleta da amostra de saliva estimulada foi feita utilizando-se o seguinte procedimento<sup>19,26,29</sup>:

- (i) Cada voluntário colocou na boca um cubo de aproximadamente 0,5 a 1 cm de parafina histológica (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP).
- (ii) Aguardou que a parafina atingisse a temperatura da cavidade oral, tornando-se amolecida. A saliva produzida durante este período foi deglutida.
- (iii) A seguir, a produção da saliva foi estimulada pela mastigação da parafina durante 5 minutos. A parafina era movimentada na boca de forma que todos os dentes fossem utilizados na mastigação. À medida que a saliva ia sendo produzida, ela era transferida para um tubo de ensaio graduado de 50 mL (Corning do Brasil, São Paulo, SP) estéril. Durante a obtenção da saliva os voluntários tiveram o cuidado de não colocar a parafina no tubo de ensaio com a saliva. Ao final da coleta a parafina foi desprezada no lixo. A coleta da saliva estimulada foi realizada duas horas após a ingestão de alimentos para evitar a interferência dos produtos da digestão nos resultados dos testes<sup>26</sup>.

### Determinação do fluxo salivar

A determinação do fluxo salivar foi realizada pela leitura direta do volume da saliva coletada no tubo de ensaio graduado de 50 mL (Corning). O volume total da saliva obtida foi registrado e o resultado expresso em mililitros de saliva estimulada produzida por minuto (mL/min). A interpretação do teste foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros:

- (i) Fluxo salivar normal: 1-2 mL/min (adultos)
- (ii) Fluxo salivar baixo: inferior a 0,7 mL/min
- (iii) Xerostomia: inferior a 0,1 mL/min<sup>21,26,29,31</sup>

### Determinação da capacidade tampão da saliva

#### Soluções de ácido clorídrico ensaiadas

O teste da capacidade tampão da saliva foi feito empregando-se três soluções de ácido clorídrico concentrado (12N, 37%) (Merck, Darmstadt, Germany):

- (i) Solução A - Solução padrão de ácido clorídrico 0,005N titulada pelo método do carbonato de sódio<sup>24</sup>
- (ii) Solução B - Solução de ácido clorídrico 0,005N preparada com ácido proveniente de um frasco lacrado, aberto no dia do experimento
- (iii) Solução C - Solução de ácido clorídrico 0,005N preparada a partir de um frasco de ácido em uso, aberto a 24 meses, porém dentro de prazo de validade (4 anos)

## Realização do Teste

Três tubos de ensaio 16 x 150 mm com tampa de rosca contendo, respectivamente, 3 mL das soluções A, B ou C do ácido clorídrico 0,005N foram identificados com o nome do paciente, número e a data. A saliva, coletada no tubo de ensaio graduado de 50 mL (Corning), foi homogeneizada durante 20-30 segundos em agitador de tubos tipo "mixer" (Thermolyne, model M63215, Barnsted/Thermolyne Co. Dubuque, IA, USA). A seguir, 1 mL da saliva foi transferida assepticamente, com auxílio de pipeta de 1 ou 2 mL, para os respectivos tubos de ensaio 16 x 150 mm. A mistura foi homogeneizada invertendo-se cada tubo por 5 vezes. As tampas dos tubos foram retiradas para a eliminação do gás carbônico e cada tubo foi deixado em uma estante a temperatura ambiente durante 10 minutos. A seguir, o pH final da mistura foi determinado utilizando-se duas técnicas:

- (i) Fita - Papel indicador de pH (Merck, Darmsted, Germany): com auxílio de bastão de vidro foi depositado uma gota da mistura saliva-ácido clorídrico sobre a área de teste do papel indicador de pH. A leitura foi efetuada imediatamente comparando-se a cor desenvolvida no papel indicador com a escala padrão de cores fornecida pelo fabricante;
- (ii) Aparelho medidor de pH - O pH da mistura saliva-ácido clorídrico foi determinado diretamente utilizando-se um potenciômetro Digimed, modelo DMPH (Digimed Instrumentação Analítica Ltda., São Paulo, SP).

A leitura e a interpretação do teste da capacidade tampão da saliva foi efetuada utilizando-se os seguintes parâmetros:<sup>21,26</sup>

- (i) Normal: pH 5,0 a 7,0
- (ii) Baixa: pH < 5,0.

## Análise estatística

Os valores de pH obtidos pelas duas técnicas foram comparados aplicando-se o teste *t* de Student, utilizando-se o programa "Statistica for Windows" (versão 4.3; Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Um valor de  $P < 0.05$  foi considerado significativo.

## RESULTADOS

Os resultados da determinação do fluxo salivar dos 102 voluntários amostrados em nosso estudo são apresentados na Tabela I. Os voluntários de números 10, 34, 43, 65, 67, 76, 80, 100 e 101 (9/102; 8,82%) apresentaram valores abaixo do normal, i.e., < 0,7 mL/min. Os voluntários restantes, 93/102 (91,17%), tiveram valores normais (Tabela I).

Os valores do pH final dos testes da capacidade tampão determinados em potenciômetro ou avaliados pela fita indicadora de pH variaram de, respectivamente, 3,29 a 6,73 e de 4,0 a 7,5.

Na Tabela II são mostrados os resultados da capacidade tampão das amostras de saliva de acordo com os parâmetros de atividade baixa (pH final < 5,0) e

**TABELA I**  
Distribuição dos valores do fluxo salivar das 102 amostras de saliva estimulada analisadas

Fluxo salivar em mL/min	Número de amostras de saliva	Porcentagem relativa
< 0,70	9	8,82%
0,7 - 1,0	27	26,47%
1,1 - 2,0	44	43,13%
2,1 - 3,0	20	19,60%
> 3,0	2	1,96%

**TABELA II**  
Distribuição dos valores da capacidade tampão determinada com auxílio de potenciômetro e da fita indicadora de pH das 102 amostras de saliva analisadas. Avaliação das três soluções<sup>1</sup> de ácido clorídrico utilizadas na realização do teste da capacidade tampão

Capacidade tampão da saliva (pH final)	Potenciômetro			Fita indicadora de pH		
	Número de amostras (%)			Número de amostras (%)		
	Sol. A	Sol. B	Sol. C	Sol. A	Sol. B	Sol. C
< 5,00 (26%)	27 (29%)	30 (25%)	26 (23%)	23 (23%)	23 (23%)	23
5,0 - 7,0 (73%)	75 (71%)	72 (75%)	76 (75%)	77 (75%)	77 (75%)	77
> 7,00	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	2 (2%)	2 (2%)	2 (2%)

1. Soluções de ácido clorídrico 0,005N: A = Padrão (titulada), B = Nova, C = Em uso  
2. Não detectado

**TABELA III**  
Comparação da capacidade tampão das 102 amostras de salivas analisadas nas quais o pH foi determinado em potenciômetro (pHmetro) e com auxílio de fita indicadora de pH. Aplicação do teste *t* de Student

Solução de ácido clorídrico 0,005N utilizada	Média do pH avaliado no pHmetro ± DP	Média do pH avaliado pela fita ± DP	Valor de <i>t</i>	<i>P</i> *
A (Titulada)	5,40 ± 0,86	5,46 ± 0,92	-0,424673	0,671527
B (Nova)	5,43 ± 0,85	5,45 ± 0,91	-0,162352	0,871191
C (Em uso)	5,50 ± 0,84	5,45 ± 0,91	0,434608	0,664311

\*Não significativo para  $P \geq 0,05$

normal (pH final de 5,0 a 7,0), adotados em nosso estudo. Nas amostras de saliva nas quais a capacidade tampão foi determinada em potenciômetro houve concordância nos resultados de 97 amostras (95%) para as três soluções de ácido clorídrico testadas. Naquelas avaliadas com papel indicador de pH a concordância foi de 100%.

Comparando-se os resultados da capacidade tampão obtidos com o uso do potenciômetro e com a fita indicadora foi observado uma pequena divergência em sete amostras (6,82%) e resultados similares em 93,13% (95/102) das amostras. Em termos gerais, considerando-se os resultados obtidos pelos dois métodos, a maioria (71% a 75%) dos voluntários apresentou capacidade tampão normal e 23% a 29% mostrou baixa capacidade tampão (Tabela II).

Conforme demonstrado na Tabela III, o teste *t* de Student não mostrou diferença significativa entre a média dos valores do pH final determinados em potenciômetro e aqueles avaliados com a fita indicadora

TABELA IV

Comparação das três soluções de ácido clorídrico<sup>1</sup> utilizadas na determinação da capacidade tampão da saliva<sup>2</sup>. Medida do pH feita com auxílio de potenciômetro. Aplicação do teste *t* de Student

Solução de ácido clorídrico 0,005N empregada	Média <sup>2</sup> do pH	Valor de <i>t</i>	Valor de <i>P</i> <sup>3</sup>
A versus B	5,40 versus 5,43	-0,194495	0,845984
A versus C	5,40 versus 5,50	-0,810268	0,418739
B versus C	5,43 versus 5,50	-0,620119	0,535879

1. A = Padrão (titulada); B = Nova; C = Em uso

2. Média da determinação das 102 amostras de salivas estimuladas analisadas

3. Não significativo para  $P \geq 0,05$

( $P > 0,05$ ). Também não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a média dos valores do pH final da capacidade tampão das amostras de saliva tratadas com as soluções "A", "B" ou "C" de ácido clorídrico 0,005N nos testes realizados em potenciômetro (Tabela IV) ou com a fita indicadora de pH (Tabela V).

## DISCUSSÃO

Atualmente, encontra-se amplamente reconhecido a importância do emprego dos testes salivares como p.e., fluxo salivar e capacidade tampão da saliva e dos testes bacteriológicos incluindo a contagem de estreptococos do grupo mutans e de lactobacilos da saliva, para avaliar o risco de pacientes a cárie dentária<sup>1,13,14,16,23,25,31</sup>. No Brasil, entretanto, por fatores técnicos e econômicos, estes testes são pouco utilizados na prática odontológica<sup>12,32</sup>. Por outro lado, a falta de divulgação dos testes salivares e bacteriológicos junto aos microbiologistas não estimula a inclusão destes exames na rotina dos laboratórios de Análises Clínicas.

Assim, no presente trabalho avaliamos o uso da fita indicadora de pH para a determinação da capacidade tampão da saliva com objetivo de validar este procedimento para uso no laboratório de Análises Clínicas. Adicionalmente, considerando a hipótese de que os resultados do teste da capacidade tampão poderiam ser influenciados pelo preparo inadequado da solução diluída de ácido clorídrico devido o baixo teor de ácido, comparamos também o uso de uma solução de ácido clorídrico 0,005N padrão (titulada) com o de soluções preparadas com ácido clorídrico novo e em uso.

O método padrão para determinar a capacidade tampão da saliva é a titulação sob pressão parcial de gás carbônico. Apesar de acurado, a titulação é um procedimento laborioso que por exigir equipamento especial fica restrito ao laboratório<sup>9</sup>. A clássica adaptação desta técnica para uso clínico, descrita por Ericsson<sup>5</sup>, consiste na mistura de 1 mL de saliva estimulada com 3 mL de ácido clorídrico 0,005N. Uma gota de álcool caprílico ou octílico é adicionada para evitar a formação de espuma. A seguir, borbulha-se lentamente uma corrente de ar sobre a mistura durante 20 minutos para eliminar o gás carbônico. A capacidade tampão é expressa pela leitura em potenciômetro do pH final da mistura saliva-ácido. Para uma faixa de pH entre 3 a 9, Ericsson<sup>5</sup> encontrou uma correlação linear ( $r = 0,96$ ) entre o seu método e a técnica padrão por titulação.

Uma simplificação da técnica de Ericsson é a eliminação da etapa de borbulhamento de ar. Assim, o

TABELA V

Comparação das três soluções de ácido clorídrico<sup>1</sup> utilizadas na determinação da capacidade tampão da saliva<sup>2</sup>. Medida do pH feita com de fita indicadora de pH. Aplicação do teste *t* de Student

Solução de ácido clorídrico 0,005N empregada	Média <sup>2</sup> do pH	Valor de <i>t</i>	Valor de <i>P</i> <sup>3</sup>
A versus B	5,46 versus 5,45	0,076319	0,939241
A versus C	5,46 versus 5,45	0,076431	0,939152
B versus C	5,45 versus 5,45	0,000000	1,0000000

1. A = Padrão (titulada); B = Nova; C = Em uso

2. Média da determinação de 102 amostras de saliva estimulada analisadas

3. Não significativo para  $P \geq 0,05$

tubo contendo a mistura saliva-ácido é agitado e deixado em repouso sem tampa durante 10 minutos para a eliminação do gás carbônico. A leitura do pH final é feita com auxílio de potenciômetro ou papel indicador de pH<sup>21,26,31,32</sup>. Estas modificações serviram de base para o desenvolvimento de "Kits" comerciais, como p.e., o DentoBuff<sup>®9</sup>, o DentoBuff Strip<sup>®6</sup>, indicados para fazer a determinação da capacidade tampão da saliva no consultório odontológico.

Em nosso meio, Koga *et al.*<sup>15</sup> investigaram a facilidade de uso e a precisão dos resultados dos testes salivares e bacteriológicos usados para avaliar o risco de cárie. Os autores incluíram em seu estudo a determinação da capacidade tampão de 10 amostras de saliva, utilizando potenciômetros de mesa e de bolso e fita indicadora de pH. Encontraram discordância em uma amostra, na qual o resultado do pH final da mistura saliva-ácido foi considerado normal pela fita indicadora (pH = 5,0) e baixo para os potenciômetros de bolso (pH = 4,8) e de mesa (pH = 4,0).

Em nosso estudo avaliamos um número mais representativo de amostras de saliva ( $n=102$ ) e encontramos uma concordância de 93% entre os métodos da fita indicadora de pH e do potenciômetro, que foi levemente superior àquela de 90% descrita por Koga *et al.*<sup>15</sup> Estes resultados mostram que a fita indicadora de pH, devido sua facilidade de execução e baixo custo, pode substituir com vantagem o potenciômetro na determinação da capacidade tampão da saliva.

Conforme evidenciado em nosso estudo, não houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos resultados da capacidade tampão das amostras de saliva cujas misturas saliva-ácido foram feitas com ácido clorídrico novo ou em uso (Tabelas III-V). Entretanto, é importante salientar que estes resultados são válidos apenas para a solução de ácido clorídrico 0,005N preparada no momento do uso. Assim, recomendamos que esta solução seja usada no teste imediatamente após o preparo e que não seja estocada para uso posterior, pois devido a baixa concentração de ácido clorídrico ela pode perder a atividade.

Vários estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva<sup>3,11,13,16</sup>. Nossos resultados foram consistentes com esta observação, pois dos nove voluntários que apresentaram fluxo salivar baixo, sete tiveram baixa capacidade tampão (pH < 5,0) e dois mostraram pH = 5,0 quando avaliados pela fita indicadora. Pelos critérios utilizados em nosso estudo, o pH final da mistura saliva-ácido foi considerado normal quando situado na faixa de pH de 5,0 a 7,0<sup>21,26,27</sup>.

Um estudo epidemiológico do fluxo salivar realizado na cidade de Bauru, São Paulo, envolvendo 1064 pessoas na faixa etária de 3 a 90 anos, mostrou fluxo salivar baixo em 30% dos indivíduos amostrados, principalmente em crianças e adultos com mais de 50 anos de idade<sup>28</sup>. Resultados similares foram descritos por Cury & Gil<sup>3</sup> investigando o fluxo salivar de 93 indivíduos, apesar destes pesquisadores utilizarem 1mL/min e não 0,7mL/min de saliva estimulada como parâmetro para caracterizar baixo fluxo salivar. Em nosso estudo, encontramos fluxo salivar baixo em apenas 8,82% (9/102) dos indivíduos analisados. Este resultado talvez possa ser explicado porque a média da faixa etária dos participantes foi de 28,91 (desvio padrão  $\pm$  11,14 anos), sendo constituída, portanto, por poucas crianças e idosos.

Em resumo, os resultados obtidos em nosso estudo comprovam a indicação da fita indicadora de pH para a realização do teste da capacidade tampão da saliva. Adicionalmente, mostramos também que a solução diluída do ácido clorídrico 0,005N não influencia o resultado do teste desde que preparada no momento de uso a partir de um ácido clorídrico concentrado de boa procedência. O ácido pode estar em uso, mas deve estar dentro do seu período de validade.

## REFERÊNCIAS

1. Bratthall, D. & Carlsson, J. Estado atual dos testes de atividade de cárie, p. 239-257. In: *Tratado de Cariologia*. Thylstrup, A. & Fejerskov, O. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica Ltda., (Tradução: S. Weyne), 1988.
2. Burnett, G. W.; Scherp, H. W. & Schuster, G. S. *Microbiologia oral & doenças infecciosas*. 4ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A. (Tradução: W. C. de Araújo), p.254-326, 1978.
3. Cury, J. A. & Gil, P. S. S. Identificação dos pacientes com potencial cariogênico. Avaliação preliminar do fluxo e da capacidade tampão salivar de brasileiros. *R. G. O.*, 32:106-108, 1988.
4. Dowd, F. J. Saliva and dental caries. *Dent. Clin. N. Amer.*, 43:579-597, 1999.
5. Ericsson, Y. Clinical investigations of the salivary buffering action. *Acta Odontol. Scand.*, 17:131-165, 1959.
6. Ericsson, D. & Bratthall, D. Simplified method to estimate buffer capacity. *Scand. J. Dent. Res.*, 97:405-407, 1989.
7. Edgar, W. M. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J.*, 172:305-312, 1992.
8. Featherstone, J. D. B. The science and practice of caries prevention. *J. A. D. A.*, 131:887-899, 2000.
9. Frostell, G. A. Colourimetric screening test for evaluation of the buffer capacity of saliva. *Swed. Dent. J.*, 4:81-86, 1980.
10. Hall, H. D. Protective and maintenance functions of human saliva. *Quintessence Int.*, 24:813-816, 1993.

11. Heintze, U.; Birkhed, D. & Björn, H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Scand. Dent. J.*, 7:227-238, 1983.
12. Jorge, A. O. C. *Microbiologia Bucal*. 2ª edição, São Paulo, Santos Livraria Editora, p.66-75, 1998.
13. Klock, B. & Krasse, B. Microbial and salivary conditions in 9 to 12-year-old children. *Scand. J. Dent.*, 85:56-63, 1977.
14. Klock, B. & Krasse, B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. *Scand. J. Dent. Res.*; 87:129-139, 1979.
15. Koga, C. Y.; Unterkircher, C. S.; Fantinato, V.; Shimizu, M. T. & Jorge, A. O. C. Testes de atividade de cárie. Avaliação de diferentes métodos. *R. G. O.*, 43:141-144, 1995.
16. Krasse, B. *Risco de cárie. Guia prático para controle e assessoramento*. 2ª ed, São Paulo, Quintessence Editora Ltda., (Tradução: J. F.; L. De Andrade), p.41-43, 1988.
17. Larmas, M. Simple tests for caries susceptibility. *Int. J. Dent.*, 35:109-117, 1985.
18. Larmas, M. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *Int. Dent. J.*, 42:199-208, 1992.
19. Marques, A. L. V.; Silva, O. P. & Pellegrino, D. *Microbiologia Oral*. Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, SP, p.259, 1970.
20. Marsh, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent. Clin. N. Amer.*, 43:599-614, 1999.
21. Navarro, M. F. L. & Côrtes, D. F. Avaliação e tratamento do paciente com relação ao risco de cárie. *Maxi-Odonto: Dentística*, 1(4):1-38, 1995.
22. Newbrun, E. *Cariologia*. 2ª ed, São Paulo, Livraria e Editora Santos Ltda., (Tradução: J. L. F. de Andrade), p.17-49, 1988.
23. Mayer, M. P. A. Avaliação de risco de cárie. *Biblioteca da ABOPREV, fascículo 1*, p.5-11, 1991.
24. Morita, T. & R. M. V. Assumpção. *Manual de Soluções Reagentes & Solventes. Padronização - Preparação - Purificação*. 2ª ed, São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda., 1972. p.1-134.
25. Pardo, G. I. & Sreebny, L. M. Management for highly caries-susceptible patient. *J. Prosthet. Dent.*, 67:637-644, 1992.
26. Silver, J. G. & Krasse, B. Treatment of dental caries monitored by microbial methods: report of two cases. *J. Canad. Dent. Assn.*, 51:211-215, 1985.
27. Spadaro, A. C. C.; Caldeira, T. H.; Rocha, C. B.; Polizello, A. C. M. & Mestriner Jr, W. Método para avaliação clínica da capacidade tamponante salivar. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, 12:247-251, 1998.
28. Togashi, A. Y.; Montanha, F. P. & Tárzia, O. Levantamento epidemiológico do fluxo salivar da população da cidade de Bauru, na faixa etária de 3 a 90 anos. *Rev. Fac. Odont. Bauru*, 6: 47-52, 1988.
29. Storino, S. P. *Princípios de Cariologia*, 1ª ed. Rio de Janeiro, EPUME, p.39-44, 1988.
30. Tenovuo, J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 25:82-86, 1997.
31. Weyne, S. Curso para atualização e educação continuada em odontologia preventiva (cariologia). 5ª Aula. Estudo da cárie (V): o diagnóstico da atividade de cárie. A descoberta de pacientes de alto risco. *Rev. Bras. Odont.*, 43:36-49, 1986.
32. Weyne, S. Cariologia, p.1-42. In: *Dentística. Procedimentos Preventivos e Restauradores*. Baratieri, L. N. et al., 2ª ed, Rio de Janeiro, Quintessence, 1992.

Endereço para Correspondência:

Celso Luiz Cardoso  
Rua Arthur Thomas 129, Apto 201, Zona 1 - 87013-250 - Maringá, PR  
Fone: (0xx44)269-7336  
E-mail: deres@maringa.com.br

## TEMAS LIVRES Prêmio PNCQ

**Categoria: "Melhor trabalho em Controle de Qualidade"**

**Valor equivalente a US\$ 1,500.00**

Será concedido um prêmio aos trabalhos apresentados e selecionados na sessão de Temas Livres dos congressos promovidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

A premiação será feita na sessão de abertura, com a entrega do diploma.

O trabalho vencedor desse prêmio poderá fazer parte da programação oficial do Congresso.

Para concorrer ao prêmio, os interessados devem solicitar as informações necessárias à

**Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**

Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro, RJ • 20270-902

Tel (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2234-4881

e-mail: informacao.cong@sbac.org.br

# Características hematológicas e bioquímicas da doença falciforme no estado do Rio Grande do Norte\*

## Hematological and biochemical features of sickle cell disease in the state of Rio Grande do Norte

Sandra Rezende de Andrade<sup>1</sup>; Édvis Santos Soares Serafim<sup>2</sup>; Syrlei Rodrigues de Macêdo<sup>2</sup>; Elione Soares de Albuquerque<sup>2</sup>; Maria Zélia Fernandes<sup>3</sup>; Enildo Alves<sup>3</sup>; Marcos Dias Leão<sup>3</sup> & Tereza Maria Dantas de Medeiros<sup>1</sup>

**RESUMO** – O objetivo desse estudo foi caracterizar laboratorialmente a doença falciforme no Estado do Rio Grande do Norte, em 45 indivíduos, 25 do sexo masculino e 20 do sexo feminino, com faixa etária de 2 a 38 anos (média  $12,8 \pm 7,6$ ), sendo 37 portadores de anemia falciforme e oito de doença da Hb SC. Todas as amostras foram avaliadas mediante eritrograma, contagem de reticulócitos, eletroforese de hemoglobina em pH 8,5 e pH 6,2, dosagens de Hb A<sub>2</sub>, Hb Fetal, ferro sérico, bilirrubina total e frações, desidrogenase láctica e ácido úrico. De acordo com a metodologia utilizada observou-se que os portadores de anemia falciforme apresentaram valores médios de hematócrito, hemoglobina e hemácias significativamente mais baixos ( $p=0,00002$ ) que os dos portadores de doença da Hb SC. A gravidade da hemólise na anemia falciforme foi comprovada pelo aumento significativo dos níveis médios de reticulócitos, bilirrubina indireta e desidrogenase láctica em relação aos portadores de doença da Hb SC ( $p=0,02516$ ). A variação nos valores percentuais de Hb Fetal observada entre os portadores de anemia falciforme sugere a necessidade de estudos posteriores sobre os diferentes tipos de haplótipos da globina  $\beta^S$  em nossa população.

**PALAVRAS-CHAVE** – Doença falciforme; diagnóstico laboratorial; anemia falciforme; doença da Hb SC.

**SUMMARY** – The objective of this research was to characterize in laboratory the sickle cell disease in the Rio Grande do Norte State, among 45 individuals, 25 males and 20 females, with age varying from 2 to 38 years old (average  $12.8 \pm 7.6$ ), resulting 37 sickle cell anemia carriers and 8 with the Hb SC disease. All samples were evaluated through erythrogram, reticulocytes counting, hemoglobin electrophoresis at pH 8.5 and 6.2 and through A<sub>2</sub> Hb, Fetal Hb, serum iron, total bilirubin and bilirubin's fractions, serum lactic dehydrogenase and serum uric acid dosages. According to the adapted methodology, it was observed that sickle cell anemia carriers presented average values of packed cell volume, hemoglobin and red blood cell that were significantly lower ( $p=0.00002$ ) than those from the Hb SC disease carriers. The gravity of hemolysis in the sickle cell anemia was assured by the significant increase of the average levels of reticulocytes, indirect bilirubin and serum lactic dehydrogenase in relation to the Hb SC disease ( $p=0.02516$ ). The variation in Fetal Hb percentile values observed among sickle cell anemia carriers suggests the need of further studies on the different types of  $\beta^S$  globin haplotypes in our population.

**KEYWORDS** – Sickle cell disease; laboratorial diagnostic; sickle cell anemia; Hb SC disease.

### INTRODUÇÃO

Doença falciforme é um termo genérico utilizado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pela predominância da hemoglobina S<sup>20</sup>. É a mais comum das doenças genéticas em negros americanos, afetando aproximadamente 1 em 375 pessoas de descendência africana<sup>28</sup>. Normalmente o termo doença falciforme refere-se ao estado homocigoto da hemoglobina S (Hb SS) denominado anemia falciforme, porém também inclui a associação da hemoglobina S com outras hemoglobinas variantes (doença da Hb SC), e as interações da hemoglobina S com as  $\alpha$  e  $\beta$  talassemias<sup>23</sup>.

Entre as doenças falciformes, a anemia falciforme é a mais freqüente representando a sua forma mais grave, que se caracteriza por apresentar anemia hemolítica crônica cujos eritrócitos têm uma sobrevivência em torno de 17 dias<sup>17</sup>. As principais manifestações clínicas incluem aumentada susceptibilidade à infecções e recorrentes crises vaso-oclusivas dolorosas levando a um dano orgânico isquêmico crônico<sup>24</sup>. Na população brasileira, a sua ocorrência deriva do fato da presença do contingente negróide ser marcante, devido ao intenso tráfico de escravos africanos<sup>19,22</sup>.

As manifestações clínicas da doença da Hb SC são similares, porém menos grave do que as da anemia falciforme. No entanto, os indivíduos com doença da

Recebido em 8/8/2001  
Aprovado em 10/9/2001

\*Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / UFRN

<sup>1</sup>Profª adjunta da disciplina Hematologia Aplicada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>2</sup>Médica hematologista do Hemocentro do Rio Grande do Norte – HEMONORTE

<sup>3</sup>Médico(a) hematologista do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – NHH/UFRN

Hb SC apresentam retinopatia, necrose asséptica da cabeça dos ossos longos, e esplenomegalia na fase adulta<sup>4,9,12</sup>.

Várias técnicas têm sido descritas na literatura para caracterizar laboratorialmente a doença falciforme, e, cada vez mais, a eficácia e a rapidez desses testes são exigidas de modo a contribuir mais significativamente para o diagnóstico e o tratamento dessas hemoglobinopatias<sup>27,28</sup>. Considerando ser essa doença um problema de saúde pública, foi realizado um estudo no Estado do Rio Grande do Norte visando a sua caracterização hematológica e bioquímica.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

A população estudada, selecionada a partir de uma amostragem aleatória simples, constituiu-se de 45 pacientes, 25 do sexo masculino e 20 do sexo feminino, com faixa etária de 2 a 38 anos (média  $12,8 \pm 7,6$ ). A classificação dos indivíduos em brancos, pardos e negros foi feita levando em consideração a cor da pele e tipo de cabelo, sendo desse modo 7 indivíduos classificados como brancos, 34 pardos e 4 negros, diagnosticados como portadores de doença falciforme, sem história de transfusão sanguínea nos últimos três meses. Esses pacientes foram atendidos nos ambulatórios médicos do Hemocentro do Rio Grande do Norte - HEMONORTE e Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os indivíduos participantes do estudo eram provenientes da cidade do Natal e de vários municípios do interior do Estado. Todos os pacientes ou seus representantes legais assinaram o termo de consentimento após serem informados sobre o estudo. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa com o paciente em jejum de 8 horas, sendo 5 mL colhido com anticoagulante (EDTA) e 5 mL sem anticoagulante para as dosagens bioquímicas. De cada amostra, foi realizada a distensão sanguínea, efetuada sem anticoagulante.

Os parâmetros hematológicos foram analisados através do contador automático de células *Cell Dyn* modelo 1700 e a contagem de reticulócitos efetuada pela técnica habitual utilizando solução de azul de cresil brilhante a 1%.

Cada amostra foi hemolisada com solução de saponina e submetida à eletroforese em pH alcalino, utilizando-se como suporte fitas de acetato de celulose (Cellogel) e tampão Tris-EDTA Borato pH 8,5<sup>5</sup>. O reconhecimento das hemoglobinas foi feito mediante o emprego de padrões eletroforéticos conhecidos. Para a confirmação das hemoglobinas S e C, foi realizada a eletroforese em pH ácido, tendo como suporte o gel de ágar (Difco) e tampão fosfato pH 6,2, após preparo de hemolisado obtido a partir de hemácias lavadas com solução salina e tratado com água e clorofórmio<sup>18</sup>. A presença da Hb S foi confirmada pela positividade do teste de solubilidade<sup>13</sup>.

A dosagem de hemoglobina Fetal foi feita pela técnica da desnaturação alcalina<sup>7</sup> e a Hb A<sub>2</sub> foi quantificada mediante eletroforese em acetato de celulose pH 8,5, seguida de eluição em solução de NaCl 0,9%<sup>8</sup>.

As dosagens bioquímicas de ferro sérico, bilirrubina

total e frações, desidrogenase láctica (LDH) e ácido úrico, foram realizadas utilizando kits da marca *Labtest*.

A análise estatística foi baseada em cálculos percentuais das variáveis qualitativas. Para as variáveis quantitativas, foram calculados a média, o desvio-padrão e a correlação de Pearson.

Para comparar os grupos segundo a distribuição da variável, realizou-se uma análise inferencial através da análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, aplicou-se o teste de Tukey (da diferença mínima significativa) para *n* desigual, com nível de significância de 5% em todos os casos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram caracterizados laboratorialmente 45 indivíduos portadores de doença falciforme, sendo, 37 portadores de anemia falciforme (82,2%) e oito, de doença da Hb SC (17,8%). Quanto ao grupo étnico, 15,6% eram brancos, 75,5% pardos, e 8,9%, negros (Tabela I).

Os 45 indivíduos estudados foram divididos em cinco grupos de acordo com a faixa etária. Pode-se observar que somente 20,0% dos pacientes estão na faixa etária acima de 20 anos (Tabela II). Percentuais semelhantes foram observados entre os pacientes com anemia falciforme. Esses achados confirmam a severidade da anemia falciforme no que diz respeito à sobrevivência do indivíduo.

Os valores médios de hemoglobina e reticulócitos nos pacientes com anemia falciforme foram  $7,9 \pm 1,1$  g/dL e

**TABELA I**  
Distribuição dos pacientes portadores de doença falciforme de acordo com o grupo étnico

Grupo étnico	SS		SC		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Branco	04	8,9	03	6,7	07	15,6
Pardo	29	64,4	05	11,1	34	75,5
Negro	04	8,9	0	0	04	8,9
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>82,2</b>	<b>08</b>	<b>17,8</b>	<b>45</b>	<b>100,0</b>

**TABELA II**  
Distribuição por faixa etária dos pacientes portadores de doença falciforme

Faixa etária	n	%
abaixo 4 anos	04	8,9
5 - 9 anos	15	33,3
10 - 14 anos	10	22,2
15 - 19 anos	07	15,6
acima 20 anos	9	20,0
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>100,0</b>

**TABELA III**  
Comparação dos valores médios de hematócrito (Hto), hemoglobina (Hb), hemácias (Hcias), índices hematimétricos (VCM e HCM) e reticulócitos entre os pacientes portadores de doença falciforme

Parâmetros	SS	SC
Hto (%)	$22,5 \pm 3,0^a$	$32,2 \pm 0,9^b$
Hb (g/dL)	$7,9 \pm 1,1^a$	$11,3 \pm 0,5^b$
Hcias ( $\times 10^{12}/L$ )	$2,5 \pm 0,3^a$	$4,31 \pm 0,2^b$
VCM (fL)	$89,2 \pm 7,1^a$	$74,8 \pm 4,1^b$
HCM (pg)	$31,4 \pm 2,9^a$	$26,2 \pm 1,7^b$
Reticulócitos (%)	$14,0 \pm 7,1^a$	$3,4 \pm 2,0^b$

Os valores estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) estão indicados nas linhas pelas letras divergentes

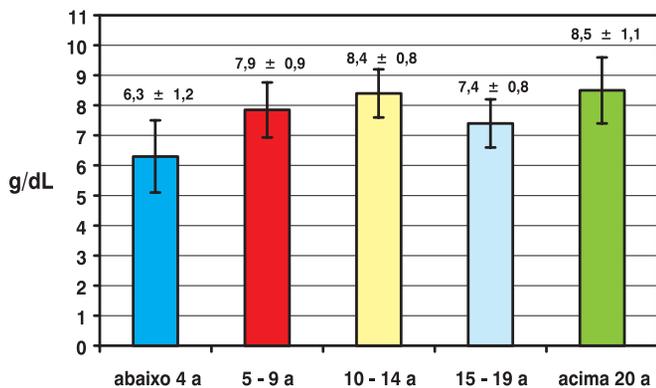


Figura 1 - Representação gráfica por faixa etária dos valores médios de hemoglobina dos portadores de anemia falciforme.

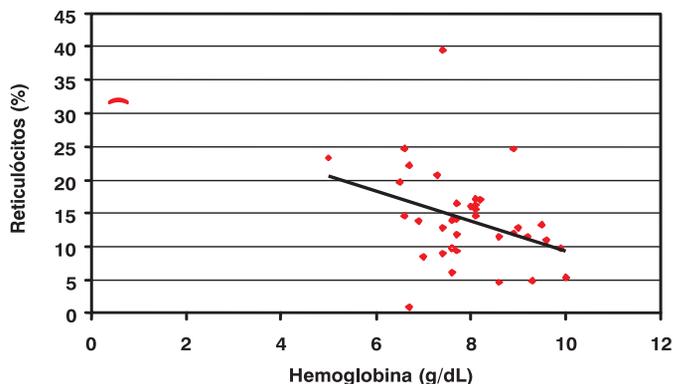


Figura 2 - Diagrama de dispersão dos valores médios de hemoglobina e reticulócitos dos portadores de anemia falciforme, com reta ajustada.

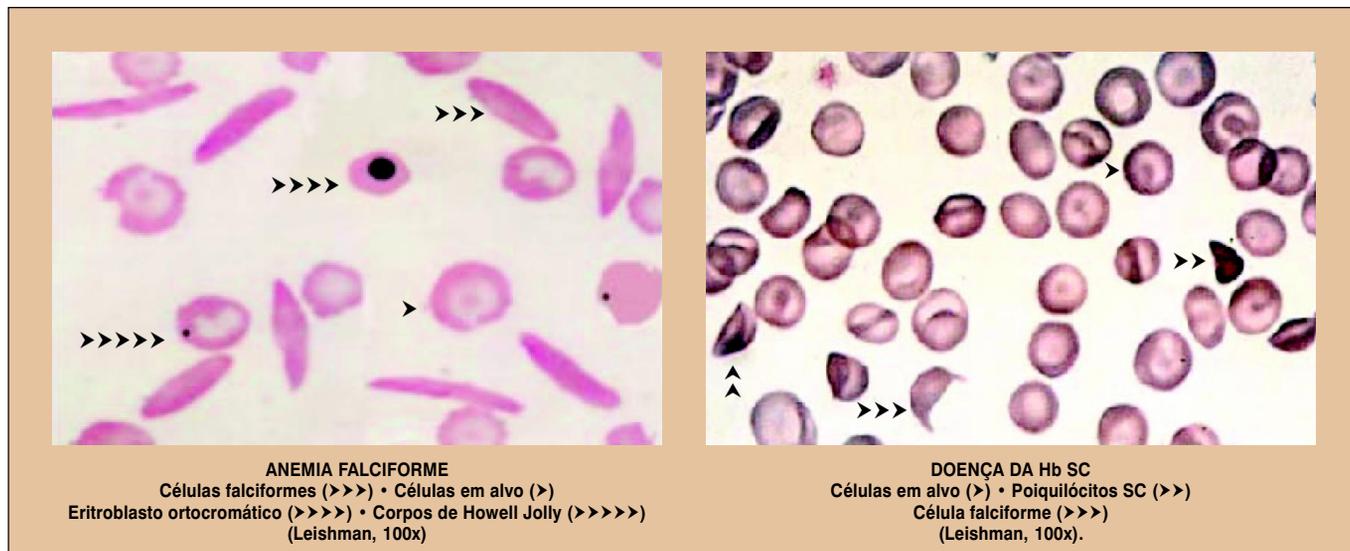


Figura 3 - Alterações morfológicas evidenciadas nas distensões sangüíneas dos portadores de doença falciforme.

14,0 ± 7,1%, respectivamente (Tabela III). Na doença da Hb SC os valores médios encontrados foram 11,3 ± 0,5 g/dL e 3,4 ± 2,0%, respectivamente. Esses resultados corroboram os dados encontrados na literatura<sup>4,6,11,12,14</sup>, que caracterizam a anemia falciforme como uma anemia hemolítica crônica severa, com baixos níveis de hemoglobina e valores elevados de reticulócitos.

Considerando a faixa etária, verificaram-se níveis mais baixos de hemoglobina no grupo com idade abaixo de 4 anos, e valores mais elevados no grupo com idade acima de 20 anos (Figura 1). A análise de variância (ANOVA) realizada entre os cinco grupos, mostrou diferença significativa (p=0,0094). Verificou-se que estas diferenças estão entre os grupos de faixa etária abaixo de 4 anos e de 10 a 14 anos, e abaixo de 4 anos e acima de 20 anos de idade. Esses dados demonstram a gravidade da anemia falciforme nos primeiros anos de vida.

Analisando os valores médios de hemoglobina e reticulócitos dos pacientes portadores de anemia falciforme, observou-se que houve uma correlação negativa estatisticamente significativa, ao nível de 5% entre as duas variáveis, demonstrando, assim, que quanto menor a concentração de hemoglobina maior a porcentagem do reticulócito (Figura 2).

Estabelecendo-se uma comparação entre os valores médios de hematócrito, hemoglobina e hemácias na doença falciforme, verificou-se que os portadores de doença da Hb SC tiveram valores médios significativamente mais elevados do que os pacientes com anemia falciforme (p = 0,00002) (Tabela III), não diferindo portanto, dos resultados descritos por Marcus *et al.*<sup>14</sup>.

O volume corpuscular médio (VCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) mostraram valores reduzidos na doença da Hb SC, enquanto na anemia falciforme, os valores médios observados mantiveram-se dentro da faixa de normalidade (Tabela III). Aplicando-se o teste de Tukey, verificou-se que os índices VCM e HCM foram significativamente menores na doença da Hb SC (p=0,00002). Resultados semelhantes foram reportados por Ballas *et al.*<sup>4</sup>, Belhani *et al.*<sup>6</sup>, Lee *et al.*<sup>12</sup>, Marcus *et al.*<sup>14</sup>, Stevens *et al.*<sup>25</sup> e West *et al.*<sup>27</sup>.

Todos os pacientes com anemia falciforme apresentaram, na distensão sangüínea, poiquilócitos do tipo células falciformes e células em alvo em intensidade variável (1+ a 3+). Os corpos de Howell Jolly e os eritroblastos circulantes estiveram presentes em 94,6% e 86,5%, respectivamente (Figura 3).

Uma das características mais notáveis dos eritrócitos na doença da Hb SC é a freqüência com que as

**TABELA IV**  
**Perfil eletroforético dos pacientes portadores de anemia falciforme**

Paciente	Tipos de hemoglobinas (%)			Teste de solubilidade
	S	F	A <sub>2</sub>	
1	91,50	5,50	3,00	Positivo
2	90,10	7,40	2,50	Positivo
4	90,30	6,60	3,10	Positivo
6	96,34	0,63	3,03	Positivo
7	92,10	5,00	2,90	Positivo
8	91,67	5,40	2,93	Positivo
9	94,50	1,20	4,30	Positivo
12	90,00	6,20	3,80	Positivo
14	90,70	5,20	4,10	Positivo
15	92,94	3,89	3,17	Positivo
16	91,71	6,65	1,64	Positivo
17*	92,97	3,81	3,22	Positivo
18	91,04	6,10	2,86	Positivo
19	93,73	3,77	2,50	Positivo
20	95,98	0,92	3,10	Positivo
21*	87,70	9,00	3,30	Positivo
22	94,94	1,85	3,21	Positivo
23	95,04	1,66	3,30	Positivo
24*	83,88	13,79	2,33	Positivo
25*	81,59	16,53	1,88	Positivo
26	80,33	17,55	2,12	Positivo
27	88,01	10,67	1,32	Positivo
28	94,02	3,81	2,17	Positivo
29	95,14	2,29	2,57	Positivo
32	92,80	4,38	2,82	Positivo
33	95,60	2,40	2,00	Positivo
34	89,50	8,40	2,10	Positivo
35	83,79	14,41	1,80	Positivo
36	86,42	10,72	2,86	Positivo
37*	78,35	18,29	3,36	Positivo
38	85,23	11,70	3,07	Positivo
39	93,62	4,50	1,88	Positivo
40	92,35	4,38	3,27	Positivo
41	93,06	4,42	2,52	Positivo
43	96,18	1,48	2,34	Positivo
44	95,57	1,60	2,83	Positivo
45	95,34	0,96	3,70	Positivo
<b>Média</b>	<b>90,90</b>	<b>6,30</b>	<b>2,78</b>	
<b>Desvio padrão</b>	<b>4,68</b>	<b>4,87</b>	<b>0,68</b>	

\* Paciente faz uso de hidroxiuréia

**TABELA V**  
**Perfil eletroforético dos pacientes portadores de doença da Hb SC**

Paciente	Tipos de hemoglobinas (%)			Teste de solubilidade
	S	C	F	
1				
3	52,58	46,15	1,27	Positivo
5	54,69	44,41	0,90	Positivo
10	55,64	43,71	0,65	Positivo
11	57,00	42,00	1,00	Positivo
31	50,15	48,85	1,00	Positivo
42	46,42	48,89	4,69	Positivo
47	58,70	39,00	2,30	Positivo
48	54,90	37,70	7,40	Positivo
<b>Média</b>	<b>53,76</b>	<b>43,84</b>	<b>2,40</b>	
<b>Desvio padrão</b>	<b>3,94</b>	<b>4,15</b>	<b>2,40</b>	

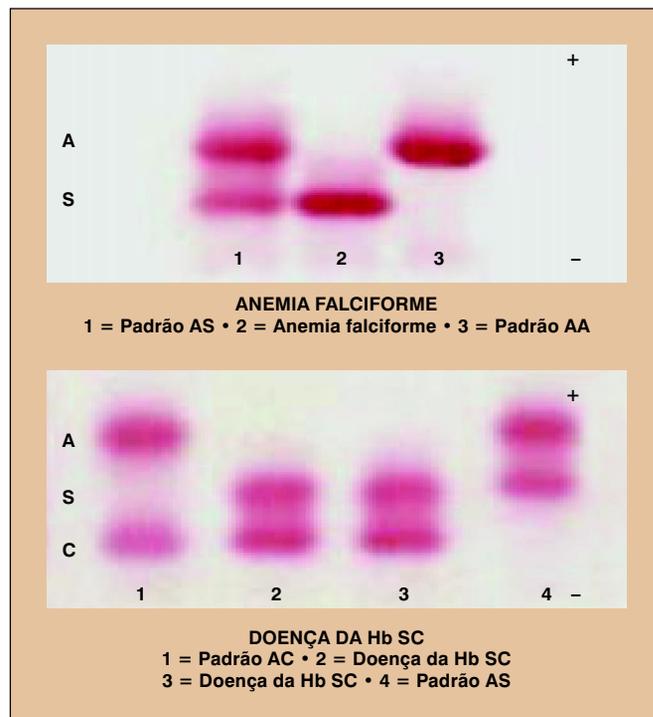


Figura 4 – Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH 8,5 de portadores de doença falciforme

células em alvo são encontradas na distensão sangüínea. Células falcizadas e cristais de Hb C podem também ser visualizados. Além disso, a presença de poiquilócitos SC é muito sugestiva de diagnóstico de doença da Hb SC. Esses poiquilócitos são células densas e disformes; alguns contêm grupos de cristais de forma variável, enquanto outros são curvados lembrando células falciformes<sup>3,16,26</sup>.

A distensão sangüínea dos portadores da Hb SC é ilustrada na Figura 3. Da mesma forma que nos pacientes com anemia falciforme, todos os portadores da Hb SC apresentaram células em alvo no sangue periférico. Quando comparados com os portadores da anemia falciforme, os pacientes com Hb SC tiveram menor número de células falciformes e eritroblastos circulantes (62,5%), enquanto poiquilócitos SC (62,5%) foram observados exclusivamente nos portadores da Hb SC. No entanto, não foram visualizados cristais de Hb C em nenhum dos pacientes estudados.

Os pacientes foram classificados como portadores de anemia falciforme quando somente as hemoglobinas S, F e A<sub>2</sub> estiveram presentes e o nível de Hb A<sub>2</sub> foi igual ou inferior a 3,5%. Pacientes com doença da Hb SC tiveram quantidades semelhantes de Hb S e Hb C em eletroforese em pH alcalino, com ligeiro predomínio da Hb S sobre a Hb C (Tabela IV e Figura 4).

A concentração média de Hb S dos portadores de anemia falciforme foi de 90,90% (Tabela IV), sendo significativamente mais elevada (p<0,0001) que a média de Hb S dos portadores da doença da Hb SC (53,76%) (Tabela V). Em todos os casos, a presença da Hb S foi confirmada pela positividade do teste de solubilidade.

No grupo dos 37 pacientes portadores de anemia falciforme, 5 estavam fazendo uso de hidroxiuréia (ca-

**TABELA VI**  
**Comparação dos valores médios de reticulócitos, desidrogenase láctica (LDH) e bilirrubina indireta entre os pacientes portadores de doença falciforme**

Parâmetros	SS	SC
Reticulócitos (%)	14,0 ± 7,1 <sup>a</sup>	3,4 ± 2,0 <sup>b</sup>
LDH (U/L)	447,8 ± 114,7 <sup>a</sup>	284,6 ± 86,7 <sup>b</sup>
Bilirrubina indireta (%)	2,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,7 <sup>b</sup>

Os valores estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) estão indicados nas linhas pelas letras divergentes.

nos 17, 21, 24, 25 e 37). Os quatro últimos casos fizeram uso da droga por mais de três meses e tiveram a percentagem de Hb F variando de 9,00 a 18,29%; o paciente 17 fez uso da droga durante três meses, tendo interrompido e reiniciado há  $\pm 10$  dias que antecederam a coleta. Entretanto, pode-se observar na Tabela IV que houve uma ampla variação nos valores percentuais de Hb Fetal (0,63 a 17,55%) entre os pacientes que nunca fizeram uso de hidroxiuréia. Essa variação talvez se dê pelo fato de existirem diferentes tipos de haplótipos da globina  $\beta$ , o que sugere a necessidade de estudos posteriores de análise de DNA na população estudada.

Comparando os valores médios de Hb Fetal entre os portadores de doença falciforme, verificou-se que os pacientes com anemia falciforme apresentaram valores significativamente mais elevados quando comparados aos da doença da Hb SC ( $p=0,03390$ ) (Tabelas IV e V).

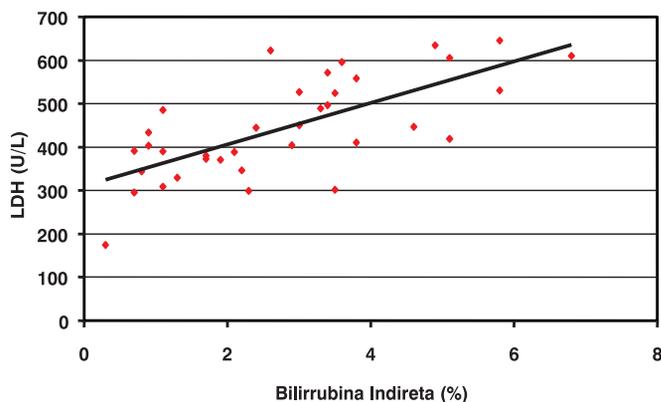
O ferro liberado devido à hemólise crônica em pacientes com anemia falciforme é incorporado aos tecidos sob a forma de depósito, não sendo, conseqüentemente, necessária a sua suplementação na rotina<sup>2,15</sup>.

Os valores médios de ferro sérico nos pacientes com anemia falciforme foram  $136,9 \pm 66,5$  mg/dL. Entretanto, 42,9% apresentaram sobrecarga de ferro e 5,7% tiveram valores abaixo do normal. Por outro lado, todos os pacientes portadores de doença da Hb SC mostraram níveis normais de Fe sérico.

Provavelmente a sobrecarga de ferro seja devida a múltiplas transfusões sangüíneas. No entanto, em virtude da dificuldade em obterem-se informações concretas sobre o número de transfusões desses pacientes, não houve possibilidade de estabelecer-se uma correlação.

Comparando os valores médios de reticulócitos, desidrogenase láctica e bilirrubina indireta entre os portadores de doença falciforme, verificou-se que os pacientes com anemia falciforme apresentaram valores significativamente mais elevados quando comparados aos da doença da Hb SC ( $p=0,00355$ ), indicando um componente hemolítico mais severo na anemia falciforme (Tabela VI).

Analisando os valores médios de bilirrubina indireta e desidrogenase láctica dos portadores de anemia falciforme, observou-se que houve uma correlação positiva estatisticamente significativa, ao nível de 5%, entre as duas variáveis (Figura 5). Esses resultados confirmam a gravidade da anemia falciforme em função da grande hemólise, caracterizada pelo aumento



**Figura 5 – Diagrama de dispersão dos valores médios de bilirrubina indireta e desidrogenase láctica dos portadores de anemia falciforme, com reta ajustada.**

significativo da bilirrubina indireta e desidrogenase láctica.

O excesso de ácido úrico nos pacientes com doença falciforme é decorrente do aumento da produção de uratos pela eritropoiese acelerada, associada à diminuição do clearance renal de uratos<sup>1,21</sup>.

Os níveis de ácido úrico nos portadores de anemia falciforme estiveram aumentados somente em 8,1% dos casos estudados, variando de 2,1 a 9,0 mg/dL. Resultados similares foram relatados por El-Hazmi *et al.*<sup>10</sup>, em 45 pacientes com anemia falciforme, estando a hiperuricemia presente em 4,4% dos pacientes.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir:

1. Na população estudada, a anemia falciforme foi a mais prevalente, caracterizando-se laboratorialmente como a forma mais severa das doenças falciformes.
2. Os portadores de anemia falciforme apresentaram valores médios de hematócrito, hemoglobina e hemácias significativamente mais baixos ( $p=0,00002$ ) que os portadores da doença da Hb SC.
3. O volume corpuscular médio foi significativamente reduzido ( $p=0,00002$ ) na doença da Hb SC, porém apresentou-se normal na anemia falciforme.
4. Os valores médios de reticulócitos, bilirrubina indireta e desidrogenase láctica foram significativamente mais elevados na anemia falciforme quando comparados aos da doença da Hb SC ( $p=0,00355$ ).
5. A concentração média de Hb S foi significativamente mais elevada na anemia falciforme ( $p < 0,0001$ ) do que os valores médios de Hb S da doença da Hb SC.
6. Os níveis médios de hemoglobina Fetal foram significativamente mais elevados na anemia falciforme quando comparados aos da doença da Hb SC ( $p=0,03390$ ).
7. A variação nos valores percentuais de hemoglobina Fetal observada entre os portadores de anemia falciforme, sugere a necessidade de estudos posteriores sobre os diferentes tipos de haplótipos da globina  $\beta^S$  em nossa população.

## AGRADECIMENTOS

Às médicas hematologistas, Dr<sup>a</sup> Linete Vasconcelos de Medeiros Rocha e Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Gomes Alves, Diretoras do HEMONORTE e Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, respectivamente, por permitirem a realização da coleta de sangue dos pacientes portadores de doença falciforme.

## REFERÊNCIAS

1. Al-Naama, L. M., Al-Sadoon, E. A., Al-Sadoon, T. A. Levels of uric acid, urea and creatinine in Iraqi children with sickle cell disease. *JPMA J. Pak. Med. Assoc.*, v. 50, n. 3, p.98-102, 2000.
2. Aken'Ova, Y. A., Adeyefa, I., Okunade, M. Ferritin and serum iron levels in adult patients with sickle cell anaemia at Ibadan, Nigeria. *Afr. J. Med. Med. Sci.*, v. 26, p.39-41, 1997.
3. Bain, B. J. Blood film features of sickle cell-haemoglobin C disease. *Br. J. Haematol.*, v. 83, n. 3, p.516-518, 1993.
4. Ballas, S. K., Lewis, C. N., Noone, A. M., Krasnow, S. H., Kamarulzaman, E., Burka, E. R. Clinical, hematological, and biochemical features of Hb SC disease. *Am. J. Hematol.*, v. 13, p.37-51, 1982.
5. Bartlett, R. C. Rapid cellulose acetate electrophoresis. *Clin. Chem.*, v. 9, n. 3, p.325-329, 1963.
6. Belhani, M., Morle, L., Godet, J., Bachir, D., Henni, T., Zerhouni, F., Ben-senouci, A., Colonna, P. Sickle cell b-thalassaemia compared with sickle cell anaemia in Algeria. *Scand. J. Haematol.*, v. 32, p.346-350, 1984.
7. Betke, K., Marti, H. R., Schlicht, I. Estimation of small percentages of Fetal haemoglobin. *Nature*, v. 184, p.1877-1878, 1959.
8. Bezerra, T. M. M. Quantificação de hemoglobina A<sub>2</sub> por eletroforese em acetato de celulose. *Rev. Bras. Patol. Clín.*, v. 20, n. 5, p.143-145, 1984.
9. Eckman, J. R. *Hemoglobins - What the results mean*. Recuperado em 15 de set. 2000. Disponível na Internet: <http://www.gateway.ovid.com>
10. El-hazmi, M. A. F., Al-faleh, F. Z., Warsy, A. S. Plasma uric acid, urea and creatinine in sickle cell disease. *Saudi Med. J.*, v. 10, p.471-476, 1989.
11. Karayalcin, G., Rosner, F., Kim, K. Y., Chandra, P., Aballi, A. J. Sickle cell anemia - clinical manifestations in 100 patients and review of the literature. *Am. J. Med. Sci.*, v. 269, n. 1, p.51-68, 1975.
12. Lee, K., Préhu, C., Mérault, G., Kéclard, L., Roudot-Thoraval, F., Bachir, D., Wajcman, H., Denis, L., Galactéros, F. Genetic and hematological studies in a group of 114 adult patients with SC sickle cell disease. *Am. J. Hematol.*, v. 59, p.15-21, 1998.
13. Magalhães, E., Arashiro, D. N. Um método simples para visualização da hemoglobina S em testes de solubilidade. *Rev. Bras. Patol. Clín.*, v. 13, n. 3, p.133-134, 1977.
14. Marcus, S. J., Kinney, T. R., Schultz, W. H., O'branski, E. E., Ware, R. E. Quantitative analysis of erythrocytes containing Fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. *Am. J. Hematol.*, v. 54, n. 1, p.40-46, 1997.
15. Mockenhaupt, F. P., Rong, B., Gunther, M., Beck, S., Till, H., Kohne, E., Thompson, W. N., Bienzle, U. Anaemia in pregnant Ghanaian women: importance of malaria, iron deficiency, and haemoglobinopathies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 94, n. 5, p.477-483, 2000.
16. Moll, S., Orringer, E. P. Hemoglobin SC disease. *Am. J. Hematol.*, v. 54, n. 4, p.313, 1997.
17. Nagel, R. L., Lawrence, C. The distinct pathobiology of sickle cell-hemoglobin C disease. *Hematol. Oncol. Clinics North Am.*, v. 5, n. 3, p.433-451, 1991.
18. Naoum, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo: Sarvier, p.171. 1997.
19. Naoum, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 22, n. 1, p.5-22, 2000.
20. Reid, C. D., Charache, S., Milner, P. F., Platt, O., Powars, D., Wethers, D. *Management and therapy of sickle cell disease*. 3rd ed. [s.l.: s.n.], 1995. Recuperado em 13 set. 2000. Disponível na Internet: <http://www.gateway.ovid.com>
21. Reynolds, M. D. Gout and hyperuricaemia associated with sickle cell anaemia. *Semin. Arthritis Rheum.*, v. 12, p.104-113, 1983.
22. Ruiz, M. A. Aspectos clínicos da anemia falciforme. *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 8, n. 139, p.89-92, 1986.
23. Schnog, J. J. B., Lard, L. R., Rojer, R. A., Van der Dijs, F. P. L., Muskiet, F. A. J., Duits, A. J. News concepts in assessing sickle cell disease severity. *Am. J. Hematol.*, v. 58, n. 1, p.61-66, 1998.
24. Serjeant, G. R. Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease. *Curr. Opin. Hematol.*, v. 2, p.103-108, 1995.
25. Stevens, M. C. G., Maude, G. H., Beckford, M., Grandison, Y., Mason, K., Serjeant, B. E., Taylor, B., Topley, J. M., Serjeant, G. R. Haematological change in sickle cell-haemoglobin C disease and in sickle cell-beta thalassaemia: a cohort study from birth. *Br. J. Haematol.*, v. 60, n. 2, p.279-292, 1985.
26. Tuttle, A. H., Koch, B. Clinical and hematological manifestations of hemoglobin CS disease in children. *J. Ped.*, v. 56, n. 3, p.331-342, 1960.
27. West, M. S., Wethers, D., Smith, J., Steinberg, M. Laboratory profile of sickle cell disease: a cross-sectional analysis. *J. Clin. Epidemiol.*, v. 45, n. 8, p.893-909, 1992.
28. Wethers, D. L. Sickle cell disease in childhood: Part I. Laboratory diagnosis, pathophysiology and health maintenance. *Am. Fam. Physician*, v. 62, n. 5, p.1013-1020, 2000.

Endereço para correspondência:  
Prof<sup>ª</sup> Sandra Rezende de Andrade  
Rua Açú, 724 - Tirol - Natal, RN - 59020-110  
Tel. (0xx84)211-7880 - Cel. (0xx84)974-0542  
E-mail: sandy.rezende@ig.com.br

## TEMAS LIVRES Prêmio DOLES

**Categoria: "Melhor trabalho em Bioquímica"**  
Valor equivalente a 20 salários mínimos

Será concedido um prêmio aos trabalhos apresentados e selecionados na sessão de Temas Livres dos congressos promovidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

A premiação será feita na sessão de abertura, com a entrega do diploma.

O trabalho vencedor desse prêmio poderá fazer parte da programação oficial do Congresso.

Para concorrer ao prêmio, os interessados devem solicitar as informações necessárias à

**Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**

Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro, RJ • 20270-902

Tel (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2234-4881

e-mail: [informacao.cong@sbac.org.br](mailto:informacao.cong@sbac.org.br)

# Diagnóstico fortuito de traço falcêmico em amostra de líquido

## Sickle Cell anemia found accidentally in cerebral spinal fluid sample

Cláudio Fonseca Saucedo<sup>1</sup>

**RESUMO** – A Anemia Falciforme é uma doença na qual ocorre uma mutação na sexta posição da cadeia  $\beta$  da hemoglobina, onde uma Valina é substituída por um Ácido Glutâmico, dando origem a uma molécula variante, a hemoglobina S. No estado heterozigoto, traço falcêmico, raramente os pacientes possuem expressão fenotípica de significado clínico. No estado homozigoto, os pacientes afetados possuem a Anemia Falciforme e as manifestações clínicas são de gravidade variável. No Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, foi realizado o diagnóstico, fortuito, de traço falcêmico de uma paciente, através de amostras de líquido encaminhadas para exame citológico quantitativo e qualitativo. Este diagnóstico é importante porque permite o aconselhamento genético da paciente, pois no Brasil a Anemia Falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum. Diante disto, fica evidente que as avaliações microscópicas no setor de hematologia devem ser sempre muito criteriosas, realizadas por profissionais qualificados, pois podem auxiliar o médico com informações adicionais, úteis ao diagnóstico.

**PALAVRAS-CHAVE** – Anemia Falciforme, hemoglobina S e aconselhamento genético.

**SUMMARY** – Sickle Cell anemia refers to a disease due to a mutation in the hemoglobin  $\beta$  - chain, at the sixth position. Valine aminoacid is changed for the Glutamic Acid, giving origin to a anomalous molecule, the S hemoglobin. Patients with the Sickle Cell Trait, heterozygous, usually don't have clinical manifestations of this disease. On the other hand, all homozygous patients show clinical symptoms of Sickle Cell anemia. During a routine cytologic examination of a cerebral spinal fluid sample, we identified the Sickle Cell Trait. We considered this finding very useful to this occasional patient, since genetic counseling would be advisable after that. In Brazil, Sickle Cell anemia is the most common monogenic hereditary disease. Pharmacist Biochemical should pay special attention to any routine exam, since new clues to a new diagnosis could be given to the health provider.

**KEYWORDS** – Sickle Cell anemia, S hemoglobin and genetic counseling.

### INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme é uma doença na qual ocorre uma mutação que substitui a Timina pela Adenina no sexto códon do gen  $\beta$  (GAG  $\rightarrow$  GTG), codificando, portanto, a Valina no lugar do Ácido Glutâmico na sexta posição da cadeia  $\beta$  da hemoglobina, dando origem a uma forma variante, a hemoglobina S (HbS). Esta alteração é responsável por profundas alterações na estabilidade e solubilidade das moléculas<sup>6</sup>. A troca de aminoácidos abala estruturalmente a molécula, pois se na hemoglobina A (HbA) o Ácido Glutâmico da posição 6 da globina  $\beta$  auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas de hemoglobina, a entrada da Valina nesta posição favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio, formando cristais conhecidos como tactóides<sup>9</sup>.

No estado heterozigoto, as hemácias contêm tanto a hemoglobina adulta normal (HbA), como a hemoglobina variante. Como raramente elas tem expressão fenotípica de significado clínico, diz-se que os hetero-

zigotos tem o traço para aquela anormalidade, traço da célula falciforme<sup>6</sup>. Em circunstâncias normais, não estão presentes sinais clínicos da doença ou anormalidades hematológicas. Contudo, a acidose ou hipoxia devido a vôos de avião, infecção respiratória, anestesia ou deficiência cardíaca congestiva podem causar falcização e complicações vasculares com enfartos viscerais, incluindo hematúria<sup>5</sup>.

No estado homozigoto, a HbA está totalmente ausente e as manifestações clínicas são de gravidade variável. Indivíduos assim afetados têm a Anemia Falciforme e a falcização das hemácias ocorre em tensão fisiológica de oxigênio<sup>6</sup>. Nesta etapa há a mudança do estado líquido e solúvel, para o estado sólido e insolúvel da hemoglobina, formando os cristais tactóides. A rigidez e distorção da célula falciforme é o principal motivo da sua destruição prematura e da anemia, porém mais grave que isso é o aumento da viscosidade do sangue desoxigenado, impedindo seu fluxo através dos capilares. Esse fato induz mais desoxigenação aumentando o número de células falcizadas que blo-

Recebido em 7/8/2001

Aprovado em 7/8/2001

<sup>1</sup>Farmacêutico-bioquímico, especialista em hematologia

queiam completamente os vasos, provocando as dores cruciais das crises falcizantes e as lesões teciduais típicas dessa patologia<sup>9</sup>.

A hemoglobina S (HbS) é certamente a mais comum de todas as hemoglobinas anormais. Ela é encontrada particularmente na África Equatorial, em uma ampla zona que se estende de costa à costa. A maior incidência ocorre na parte oriental do continente, onde 40 a 50% dos membros de certas tribos estão afetados. Uma taxa de prevalência de 10 a 20% é encontrada em outras partes, mas existe uma considerável variação de uma tribo para outra. O gene da hemoglobina S é encontrado também em populações não africanas. Uma prevalência de até 25% foi registrada na Turquia Meridional, na Arábia Saudita e na Índia Meridional. A hemoglobina S é encontrada também ao longo da costa Mediterrânea Setentrional, especialmente na Sicília, Chipre e Grécia, onde são afetados até 32% dos habitantes de certas aldeias<sup>6</sup>.

A Anemia Falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil devido a miscigenação das raças<sup>3</sup>. Estima-se que cerca de quatro milhões de pessoas são portadoras do traço falciforme, ou hemoglobina S heterozigota, e perto de 30.000 com a forma grave, incluindo anemia falciforme, doença da hemoglobina SC, e a interação entre HbS e Talassemia  $\beta^9$ . Além disso estima-se o nascimento de 700 a 1000 novos casos anuais da doença falciforme no país<sup>3</sup>. Em um laboratório de Porto Alegre -RS, que realiza testes de triagem neonatal, em 22.097 amostras analisadas, foram identificadas em 1% do total a suspeita de doença falciforme (HbFS)<sup>4</sup>.

## OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo fazer o relato do caso de uma paciente, que foi submetida a uma cirurgia de hipofisectomia e, durante o período de convalescença, foi observado a presença de hemácias falciformes nas suas amostras de líquido, as quais eram enviadas para a realização de exame citológico, quantitativo e qualitativo, no setor de hematologia do Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), o que levou a realização de provas adicionais para se chegar ao diagnóstico de traço falcêmico desta paciente e, com isto, mostrar e valorizar a importância de uma análise microscópica criteriosa no setor de hematologia.

## Relato do caso

Uma paciente do sexo feminino, 16 anos, cor branca, residente em Porto Alegre - RS, procurou atendimento médico, em um posto de saúde do município, queixando-se de perda progressiva da acuidade visual, associada a cefaléia leve, há três meses. A mesma recebeu atendimento médico no local. Nesta ocasião, foi realizado o exame clínico da paciente e solicitado uma tomografia computadorizada (TC) de crânio, que mostrou a presença de um processo expansivo bem determinado no cérebro. Diante deste resultado a paciente

foi encaminhada ao serviço de Neurologia do Hospital São José do Complexo Hospitalar da ISCMPA, onde foi avaliada por um neurologista que solicitou os seguintes exames complementares: RX de crânio, que evidenciou uma erosão da sela túrcica; TC de crânio, um volumoso tumor com crescimento sub-frontal importante; e Anatomopatológico de material colhido do tumor, um adenoma de hipófise com necrose. O tratamento proposto foi a remoção cirúrgica do tumor por via trans-fenoidal. A cirurgia proposta teve sua realização retardada para o tratamento de uma meningite ocorrida no período pré-operatório. No pós-operatório a paciente apresentou boa evolução clínica e recebeu alta após 12 dias, quando passou a ser avaliada periodicamente, a nível ambulatorial, para revisão do tratamento realizado.

Aproximadamente três anos após submeter-se à primeira cirurgia, uma TC de crânio, realizada para controle, evidenciou uma recidiva tumoral. Em decorrência disto, a paciente foi submetida a uma segunda cirurgia para removê-lo. Sete dias após este procedimento, uma nova TC de crânio mostrou um sangramento intraventricular importante, tornando-se necessário a realização de uma cirurgia de ventriculostomia. Após esta intervenção, a paciente continuou internada recebendo cuidados médicos e de enfermagem até a alta.

No período da primeira internação, sempre que necessário, foram solicitados exames laboratoriais (bacteriológico, citológico e bioquímico) das amostras de líquido, que foram realizados no Laboratório Central da ISCMPA. No caso da primeira cirurgia, o pós-operatório transcorreu sem nenhuma complicação. Os exames citológicos apresentaram contagens baixas de eritrócitos, não excedendo 26 células/mm<sup>3</sup>, nas quatro análises citológicas quantitativas realizadas. Na Segunda, devido a complicação apresentada, as análises citológicas de líquido foram realizadas com maior frequência, além das amostras apresentarem aspecto hemorrágico, com contagens de eritrócitos que variaram de 16.000 à 40.000 células/mm<sup>3</sup>. Isto permitiu que durante as análises microscópicas realizadas, se pudesse observar a presença de várias hemácias com formato alongado lembrando células falciformes. Como a amostra biológica em estudo era líquido, onde as hemácias muitas vezes encontram-se deformadas, também foi realizada a análise do esfregaço sangüíneo do hemograma da paciente, o qual não apresentava alterações morfológicas na série vermelha. Logo, foi solicitado um teste de falcização de hemácias em sangue total colhido com EDTA, que confirmou a suspeita de se tratar de traço falcêmico. O passo seguinte foi a realização de uma eletroforese de hemoglobina, para estabelecer o diagnóstico de certeza, que revelou a presença de 43% de HbS na amostra de sangue da paciente.

## DISCUSSÃO

Segundo relatos bibliográficos e a opinião de especialistas, a patologia primária da paciente não tem

nenhuma relação com o achado hematológico, pois os pacientes portadores de traço falcêmico são assintomáticos e cursam sem nenhuma manifestação clínica relacionada a esta alteração molecular. Nem mesmo o hemograma destes pacientes apresentam alterações morfológicas nas hemácias, pois a presença de uma concentração de aproximadamente 40% de HbS não é o suficiente para permitir a polimerização das moléculas de hemoglobina em situação fisiológica. Na maioria das vezes o diagnóstico é fortuito, como neste relato, em que só foi possível se chegar ao diagnóstico devido a uma intercorrência cirúrgica que permitiu o extravasamento de sangue para um ambiente de anoxia, que é o meio adequado para a falcização das hemácias. Apesar disto, este achado é de grande importância na vida da paciente e de seus familiares, para o aconselhamento genético, pois lhes permite conhecer parte de sua bagagem genética, os riscos de ser portador do traço falcêmico e as manifestações da doença falciforme.

Conforme foi descrito na introdução deste trabalho, a anemia falciforme é a mais comum das doenças hematológicas hereditárias. Esta doença representa um problema de saúde pública no Brasil, tanto que o Ministério da Saúde criou, a pedido do Grupo de Valorização da População Negra, de acordo com a portaria 951 de 10/05/96, o Programa Nacional de Anemia Falciforme para prestar assistência aos doentes e portadores dos genes da doença falciforme, através de ações de prevenção, que devem proporcionar a promoção do conhecimento da doença, acesso facilitado aos serviços de diagnóstico e tratamento, bem como as ações educativas dirigidas a população (3,7,10). Além disso, o Artigo 5º da lei nº 10237 de 12/03/99 do Governo do Estado de São Paulo, torna obrigatório a realização de teste de eletroforese de hemoglobina para gestantes e

recém-nascidos, em todas as unidades de saúde do estado<sup>2</sup>.

Além do que foi discutido neste trabalho, o mais importante é salientar que a análise microscópica no setor de hematologia, mesmo quando se tratar da análise de outros líquidos biológicos, deve ser sempre criteriosa, pois, com isto, pode-se acrescentar ao diagnóstico informações úteis sobre a saúde dos pacientes, direcionar ou redirecionar o médico na sua investigação e até mesmo oferecer informações decisivas no diagnóstico de um grande número de patologias.

## REFERÊNCIAS

1. Adam, R. D. *et al.* *Principles of Neurology*. 6th ed. International Edition. New York, 1997.
2. *Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo*, Lei nº 10.237, Artigo 5º. São Paulo, 1999.
3. Cardoso, F. E. M. *et al.* *Orientação de pais de crianças com Anemia Falciforme, prevenção e controle*. MedPress – Revista Médica Virtual. Dezembro, 1999.
4. *Centro de Triagem Neonatal*, Informativo – Ano 1 – Nº 1. Porto Alegre - RS, Dez/2000 - Jan/2001.
5. Henry, J. B. *Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 18ª ed. Editora Manole. São Paulo, 1995.
6. Lee, G. R. *et al.* *Wintrobe Hematologia Clínica*. 9ª ed. Editora Manole. São Paulo, 1998.
7. *Ministério da Saúde*, Programa de Anemia Falciforme. Grupo de trabalho para elaboração do Programa Nacional de Anemia Falciforme (Portaria MS nº 951 de 10/05/1996), Brasília, 1996.
8. Naoum, P. C. *Diagnóstico das hemoglobinopatias*. 1ª ed. Editora Sarvier. São Paulo, 1987.
9. Naoum, P. C. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. 1ª ed. Editora Sarvier. São Paulo, 1997.
10. *Presidência da República*, Programa Nacional de Direitos Humanos. Brasília, 1996.

Endereço para correspondência:  
Dr. Cláudio Fonseca Saucedo  
Rua Barão de Teffé, 273/504 - Menino Deus  
90.160-150 - Porto Alegre - RS

## Título de Especialista em Análises Clínicas pela SBAC

*Saiba o que é preciso para ter o seu*

**As provas para a concessão do Título de Especialista em Análises Clínicas, outorgado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, são aplicadas durante a realização dos congressos ou quando programadas pelas regionais e delegacias da SBAC.**

**Conheça as normas do regulamento para a concessão desse título, através do telefone (0xx21)2264-4449, pelo fax (0xx21)2204-0245 ou pelo e-mail: [teac@sbac.org.br](mailto:teac@sbac.org.br)**

# Detecção do vírus da hepatite C: avaliação de três testes de enzimaímunoensaio anti-HCV comparados com Ensaio de Imunoblot Recombinante de Segunda Geração (RIBA-2)\*

Detection of hepatitis C virus: evaluation of three anti-HCV enzymeimmunoassays compared with Second Generation Recombinant Immunoblot Assay (RIBA-2)

Elvira M. Doi<sup>1</sup> & Geraldo Picheth<sup>2</sup>

**RESUMO** – A hepatite C é causada por um RNA vírus e os principais mecanismos de contágio são a via parenteral através de sangue e hemoderivados e também a droga adicção é um fator importante na contaminação. Várias metodologias estão disponíveis para detecção da hepatite causada pelo vírus C (HCV) no laboratório, ressaltando as determinações por enzimaímunoensaio, imunoblot e reação em cadeia da polimerase (PCR). Neste trabalho uma amostra de 74 pacientes coletados no Hospital de Clínicas de Curitiba da UFPR, soropositivos para HCV por métodos de enzimaímunoensaio (EIA) com os reagentes comerciais, EIA Salck (Salck), Detect-HCV-2,5 (Biochem) e ETI-AB-HCVK3 (Sorin) foram comparados com o teste de imunoblot Chiron RIBA-2 (Chiron). Não foi observada diferença no perfil reacional entre os testes de EIA com o teste de RIBA-2 ( $c^2 = 4,838$  e  $p = 0,30$ ). A análise do padrão de reatividade dos antígenos presentes no teste de imunoblot Chiron RIBA-2 (Chiron) evidenciou maior antigenicidade para as proteínas presentes no core (c22-3) e baixa reatividade para as proteínas da região NS4 (5-1-1 e c100-3).

**PALAVRAS-CHAVE** – Detecção do anti-HCV; Imunoblot; enzimaímunoensaio.

**SUMMARY** – Hepatitis C virus is a typical RNA virus, with high prevalence of HCV antibodies among individuals with a history of blood transfusion, its products and intravenous drug abuse, suggesting the predominant route of HCV infection. Several methodologies are available for HCV antibody detection such as, enzyme-linked-immunosorbent-assay and immunoblot assay. The HCV detection has been performed by polymerase chain reaction (PCR). In the present study, samples on 74 patients from Hospital de Clínicas de Curitiba - UFPR, that were positive for anti-HCV antibody by Salck (Salck), Detect-HCV-2,5 (Biochem) and ETI-AB-HCVK3 (Sorin) enzyme immunoassays were further tested by the immunoblot assay from Chiron RIBA-2 (Chiron). There was no significant difference between these three EIA and RIBA-2 anti-HCV reaction patterns ( $c^2 = 4,838$ ,  $p = 0,30$ ). Analysis of antibody reaction pattern to four antigens immobilized in the Chiron RIBA-2 strip showed significant antigenicity of the core (c22-3) protein and low reactivity to the proteins related to NS4 region (5-1-1 and c100-3) in this group of patients.

**KEYWORDS** – Anti-HCV detection; Immunoblot; ELISA.

## INTRODUÇÃO

O vírus C é o principal agente biológico das hepatites pós-transfusionais não-A, não-B<sup>13</sup>, com prevalência alta em doadores de sangue, sendo estimado no Brasil em torno de 2,7%<sup>31</sup>.

Os últimos avanços na Biologia Molecular contribuíram para a identificação, em 1989, do vírus da hepatite C, possibilitando o desenvolvimento de testes sorológicos<sup>10,18</sup>.

O HCV é um vírus RNA positivo de fita simples com alta taxa de mutação<sup>11,21,22,27</sup>. O genoma viral consiste de região 5' não codificadora, core (C), envelope (E ou E1), região codificadora da proteína não-estrutural (NS), e região não codificadora 3'. A região NS consiste de 5 partes, NS1, NS2, NS3, NS4 e NS5<sup>24</sup>. A

região NS1 é também denominada de E2 porque codifica parte do envelope. As demais regiões codificam as enzimas serina-protease, helicase (NS3) e RNA replicase (NS5). Estas proteínas podem ser produzidas pela clivagem das poliproteínas pelas proteases celular e viral<sup>28</sup>.

O antígeno c100-3 derivado da região não-estrutural (NS4) do genoma tornou-se a base para a detecção dos anticorpos anti-HCV, inicialmente por radioímunoensaio (RIA) e depois por enzimaímunoensaio (EIA)<sup>10</sup>. Este teste EIA de primeira geração (EIA-1) foi aprovado para uso pelo órgão Americano que controla drogas e alimentos (FDA) em maio de 1990. Em virtude da baixa sensibilidade do teste EIA-1 foram desenvolvidos EIA de segunda geração (EIA-2) para anti-HCV, sendo incorporados três proteínas recombinan-

Recebido em 24/9/2001  
Aprovado em 5/11/2001

<sup>1</sup>Farmacêutica-Bioquímica do setor de Sorologia do Laboratório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná;

<sup>2</sup>Professor da disciplina de Bioquímica Clínica do curso de Farmácia, Depto. de Patologia Médica - Universidade Federal do Paraná

tes, duas das quais são das regiões não-estruturais NS3 e NS4 do genoma (c33c e c100-3) e uma da região core (c22-3)<sup>1,2,15,16,30</sup>. Recentemente foram desenvolvidos testes de EIA-3 onde antígenos recombinantes da região core, NS3, NS4 e NS5 do genoma viral foram incorporados<sup>4,12,29</sup>. Embora nenhum teste definitivo tenha sido desenvolvido até o momento, testes suplementares que aumentam a especificidade para a detecção do HCV estão disponíveis comercialmente. O teste imunoblot recombinante de segunda geração (RIBA-2) contém 4 antígenos recombinantes codificados do HCV, três dos quais são derivados da região não-estrutural (5-1-1 e c100-3 da região NS4, c33c da região NS3), enquanto o quarto antígeno corresponde ao nucleocapsídeo - core - (c22-3) da proteína viral<sup>15</sup>.

O presente trabalho tem como objetivos comparar amostras soropositivas para o vírus da hepatite C obtidas por EIA com o teste imunoblot (RIBA-2) considerado mais específico e analisar o padrão de reatividade dos antígenos presentes no teste de imunoblot (RIBA-2) na procura de proteínas de maior capacidade antigênica, como base para seleção de testes EIA na detecção do HCV.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Caracterização dos pacientes

Foram selecionadas para este estudo, 74 amostras aleatórias de pacientes que apresentaram sorologia positiva por um ou mais testes de enzima imunoensaio de segunda ou terceira geração, entre os exames requisitados na Sorologia do Hospital de Clínicas, da Universidade Federal do Paraná, no período entre julho de 1994 a março de 1995 e estocadas a -20°C. Os seguintes dados foram coletados: idade, sexo, níveis séricos de ALT e AST, anti-HBc Total, padrões de reatividade em RIBA-2 e diagnóstico clínico.

### Metodologia utilizada

Soros de pacientes requisitados para determinação de anti-HCV foram testados, inicialmente, com Salck (HCV-Ac-EIE, Salck Indústria e Comércio de Produtos Biológicos Ltda, São Paulo), Biochem (Detect-HCV, Biochem ImmunoSystems Inc. Montreal, Canadá) ou Sorin (ETI-AB-HCVK, Sorin Biomédica Diagnostic Division, Saluggia, Itália) de acordo com a disponibilidade do kit no período da dosagem. Todos os soros positivos com os testes de EIA, foram comparados com RIBA-2 (Chiron RIBA-2.0, Chiron Corporation, Emeryville, California, USA). Todos os ensaios foram realizados segundo o protocolo dos respectivos fabricantes. As principais características dos testes utilizados na detecção de anticorpos anti-HCV encontram-se na Tabela I.

**TABELA I**  
Principais características dos testes para a detecção de anticorpos anti-HCV utilizados no presente trabalho

Nome comercial	Abreviações	Antígenos detectados	Comentários
HCV-Ac-EIE	Salck	Core/NS3/NS4	Peptídeos sintéticos
ETI-AB-HCVK	Sorin	c-22-3, c33c, NS4/NS5	Proteínas recombinantes e Peptídeos sintéticos
Detect-HCV	Biochem	Core/NS3/NS4/NS5	Peptídeos sintéticos
Chiron RIBA-2.0	RIBA-2	c22-3, c33c, C100-3, 5-1-1	Antígeno recombinante

## Determinação das aminotransferases (AST e ALT) e anti-HBc-total

As aminotransferases AST (aspartato aminotransferase, GOT) e ALT (alanina aminotransferase, GPT) foram ensaiadas pela metodologia U.V. otimizada utilizando reagentes Biodiagnóstica em analisador automatizado Cobas Mira (Roche) a 37°C. Os valores de referência considerados foram: AST: homens: 14-41 U/L e mulheres: 14-31 U/L; ALT: homens: 10-46 U/L e mulheres: 8-39 U/L. Para a determinação do anti-HBc-total foi utilizado o reagente Heganostika (UNI-FORM, Organon Teknika, Boxtel, NL).

### Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com os programas Microstat e Statistica (versão 4.1) para microcomputador.

## RESULTADOS

### Amostra

Das 74 amostras de pacientes avaliadas (45 do sexo masculino e 29 do sexo feminino), idade média de 37 anos (variação entre 4 a 72 anos), 29 (39,2%) receberam transfusão de sangue ou de seus produtos, 13 (17,6%) eram esporádicos, 14 (18,9%) pertenciam ao grupo potencial de risco (droga adicção, alcoolismo e múltiplos parceiros), 10 (13,5%) apresentavam hepatopatia crônica (sendo 2 pós-transfusionais) e 8 (10,8%) sofreram alguma intervenção cirúrgica sem história de hemotransfusão e seus derivados. Estas amostras apresentaram sorologia anti-HCV positiva em pelo menos um dos testes EIA empregados neste estudo, já que a realização concomitante dos três testes não foi possível pela indisponibilidade simultânea dos kits no período da execução. A caracterização da amostra utilizada neste trabalho consta na Tabela II.

**TABELA II**  
Caracterização da amostra

	N	Sexo M/F	História				
			Hemotransfusão	Cirurgia	Grupo de risco	Hepatopatia crônica	Esporádico
Pacientes	74	45/29	29 (39,2%)	8 (10,8%)	14 (18,9%)	10 (13,5%)	13 (17,6%)
Salck	53	32/21	26 (49,1%)	6 (11,3%)	9 (17,0%)	4 (7,5%)	8 (15,1%)
Biochem	38	27/11	19 (50,0%)	2 (5,3%)	7 (18,4%)	4 (10,5%)	6 (15,8%)
Sorin	38	24/14	14 (36,8%)	6 (15,8%)	6 (15,8%)	5 (13,2%)	7 (18,4%)

M: sexo masculino; F: sexo feminino

### Sorologia positiva com EIA versus RIBA-2

As comparações entre as amostras positivas para HCV pelos métodos de EIA comercializados pela Salck, Biochem e Sorin e os resultados obtidos pela técnica de Imunoblot (RIBA-2) encontram-se na Tabela III.

O teste do qui-quadrado apresentou como resultado  $\chi^2 = 4,838$  ( $p = 0,3044$ )

## DISCUSSÃO

Pesquisas epidemiológicas e clínicas conduzidas nos últimos anos, após a descoberta do vírus da hepatite C (HCV) por técnicas de biologia molecular, estabelecem que a hepatite crônica por vírus C é uma entidade heterogênea com respeito à fonte de infecção e espectro da doença do fígado<sup>9</sup>.

Na amostra estudada, soropositiva para HCV, ocorreu prevalência em adultos com idade média de 37 anos, variando de 4 a 72 anos, com uma distribuição Gaussiana. O sexo masculino com 61% preponderou na amostra, com uma associação muito grande com história de transfusão sanguínea ou de seus produtos e de droga adicção, enquanto que outros procedimentos médicos tinham menor influência. Casos esporádicos sem via parenteral de transmissão evidente também foram encontrados (Tabela II).

Esta distribuição amostral e as características da história clínica são justificáveis pelo perfil de atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná que como hospital escola atende a comunidade com muitas especialidades médicas em todas as faixas etárias. Nosso perfil amostral também foi semelhante ao descrito por Chemello *et al.*<sup>9</sup> que investigaram os padrões de reatividade de anti-HCV em pacientes crônicos definidos pelo EIA de primeira e segunda gerações. Estes autores encontraram predomínio do sexo masculino de 63,5% nos grupos anti-HCV positivos com idade média de 46 anos, e a história de transfusão foi observada em cerca de 33% dos pacientes seguida de droga adicção em 11,5% dos casos. Romeo *et al.*<sup>23</sup> estudaram HCV-RNA nos soros de doadores de sangue com os níveis de aminotransferases normais e elevados e as características clínicas apresentadas foram: predomínio do sexo masculino de 61,6% e os fatores de risco predominantes foram transfusão e droga adicção, portanto, análogos também a nossos achados.

A detecção do HCV era realizada até o fim da década de 80 por "marcadores indiretos" como a presença de anticorpos anti-HBc e a dosagem da alanina aminotransferase, ALT<sup>3</sup>. A partir dos anos 90 foram desenvolvidos vários reagentes comerciais para a detecção do HCV e seus anticorpos, baseados principalmente nas técnicas de enzimaímunoensaio (EIA) e mais recentemente no imunoblot recombinante (RIBA) e na reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo o último mais sensível e acurado.

O setor de Sorologia do Laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR, vem utilizando em sua rotina, a detecção do HCV pelos testes de EIA, cuja opção está vinculada principalmente ao nível de custos. Com a aquisição pelo serviço de reagentes pelo princípio de RIBA-2, decidimos avaliar o comportamento de amostras soropositivas com os testes de EIA em uso na rotina e o imunoblot considerado mais sensível e específico.

Quando as amostras soropositivas para HCV pelos testes de EIA comercializados pela Salck, Biochem e Sorin, foram comparadas com os resultados de imunoblot (Chiron, RIBA-2), não foi observada diferença significativa a nível de 5% ( $\chi^2 = 4,838$  e  $p = 0,30$ ) entre os três testes (Tabela III). Este achado sugere que,

TABELA III

Teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para amostras soropositivas para HCV obtidas por enzimaímunoensaio comparadas com os resultado de RIBA-2

Testes/RIBA-2	Positivo	Negativo	Indeterminado	Total
Salck	36	07	10	53
Biochem	18	08	12	38
Sorin	19	07	12	38
Total	73	22	34	—

### Aminotransferases e HCV positivo com EIA

A análise dos resultados das aminotransferases (AST e ALT) e anti-HBc total nos testes soropositivos para HCV obtidos com os testes de EIA em análise encontram-se na Tabela IV.

Os resultados dos testes de qui-quadrado para as determinações de AST, ALT e anti-HBc-total, foram respectivamente,  $\chi^2 = 2.040$  ( $p = 0,3606$ );  $\chi^2 = 2.036$  ( $p = 0,3614$ ) e  $\chi^2 = 0.059$  ( $p = 0,9709$ ).

TABELA IV

Distribuição da atividade das aminotransferases e anti-HBc-total em amostras soropositivas para HCV com os testes de EIA

Testes	AST			ALT			Anti-HBc Total		
	N	normal	elevado	N	normal	elevado	N	positivo	negativo
Salck	31	21	10	30	20	10	44	14	30
Biochem	24	17	07	25	18	07	32	11	21
Sorin	25	21	04	29	24	05	31	10	21

### Reatividade de antígenos de RIBA-2

A Tabela V mostra a frequência dos antígenos presentes no teste de RIBA-2 que foram positivos nas amostras soropositivas para HCV detectadas pelos testes de EIA.

A frequência do perfil de reatividade de soros positivos para o vírus da Hepatite C pelo teste de Imunoblot (RIBA-2) nos diferentes testes de enzimaímunoensaio utilizados no presente trabalho encontra-se na Tabela VI.

TABELA V

Frequência de reatividade dos antígenos isolados de RIBA-2 em soropositivos para HCV detectados por EIA

Antígenos RIBA-2	EIA-Salck N = 53	EIA-Biochem N = 38	EIA-Sorin N = 38	Média %
5-1-1	19 (35,8%)	12 (31,6%)	10 (26,3%)	31,2
c100-3	20 (37,7%)	12 (31,6%)	13 (34,2%)	34,5
c33c	37 (69,8%)	16 (42,1%)	17 (44,7%)	52,2
c22-3	42 (79,2%)	26 (68,4%)	27 (71,1%)	72,9

TABELA VI

Frequência do perfil de reatividade de soros anti-HCV positivos em RIBA-2 nos testes de EIA

Padrão de RIBA-2				EIA-Salck N = 36	EIA-Biochem* N = 18	EIA-Sorin N = 19
c22-3	c33c	c100-3	5-1-1			
+	+	+	+	16 (44,4%)	6 (33,3%)	8 (42,1%)
+	+	+	-	2 (5,5%)	0	1 (5,3%)
+	+	-	+	2 (5,5%)	1 (5,6%)	1 (5,3%)
+	-	+	+	0	3 (16,7%)	2 (10,5%)
-	+	+	+	1 (2,8%)	2 (11,1%)	0
+	+	-	-	14 (38,9%)	5 (27,8%)	6 (31,6%)
-	+	+	-	0	0	1 (5,3%)
-	+	-	+	1 (2,8%)	0	0

\*EIA-Biochem: apresentou um soro positivo pelo RIBA-2 que reagiu apenas com c100-3 e c22-3

apesar das diferentes proteínas – antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos – utilizadas como marcadores pelos testes EIA estudados, não foi possível diferenciá-los quando a referência é o teste de imunoblot RIBA-2.

Nossos dados são semelhantes aos descritos por Lin *et al.*<sup>19</sup>, que estudaram soros de mulheres grávidas por testes EIA de segunda geração baseados em proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos e os resultados foram idênticos. Entretanto, um método EIA novo baseado em 3 peptídeos sintéticos contendo região do core e NS4 utilizado por Berasain *et al.*<sup>5</sup>, mostrou resultados discordantes aos nossos.

Quando as atividades de AST e ALT foram classificadas em “normal” e “elevada” considerando os valores de referência para a metodologia empregada (Tabela IV), não foi encontrada uma diferença significativa (AST:  $c^2 = 2,04$ ;  $p = 0,36$  e ALT:  $c^2 = 2,03$  e  $p = 0,36$ ) do comportamento destas enzimas nos soros positivos para HCV dentro dos grupos classificados pelos reagentes Salck, Biochem e Sorin.

A detecção do anti-HBc como “marcador indireto” para HCV mostrou baixa sensibilidade uma vez que apenas cerca de 32% (31 a 34%) dos indivíduos detectados positivos para HCV pelos testes EIA também o foram para o anti-HBc total (Tabela IV).

Serfaty *et al.*<sup>25</sup> compararam as características biológicas e epidemiológicas de doadores de sangue positivos para HCV com EIA e RIBA-2, e nestes pacientes 32% foram anti-HBc reativos o que é comparável com o nosso resultado de 32,8%. A incidência relativamente elevada de contato com o vírus da hepatite B, pode ser somada como um dos fatores de risco na transmissão da infecção por HCV.

Analisando-se a dinâmica de anticorpos para as diferentes regiões do genoma representadas por 4 antígenos de RIBA-2, como mostrado na Tabela V, resultaram em reatividade média de 31,2% para 5-1-1, 34,5% para c100-3, 52,2% para c33c e 72,9% para c22-3. O padrão de reconhecimento para anti-HCV mais frequentemente encontrado (Tabela VI), foi **c22-3 + c33c + c-100 e 5-1-1** para os grupos positivos com EIA-Salck, Biochem e Sorin de 44,4%, 33,3% e 42,1%, respectivamente, e **c22-3 + c33c** de 38,9%, 27,8% e 31,6%, respectivamente. Bresters *et al.*<sup>7</sup> encontraram padrões de reatividade em doadores e pacientes HCV-RNA positivos para **c22 + c33c + c100 e/ou 5-1-1** de 57,7%, semelhantes aos nossos achados para os testes EIA em estudo, quando analisamos os dados de forma similar a estes autores ou seja, somando as frequências obtidas nas linhas 1, 2 e 3 da Tabela VI, obtendo os valores de 55,4%, 38,9% e 52,7%. Os autores citados anteriormente obtiveram para os antígenos **c22 + c33c** a frequência de 29,3% valor próximo ao que obtivemos. A positividade para os quatro antígenos de RIBA-2 em conjunto foi cerca de 39% (33 a 44%) dos casos positivos em RIBA-2. Não houve caso de reatividade isolada com antígenos da região NS4 (5-1-1 e c100-3), exceto em um paciente portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que apresentou reatividade de 1+ com o antígeno c100-3. Neste caso podemos supor que o baixo título de anti-HCV, resultou na detecção inadequada pelo RIBA-2 devido a imunodepressão.

Nos três grupos de amostras soropositivas para HCV obtidos com EIA Salck, Biochem e Sorin, o antígeno c22-3 foi o responsável pela maior resposta anti-gênica no teste de RIBA-2 (Tabela V). Em contrapartida a menor reatividade fica configurada para o antígeno 5-1-1. Estas características diferenciadas de anticorpos anti-HCV podem ser atribuídas à imunogenicidade das proteínas do core, que foram maiores em relação à região NS4. YUKI *et al.*<sup>34</sup>, encontraram que os anticorpos para as proteínas core (c22-3) e NS3 (c33c) foram induzidas com muita eficiência e todos os pacientes com níveis altos de viremia para HCV-RNA (níveis  $3 \times 10^6$  cópias/mL) apresentavam altos títulos de anticorpos para estas duas regiões. Uma proporção considerável destes pacientes, foram negativos para HCV NS4 (5-1-1 e c100-3) ou tinham baixos níveis de anticorpos para os antígenos desta região.

Todas as amostras que reagiram com o peptídeo 5-1-1 e/ou c100-3 apresentaram positividade com c33c e/ou c22-3. Por esses resultados podemos concluir que testes para detecção de anti-HCV contendo antígenos para as diferentes regiões do core e NS3 poderiam melhorar o diagnóstico de infecção por HCV em nosso meio. A remoção do antígeno c100-3 e 5-1-1 não acarretaria na perda da sensibilidade dos testes para a detecção de anti-HCV.

Com base nesses resultados, os antígenos correspondentes aos componentes estruturais do vírus são mais sensíveis e específicos para a detecção de anticorpos contra HCV. Além do mais, epítopos da região estrutural estimulam respostas de anticorpos muito fortes em animais de laboratório<sup>17</sup>. Em estudos de pacientes submetidos à terapia com interferon, o teste de imunoblot tem sido utilizado para monitorar a resposta. O anticorpo anti-c22 tem título mais elevado e persiste por mais tempo, enquanto anti-c100-3 é o anticorpo que desaparece mais cedo em respondedores<sup>6,32,33</sup>.

Em apenas um caso encontramos reatividade isolada com c100-3 e, sendo o antígeno 5-1-1 um subcomponente do c100-3, há consideração de que amostras que reagem somente com esses dois antígenos (e não com c22-3 ou c33c) são indicativas da não infecção por HCV<sup>7,8</sup>. Todos os resultados indeterminados com uma única banda reativa em RIBA-2 em nosso estudo, estavam dirigidos contra c22-3 e com menor frequência para c33c (e apenas um caso reagiu com c100-3), achados estes semelhantes aos descritos por Bresters *et al.*<sup>7</sup>, que confirmaram a viremia pelo método de PCR em casos indeterminados com reatividade dirigida para c22 ou c33c. Estes autores não encontraram viremia em pessoas com positividade isolada para anti-c100-3 ou anti-5-1-1. Estudos em crianças hemofílicas que adquiriram infecção por HCV sugerem que a detecção de anticorpos para o core e NS3 são úteis para o diagnóstico sorológico da hepatite pelo vírus C e que ambas estavam mais relacionadas com viremia do que os anticorpos para c100-3 e NS5<sup>14</sup>.

A baixa reatividade com os antígenos 5-1-1 e c100-3 em nosso grupo de pacientes pode ser explicada também, pelo efeito da variabilidade na sequência entre os diferentes tipos de HCV sobre antigenicidade da proteína NS4. Simmonds *et al.*<sup>26</sup> investigaram pelo ma-

peamento do epítipo da região entre os resíduos de aminoácidos 1679 e 1768 da poliproteína do HCV, e encontraram duas regiões antigênicas principais (1671-1708 e 1710-1728) que foram reconhecidas pelo anticorpo formado pela infecção natural de HCV. As regiões antigênicas foram altamente variáveis entre os diferentes tipos de HCV com somente 50 a 60% de similaridade na seqüência de aminoácidos entre os tipos 1, 2 e 3. Todos os imunoenaios atualmente utilizados são baseados no genótipo predominante de HCV encontrado em pacientes dos Estados Unidos (tipo 1a), e a detecção de infecção para outros genótipos estão baseados em reações cruzadas dos anticorpos. A grande variabilidade na seqüência da região antigênica entre os diferentes tipos de HCV tem levado à baixa taxa de detecção de infecção com variantes diferentes das do tipo 1<sup>20</sup>.

Em 1994, McOmish *et al.*<sup>21</sup> mostraram que a maioria dos indivíduos infectados com genótipos 2 a 6 apresentaram uma reatividade fraca ou ausente para c100-3, e reagiram com a proteína recombinante do core c22-3 e c33c, refletindo, provavelmente, o grau elevado de conservação na seqüência de aminoácidos (90%) do que aqueles entre as proteínas não estruturais (75 a 80%).

Nenhum teste laboratorial isolado é inteiramente satisfatório no momento para o diagnóstico da infecção por HCV. Assim, o diagnóstico de HCV para ensaios de rotina do laboratório requer o uso de mais de um teste, seja por enzimmunoensaio ou imunoblot, por conter misturas de materiais antigênicos não idênticos. Em casos incertos, os testes de RIBA-3 e a determinação de HCV-RNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) serão necessários para a elucidação diagnóstica.

Em resumo, nossos dados mostraram que as comparações de amostras soropositivas para HCV obtidas por enzimmunoensaio com testes comercializados pela Salck, Biochem e Sorin não mostraram diferenças no perfil reacional quando comparadas com o teste de imunoblot utilizando o reagente Chiron RIBA-2, no qual a proteína c22-3 presente no core mostrou maior antigenicidade e as proteínas relacionadas à região NS4, baixa reatividade.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Curso de Especialização em Imunologia, da Universidade Federal do Paraná onde este trabalho foi desenvolvido.

## REFERÊNCIAS

- Aach, R. D.; Stevens, C. E.; Hollinger, F. B. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis: an analysis with first and second-generation assays. *N. Engl. J. Med.*, v.325, p.1325-1329, 1991.
- Alter, H. J. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology*, v.15, p.350-353, 1992.
- Alter, H. J.; Purcell, R. H.; Shih, J. W., *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, v.321, p.1494-1500, 1989.
- Barrera, J. M.; Francis, B.; Ercilla, G., *et al.* Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by third generation ELISA. *Vox Sang.*, v.68, p.15-18, 1995.
- Berasain, C.; Garcia-Granero, M.; Riezu-Boj, J. I., *et al.* Detection of anti-hepatitis C virus antibodies by ELISA using synthetic peptides. *J. Hepatol.*, v.18, p.80-84, 1993.
- Bonimo, F.; Brunetto, M. R.; Negro, F., *et al.* Hepatitis C virus infection and disease. Diagnostic problems. *J. Hepatol.*, v.17, Suppl. 3, p.578-582, 1993.
- Bresters, D.; Zaaier, H. L.; Cuyper, H. T., *et al.* Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion*, v.33, p.634-638, 1993.
- Busch, M. P.; Tobler, L.; Quan, S., *et al.* A pattern of 5-1-1 and c100-3 only on hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay does not reflect HCV infection in blood donors. *Transfusion*, v.33, p.84-88, 1993.
- Chemello, L.; Cavalletto, D.; Pontisso, P., *et al.* Patterns of antibodies to hepatitis C virus in patients with chronic non-A, non-B hepatitis and their relationship to viral replication and liver disease. *Hepatology*, v.17, p.179-182, 1993.
- Choo, Q.-I.; Kuo, G.; Weiner, A. J., *et al.* Isolation of cDNA clone derived from a blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, v.244, p.359-361, 1989.
- Choo, Q.-I.; Richman, K. H.; Han, J. H., *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.2451-2455, 1991.
- Couroucé, A. M.; Bouchardeau, F.; Girault, A., *et al.* Significance of NS3 and NS4 antibodies in screening for HCV antibody. *Lancet*, v.343, p.853-854, 1994.
- Houghton, M.; Weiner, A.; Choo, Q. L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implication for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, v.14, p.381-388, 1991.
- Kanesaki, T.; Kinoshita, S.; Tsujino, G., *et al.* Hepatitis C virus infection in children with hemophilia: characterization of antibodies response to four different antigen and relationship of antibody response, viremia, and hepatic dysfunction. *J. Pediatr.*, v.123, p.381-387, 1993.
- Kleinman, S.; Alter, H.; Busch, M. Increased detection of hepatitis immunosays. *Transfusion*, v.32, p.805-813, 1992.
- Koretz, R. L.; Brezina, M.; Polito, A. J. Non-A, non-B post transfusion hepatitis. *Hepatology*, v.17, p.361-365, 1993.
- Kotwal, G. J. Routine laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, v.17, Suppl. 3, p.83-89, 1993.
- Kuo, G.; Choo, Q.-I.; Alter, H. J., *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, v.244, p.362-364, 1989.
- Lin, H. H.; Kao, J. H.; Leu, J. H., *et al.* Comparison of three different immunoassays and PCR for the detection of hepatitis C virus infection in pregnant women in Taiwan. *Vox Sang.*, v.65, p.117-121, 1993.
- McOmish, F.; Chan, S. W.; Dow, B. C., *et al.* Detection of three types of hepatitis C in blood donors: investigation of type specific differences in serological reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion*, v.33, p.7-13, 1993.
- McOmish, F.; Yap, P. L.; Dow, B. C., *et al.* Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J. Microbiol.*, v.32, p.884-892, 1994.
- Okamoto, H.; Kurai, K.; Okada, S., *et al.* Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, v.188, p.331-341, 1992.
- Romeo, R.; Thiers, V.; Driss, F., *et al.* Hepatitis C virus RNA in serum of blood donors with or without elevated transaminase levels. *Transfusion*, v.33, p.629-633, 1993.
- Selby, M.; Choo, Q.-I.; Berger, K. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.1103-1113, 1993.
- Serfaty, L.; Giral, P.; Elghouzzi, M. H., *et al.* Risk factors for hepatitis C virus infection in hepatitis C virus antibody ELISA-positive blood donors according to RIBA-2 status: a case-control survey. *Hepatology*, v.17, p.183-186, 1993.
- Simmonds, P.; Rose, K. A.; Graham, S., *et al.* Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2 and 3. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.1493-1503, 1993.
- Simmonds, P.; Holmes, E. C.; Cha, T. A., *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.2391-2399, 1993.
- Tomei, L.; Failla, C.; Santolini, E., *et al.* NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J. Virol.*, v.67, p.4017-4026, 1993.
- Uyttendaele, S.; Claeys, H.; Mertens, W., *et al.* Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang.*, v.66, p.122-129, 1994.
- Vallari, D. S.; Jett, B. W.; Alter, H. J., *et al.* Serological markers of post-transfusion hepatitis C viral infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p.552-556, 1992.
- Vanderborght, B. O.; Reis, A. M.; Rouzere, C. D., *et al.* Prevalence of the anti-hepatitis C virus in blood donor population of Rio de Janeiro. *Vox Sang.*, v.65, p.122-125, 1993.
- Yatsuhashi, H.; Inokuchi, K.; Inoue, O., *et al.* The clinical significance of reactivity to individual epitopes of hepatitis C viral genome. *Gastroenterol. Jpn.*, v.28, suppl. 5, p.6-11, 1993.
- Yuki, N.; Hayashi, N.; Hagiwara, H., *et al.* Changes in antibodies to specific hepatitis C virus antigens with interferon-alpha therapy: analysis by recombinant immunoblot assay. *Am. J. Gastroenterol.*, v.88, p.914-918, 1993.
- Yuki, N.; Hayashi, N.; Kasahara, A., *et al.* Hepatitis C virus replication and antibody responses toward specific hepatitis C virus proteins. *Hepatology*, v.19, p.1360-1365, 1994.

Endereço para correspondência:

Prof. Geraldo Picheth

Disciplina de Bioquímica Clínica - Depto. de Patologia Médica - UFPR  
Rua Pref. Lothário Meissner, 3400 - Jd. Botânico - 80210-170 - Curitiba, PR  
E-mail: gpicheth@subsede.ufpr.br

# Eosinofilia devida a parasitas

## Eosinophilia due to parasites

Mário Luiz de la Rue<sup>1</sup>

**RESUMO** – Eosinófilos estão envolvidos em uma série de infecções parasitárias mas, nem sempre o número destes está aumentado no sangue circulante. Considera-se nesta breve revisão alguns dos aspectos envolvidos na produção e função destas células em parasitoses causadas por nematódeos, cestódeos, trematódeos e protozoários mais comuns no Brasil. Normalmente ocorre eosinofilia em associação à infecção helmíntica, na qual há envolvimento de mucosa. Nos casos de protozooses, a eosinofilia é, praticamente, ausente.

**PALAVRAS-CHAVE** – Eosinófilos; eosinofilia; parasitoses.

**SUMMARY** – *Eosinophils are involved in many parasitic infections but, not always their number is increased in peripheral blood. In this short review, some production and function aspects of these cells in parasitosis produced by the most common nematodes, cestodes, trematodes and protozoa in Brazil, are considered. Generally, eosinophilia occurs in association with an helminthic infection and with involvement of the mucous membrane. Eosinophilia during protozoosis is in the majority of cases absent.*

**KEYWORDS** – *Eosinophils; eosinophilia, parasitosis.*

### INTRODUÇÃO

**E**osinofilia em parasitoses é um tema que tem suscitado muitos questionamentos e análises de caráter errôneo. Isto leva a problemas razoáveis por ocasião da interpretação de um exame laboratorial, quando não há a demonstração de um parasita ou de suas formas de diagnóstico. Sem querer esgotar o tema, como nas excelentes revisões de Balic *et al.* (2000) e McEwen (1992), pretende-se apresentar alguns aspectos que merecem considerações no trabalho do laboratório clínico.

Eosinófilos são células fagocitárias que se originam na medula óssea. Desde que foram descritos pela primeira vez em 1846 por Jones (McEwen, 1992), se tem associado sua presença a infecções parasitárias. Foi observado que, em presença de antígenos parasitários, estas células possuem um tempo de geração medular menor e emergem de lá em 18 horas em vez de ficarem armazenadas alguns dias. Depois disto, ficam em circulação de 6 a 12 horas antes de migrarem para a pele, pulmões e, principalmente, ao trato gastrointestinal. Normalmente não retornam para a circulação e por isto existem, para cada célula encontrada no sangue, cerca de 500 células nos tecidos. Alguns autores consideram eosinofilia somente valores destas células superiores a 1000/mm<sup>3</sup> (Balic *et al.*, 2000; Spry, 1992; Montenegro & Fecchio, 1999)

Os valores normais variam de acordo com a espécie animal sendo de cerca de 2% dos leucócitos nos cães até cerca de 10% dos bovinos. É conveniente considerar "eosinofilia", para números absolutos superiores a 500/mm<sup>3</sup> de modo a evitar erros. Isto se deve ao fato de poder haver leucopenia ou leucocitose, o que levaria a variações nos números proporcionais que poderiam induzir interpretações errôneas. Não se pode desconsiderar o fato de que há uma variação diurna

destas células na circulação, que é mínima no período da manhã e máxima ao entardecer em humanos, sendo que, em eqüinos ocorre o contrário. (Jain, 1994; McEwen, 1992; Noemi & Atias, 1993; Stevens & Lowe, 1993; Tizard, 1998).

Os eosinófilos pertencem a uma família de células, na qual inclui os neutrófilos, mastócitos e basófilos, cuja função é lutar contra uma invasão através da promoção de inflamação aguda. Os eosinófilos operam nesta função por meio de migração para os locais de invasão parasitária e através da liberação de enzimas que matam ou danificam severamente o parasita. São recrutados para os sítios inflamatórios depois da degranulação de mastócitos induzida por IgE. Fazendo isto, eles provocam um dano tecidual e uma inflamação aguda (Butterword & David, 1981).

Estas células são produzidas na medula óssea pelas células T auxiliaadoras<sup>2</sup> (Ta2) e pelos mastócitos sob influência da IL-3 e IL-5 (principal ativador de eosinófilos). Consequentemente, as respostas das células Ta2 mobilizam os eosinófilos ao mesmo tempo em que estimulam as respostas de IgE, pois as citocinas produzidas por elas potencializam a produção desta imunoglobulina pelas células B em mais de 1000 vezes (Balic *et al.*, 2000; McEwen, 1992; Tizard, 1998; Weller, 1991).

A eosinofilia é comum em doenças de tecidos e órgãos que contenham altas concentrações de mastócitos como pele, pulmões, trato gastrointestinal e útero. Já a eosinopenia é normalmente causada por alguma infecção aguda ou por "stress" mas o significado clínico não está bem esclarecido (Jain, 1994; McEwen, 1992). Vale ressaltar que estudos *in vitro* estão sendo úteis para definir o mecanismo de ação dos eosinófilos, mas tem sido muito mais difícil estabelecer os mecanismos efetores para eosinófilos em infecções helmínticas *in vivo* (Meeusen, 1999).

Recebido em 12/9/2001

Aprovado em 22/11/2001

<sup>1</sup>Professor Titular do Depto. de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS, Brasil

## Constituição

Ligeiramente maiores que os neutrófilos, contém dois tipos principais de grânulos. Os pequenos grânulos primários que contém arilsulfatase, peroxidase eosinofílica e fosfatase ácida e os grânulos cristalóides que contém quatro proteínas principais: Proteína básica maior (PBM), proteína catiônica eosinofílica (PCE), a peroxidase eosinofílica (POE) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (NDE). Os grânulos cristalóides consistem de um núcleo de PBM circundado por uma matriz que contém PCE, POE e NDE (McEwen, 1992; Spry, 1985; Spry, 1992; Stevens & Lowe, 1993; Tizard, 1998).

## Modo de ação

Enquanto que o papel dos eosinófilos em processos patogênicos causados por reações de hipersensibilidade imediata (Tipo I) e tardia (Tipo II) está bem estabelecido, o seu papel efetivo contra infecções helmínticas ainda apresentam aspectos duvidosos (Meeusen, 1999; Meeusen & Balic, 2000). Em relação aos protozoários, praticamente nada se sabe sobre sua função e sua interação com estes parasitas no sentido de levar ao aumento destas células na corrente sanguínea (Meeusen, 2001 - Comunicação pessoal). No caso de malária cerebral, dados sugerem que o *Plasmodium falciparum* poderia induzir eosinofilia (Kurtzhals *et al.*, 1998).

Estas células atuam, em sua função protetora, através da migração para os locais de invasão parasitária e através da liberação de enzimas que matam ou danificam severamente os parasitas. Com isto, provocam dano tecidual e uma inflamação aguda (McEwen, 1992).

Os eosinófilos são células fagocíticas como os neutrófilos, mas não tão eficiente como estes. Sua primeira função é a destruição de material estranho. Entretanto, os grânulos eosinofílicos não contém lisozima, mas sim uma grande quantidade de fosfatase ácida e peroxidase (Jain, 1994; Weller, 1991). Normalmente a fagocitose envolve um processo de endocitose mas, se o objeto é muito grande para ser ingerido, (p.ex: parasitas) o eosinófilo somente libera seu conteúdo granular no ambiente externo. A fagocitose pelos eosinófilos, como as outras células fagocíticas, pode ser dividida em quatro estágios: quimiotaxia, aderência, ingestão e digestão. São atraídos para as áreas de atividade por vários peptídeos diferentes, pela histamina e por alguns metabólitos do ácido araquidônico. Em uma primeira fase eles ligam-se ao parasita por meio de IgG e IgE antiparasitárias ou por meio de C3b depositada na superfície do organismo estranho. Os receptores para a fração Fc de anticorpos bem como os receptores para o complemento são em menor número que os encontrados em neutrófilos, mas devido aos fatores quimiotáticos eosinofílicos, estes aumentam substancialmente (Brown, 1995; Weller, 1991).

Por ocasião de infecções parasitárias, estas células apresentam um maior número de receptores para fração Fc de IgG e IgE (estes não encontrados em neutrófilos) e também para certas frações do complemento (C3b e C4). Isto evidencia, de certa maneira, a influência do parasita na maturação celular. Além disto, a indução experimental de eosinopenia aumenta a susceptibilidade de animais infectados a infecções parasitárias (Jain, 1994; Noemi & Atias, 1993).

Como possuem receptores para a fração Fc, os eosinófilos se conjugam a parasitas recobertos por anticorpos. Uma vez que a partícula (antígeno) esteja ligada ao anticorpo e este aos receptores de Fc de um eosinófilo, desencadeia-se uma explosão respiratória poderosa. Podem fagocitar pequenas partículas, mas são muito mais adequados à destruição extracelular de parasitas grandes pela liberação do conteúdo de seus grânulos no meio circundante, que a partir daí, irá destruí-los. Normalmente degranulam e liberam o conteúdo granular sobre a cutícula do verme. Este conteúdo granular inclui os produtos da explosão respiratória, tais como o superóxido, peróxido de hidrogênio, outros radicais livres gerados pela peroxidase e pelas enzimas líticas eosinofílicas como lisofosfolipase e a fosfolipase D. A tendência destas células em descarregar sua peroxidase extracelularmente sugere que seu papel inicial básico seja a defesa contra parasitas invasores teciduais. Parece que o mecanismo de resposta a anti-helmínticos mediada por eosinófilos IgE-dependente deva ser o mais importante mecanismo de resistência a helmintos (Spry, 1985, Tizard, 1998, Weller, 1991).

A respeito de sua função, existem indícios de tendência à destruição e/ou dano aos parasitas. Na maioria dos casos, morte de parasitas mediada por eosinófilos foi mais efetiva contra as fases larvárias. A microscopia eletrônica tem revelada a presença destas células aderidas à superfície de larvas, descarregando seu conteúdo citoplasmático. Por esta ação, produzem-se fraturas e lesões no tegumento do parasita, impedindo sua sobrevivência. O eosinófilo também é capaz de induzir danos aos complexos antígeno-anticorpo IgG e IgE. Nesta ação existe a necessidade de outras proteínas específicas, radicais superóxidos, além da presença de C3 (Ackermann *et al.*, 1985; Meeusen & Balic, 2000).

O eosinófilo tem capacidade de modular as reações de hipersensibilidade. Ocorre que, uma elevação prolongada destas células e sua degranulação progressiva, podem levar a destruição de tecidos. Isto ocorre devido à Proteína Básica Maior (PBM), radicais superóxidos, hidrolases lisossomais e produtos do ácido araquidônico, entre os quais se destacam os leucotrienos e prostaglandinas (Meeusen, 1999).

## Patologias associadas a eosinófilos

São numerosas as patologias associadas ao eosinófilo, pois estas células estão envolvidas na maioria dos processos inflamatórios e liberam suas proteínas citotóxicas. Além disto, metabólitos do oxigênio, hidrolases lisossomais, bem como fatores ativadores de plaquetas, também tem efeitos citotóxicos. Pode haver dano ao epitélio respiratório, já que está caracterizado o papel do eosinófilo na patofisiologia da asma, febre do feno e urticárias. Neoplasias, desordens digestivas, como gastroenterites eosinofílicas e colites ulcerosa foram descritas, além de outras patologias pulmonares e hematológicas que levam à alterações no número destas células (Jain, 1994).

Eosinófilos são encontrados com mais frequência em granulomas que têm por origem infecções parasitárias ou fúngicas (Coelho, 1999).

É importante salientar que sempre deve ser verificada a procedência do indivíduo pois, em alguns países, a eosinofilia pode ser devida à parasitas e, em ou-

tros, a origem é normalmente alérgica. O papel destas células nos fenômenos alérgicos ainda não está bem esclarecido pois, apesar de existir um papel protetor, muitas vezes há, numa fase mais tardia, dano ao tecido (Noemi & Atias, 1993).

### **Eosinofilia associada a parasitoses**

A relação eosinofilia/protozoários é extremamente pouco analisada na literatura científica, provavelmente devido a sua menor importância. Então, com exceção feita a isosporidiose, alguns casos de toxoplasmose ganglionar e determinadas situações de malária, os protozoários, qualquer que seja sua localização, não produzem eosinofilia. Pode ser provável que os casos encontrados sejam mais devido alterações patológicas que a infecção por si. Isto vale, também, para *Giardia*, *Entamoeba* e *Trypanosoma* (Kurtzhals *et al.*, 1998; Meeusen, 2001-comunicação pessoal; Noemi & Atias, 1993). Entretanto, está bem documentada a presença de eosinófilos nos tecidos em processos patológicos causados por protozoários, mas sua presença aumentada no sangue circulante não tem sido, normalmente, observada (Capron, 1991)

Em relação aos helmintos, é importante considerar que as formas que estão na luz intestinal produzem eosinofilia inexpressiva, ao contrário das formas teciduais, onde esta se manifesta significativamente. Entre os nematódeos intestinais, *Ancylostomatidae* e *Strongyloides* são os que produzem eosinofilia mais elevada. *Ascaris lumbricoides*, quando encontra-se na forma adulta, pode originar ligeira elevação destas células em 1/3 dos pacientes, bem como com *Enterobius vermicularis* onde metade dos pacientes tem discreta eosinofilia. Outros nematódeos, como *Angiostrongylus*, *Capillaria*, *Anisakis* também podem modificar o número destas células (Capron, 1991; Meeusen, 1999; Meeusen & Balic, 2000).

No grupo dos cestódeos intestinais, *Taenia* normalmente não produz eosinofilia, ao passo que *Hymenolepis nana* pode produzir discreto aumento das células. A cisticercose não provoca modificações, entretanto a presença destes leucócitos em LCR, junto a um quadro neurológico, é um sinal muito importante de cisticercose. Infiltrados de eosinófilos são descritos em infecções de alguns parasitas do gênero *Taenia*, mas sem ocorrer aumento expressivo na corrente sanguínea (Meeusen *et al.*, 1990).

Na América Latina, os trematódeos intestinais, segundo alguns autores, não tem importância em relação a eosinofilia (Noemi & Atias, 1993). Entretanto, é sabido que *Fasciola hepática* pode induzir reação inflamatória importante com presença de eosinófilos e também pode-se encontrar cristais de Charcot-Leyden nas fezes (Frenkel *et al.*, 1988).

A migração das formas larvárias de nematódeos desencadeia normalmente eosinofilia elevada e transitória. Esta migração pode afetar o pulmão, constituindo a Síndrome de Loeffler. Também o homem pode ser hospedeiro acidental de larvas de nematódeos de cães e gatos, e nestes casos, a eosinofilia ser marcante (Meeusen & Balic, 2000).

Em relação a outros parasitas pode-se considerar o seguinte:

- O cisto hidático, apesar de desenvolver-se nos tecidos, só desenvolve eosinofilia se ocorrer rompimento ou liberação de antígenos internos, e

mesmo assim, somente em 30% dos casos, assim que apresenta pouco valor de diagnóstico (Wakeelin, 1988).

- Filárias produzem eosinofilia marcante na fase aguda e são apontadas como agentes da "eosinofilia tropical". O número destas células tende a diminuir, consideravelmente, nas fases mais avançadas da infecção. Isto pode ocorrer com os trematódeos sanguíneos (principalmente com *Schistosoma*) e hepáticos (*Fasciola*) (Capron, 1991; Frenkel *et al.*, 1988; Noemi & Atias, 1993).
- Provavelmente, algumas discretas eosinofilias se devam a infecções sub-clínicas provocadas por helmintos tissulares ou formas larvárias de helmintos domésticos (Weller, 1992).

Portanto, eosinofilia deve ser um parâmetro considerado quando ocorrer infecção parasitária, mas este aspecto merece relevância no conjunto dos fatores de diagnóstico de parasitoses e jamais como indicador isolado de alguma patologia.

### **REFERÊNCIAS**

1. Ackerman, S. J.; Gleich, G. J.; Loegering, D. A.; Richardson, B. A. & Butterworth, A. E. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:735-745, 1985.
2. Balic, A.; Boules, V. M. & Meeusen, E. N. T. The immunobiology of gastrointestinal nematodes infection in ruminants. *Adv. Parasit.* 45:181-241, 2000.
3. Brown, E. J. Phagocytosis. *Bioessays*, 17: 109-117, 1995.
4. Butterworth, A. E. & David, J. R. Eosinophil function. *N. England. J. of Med.* 304:154-156, 1981.
5. Capron, M. Eosinophils and parasites. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66 (suppl. I): 41-45, 1991.
6. Coelho, K. I. R. Granulomas. p.153-161. In: Montenegro, M. R. & Franco, M. *Patologia - Processos gerais*. 4ª ed., São Paulo, Atheneu, 1999.
7. Frenkel, J. K.; Tarachewski, H. & Voigt, W. P. Important pathologic effects of parasitic infections of man. p. 538-90. In: Mehlhorn, H. *Parasitology in focus*. Berlin, Springer, 1988.
8. Jain, N. C. A brief review of the pathophysiology of eosinophils. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 16:1212-1218, 1994.
9. Kurtzhals, J. A. L.; Reimert, C. M.; Tete, E.; Dunyo, S. K.; Koram, K. A.; Akanmori, B. D.; Nkrumaii, F. K. & Hviid, L. Increased eosinophil activity in acute *Plasmodium falciparum* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 112:303-307, 1998.
10. McEwen, B. J. Eosinophils: A review. *Vet. Res. Commun.* 16: 11-42, 1992.
11. Meeusen, E. N. T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. *Vet. Parasitol.* 84:259-273, 1999.
12. Meeusen E. N. T. & Balic, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites. *Parasit. Today*, 16(3):95-101, 2000.
13. Meeusen, E.; Barchan, G.; Gorrel, M. D.; Rickard, M. D. & Brandon, M. R. Cysticercosis: cellular immune responses during primary and secondary infection. *Parasite Immunol.* 17:37-45, 1990.
14. Montenegro, M. R. & Fecchio, D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. p.109-128. In: Montenegro, M. R. & Franco, M. *Patologia - Processos gerais*. 4ª ed., São Paulo, Atheneu, 1999.
15. Noemi, I. & Atias, A. Eosinofilia y Parasitosis p: 456-461. In: Atias, A. *Parasitologia Clínica*, 3ª ed., Mediterraneo, Santiago, 1993.
16. Spry, C. F. J. Synthesis and secretion of eosinophil granule substances. *Immunol. Today*, 6:332-335, 1985.
17. Spry, C. F. J. Eosinophyl leucocytes p.329-332. In: McGee, J. O'D., Isacson, P. G. & Wright, N. A. *Principles of Pathology - Oxford Textbook of Pathology*. Oxford, 1992.
18. Stevens, A. & Lowe, J. *Histology*, S. Louis, Mosby, 378p, 1993.
19. Tizard, I. R. Captura de material estranho. p.22-31. In: Tizard, I. R. *Imunologia Veterinária. Uma introdução*. 5ª ed, São Paulo, Roca, 1998.
20. Wakeelin, D. Genetic control of immunity to helminth infection p:651-70. In: Mehlhorn, H. *Parasitology in focus*. Berlin, Springer, 1988.
21. Weller, P. F. The immunobiology of eosinophils. *N. Engl. J. Med.* 324:1110-1118, 1991.

Endereço para correspondência

Mário Luiz de la Rue  
Depto. de Microbiologia e Parasitologia da Univ. Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS, Brasil – 97105-900  
E-mail: delarue@ccs.ufsm.br