

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses	3
<i>Jairo I. dos Santos, Moema P. P. Coelho & Berenice P. Nappi</i> Dermatophytosis' laboratorial diagnosis	
Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> em pacientes com AIDS	7
<i>Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino; Flávia Cristina de Fortuna Freitas;</i> <i>Julia Fernandes de Lima Nunes & Edna Marques de Araújo Silva</i> <i>Cryptosporidium</i> research in AIDS's patients	
Estudo comparativo entre contagem de plaquetas em sangue colhido em tubos de vidro e plástico	11
<i>E. L. T. Shimauti, Y. Fukushige & M. F. A. T. E. Araujo</i> Comparative study between platelets count in blood collected into glass and plastic tubes	
Determinação da atividade da fosforilase b-quinase em hemácias	15
<i>Jane Maciel Almeida Baptista & Gláucia Lopes Viana</i> Determination of the phosphorylase b-kinase in erythrocytes	
Exame do líquido sinovial nos laboratórios do estado de Santa Catarina	21
<i>P. Haas, K. Thiesen & L. C. Vituri</i> Synovial liquid examination in the state of Santa Catarina	
Cepas de pseudomonas resistentes a antimicrobianos testados no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará	27
<i>Everardo Albuquerque Menezes; Francisco Clayton Ferreira; Francisco Afrânio Cunha;</i> <i>Vaulice S. Café & José Luciano Bezerra Moreira</i> Pseudomonas strains resistants to antimicrobials tested at the Hospital Complex of the University Federal of Ceará, Brazil	
O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina IV - Avaliação da interação espermatozóide-muco cervical	31
<i>Fernando Tadeu Andrade-Rocha</i> Role of sperm examination in male infertility IV - Interaction evaluation of spermatozoa-cervical mucus	
Correlação dos anticorpos anti-endomisio e antitransglutaminase com a doença celíaca	39
<i>Shirley Ramos da Rosa Utiyama, Lorete Maria da Silva Kotze, Renato Mitsunori Nishihara & Vanessa Ferreira de Camargo</i> Correlation of anti-endomysial and antitransglutaminase antibodies with celiac disease	
Frequência de candidíase na mucosa bucal de pacientes portadores de SIDA na cidade de Fortaleza/CE	47
<i>Everardo Albuquerque Menezes, Shirleyde Alves dos Santos, Maria Neuman Ricarte Monteiro, Ticiania Mont'alverne Lopes Parente, Caio César Furtado Freire & Maria Rosimeire Vieira Florêncio</i> Candidiasis frequency in the oral mucous membrane from AIDS patients in Fortaleza/CE	
Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em pacientes atendidos no Laboratório Celso Matos - Santarém, PA	51
<i>Adjanny Estela Santos de Souza; Domingos Conceição de Sousa;</i> <i>Janusa Guimarães Gomez & Celso de Souza Matos</i> Occurrence of antitoxoplasma antibodies in patients attended in the Celso Matos Laboratory - Santarém, Pará	
Identificação de anemia ferropriva e parasitoses intestinais em um povoado de Feira de Santana - Bahia (Matinha dos Pretos), maio/1999 - outubro/2000	53
<i>Dr^a Eneida de Moraes Marcilio Cerqueira; Prof. João Francisco dos Santos;</i> <i>Jésua Maria Leite Bringel; Joelande Esquivel Correia; Lucíara Alves da Cruz Luz;</i> <i>Patricia Carneiro da Silva & Alany Santos Oliveira</i> Identification of ferroprivas anaemia and intestinals parasitosis in "Matinha dos Pretos", Feira de Santana - BA, Brazil (May/1999 to October/2000)	

1

VOLUME 34

2002

Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses

Dermatophytosis' laboratorial diagnosis

Jairo I. dos Santos¹, Moema P. P. Coelho² & Berenice P. Nappi¹

RESUMO – Dermatofitoses ou tinhas são micoses causadas por um grupo de fungos conhecidos como dermatófitos, cujas espécies estão distribuídas nos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. O seu diagnóstico laboratorial, assim como o de muitas outras micoses, baseia-se no exame microscópico direto do material clínico bem como no isolamento do fungo em meios de cultura apropriados. Metodologias modernas baseadas na detecção do DNA fúngico e que vem sendo aplicadas na identificação dos dermatófitos ainda não atingiram adequada padronização e relação custo/benefício que justifiquem a sua utilização na rotina laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE – Dermatofitoses, dermatófitos, colheita de material clínico, diagnóstico laboratorial.

SUMMARY – Dermatophytoses or ringworms are mycoses caused by fungi known as dermatophytes, which comprise species that are distributed in the genus *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*. The laboratory diagnosis of dermatophytoses, as in other mycoses, is based on direct microscopic examination of the clinical specimen followed by the isolation of fungus in appropriate culture media. Modern methodologies, based in the detection of the dermatophyte DNA, have not reached yet adequate standardization and cost/benefit balance to justify its use in the laboratory routine.

KEYWORDS – Dermatophytoses, dermatophytes, Laboratory diagnosis, specimen collection.

INTRODUÇÃO

Dermatofitoses ou tinhas são micoses causadas por um grupo de fungos conhecidos como dermatófitos. Suas espécies distribuem-se em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. O gênero *Epidermophyton* apresenta uma única espécie de importância: *E. floccosum*. O gênero *Microsporum* compreende espécies como *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. cookei* e *M. nanum*. O gênero *Trichophyton* tem como espécies mais importantes *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*,

T. tonsurans, *T. schoenleinii*, *T. violaceum* e *T. verrucosum*³⁰. As manifestações clínicas decorrentes das dermatofitoses resultam tanto da colonização e multiplicação dos dermatófitos na camada córnea da pele, quanto pela conseqüente reação dos hospedeiros.

Tradicionalmente, as dermatofitoses são classificadas clinicamente de acordo com as localizações anatómicas afetadas por estes fungos. A denominação de cada tipo de dermatofitose é feita adicionando-se um nome latino que designa o local do corpo afetado à palavra *tinea* (Tabela I).

TABELA I
Dermatofitoses humanas: principais manifestações clínicas e respectivas espécies de dermatófitos envolvidas*

Manifestações clínicas	Principais dermatófitos envolvidos	Manifestações clínicas	Principais dermatófitos envolvidos
<i>Tinea unguium</i>	<i>T. rubrum</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> var <i>interdigitale</i> ; <i>E. floccosum</i>	<i>Tinea capitis</i>	<i>T. tonsurans</i> ; <i>M. canis</i> ; <i>T. violaceum</i> <i>M. gypseum</i>
<i>Tinea pedis</i>	<i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>E. floccosum</i>	<i>Tinea favus</i>	<i>T. schoenleinii</i> ; <i>T. Tinea barbae</i> ; <i>T. verrucosum</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. violaceum</i>
<i>Tinea corporis</i>	<i>T. rubrum</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>E. floccosum</i> ; <i>M. canis</i> ; <i>M. gypseum</i>	<i>Tinea manuum</i>	<i>T. rubrum</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>M. gypseum</i> ; <i>E. floccosum</i>
<i>Tinea cruris</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>Tinea imbricata</i>	<i>T. concentricum</i>
	<i>T. rubrum</i> ; <i>T. mentagrophytes</i>		

* Segundo Rippon (1988)³⁰

Recebido em 25/5/2001
Aprovado em 11/2/2002

¹Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

²Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses

No diagnóstico laboratorial das dermatofitoses, como em outras micoses, a colheita do material clínico assim como a sua conservação e transporte devem ser realizados de forma adequada já que influenciaria muito no resultado final do exame laboratorial^{6,8,17,30}. É importante assegurar-se que o paciente não esteja fazendo uso de medicação antifúngica no momento da colheita. Caso isto ocorra, é necessário que haja a suspensão do uso do mesmo por pelo menos uma semana antes da colheita do material. É importante também se levar em consideração a quantidade de material a ser colhido. Deve-se procurar colher uma quantidade de material que seja suficiente para a realização de pelo menos dois exames laboratoriais. Entretanto, em algumas situações, em razão da pouca descamação observada na lesão, não é possível colher grande quantidade de material.

Quando da realização da colheita do material biológico deve-se respeitar a questão do crescimento radial do fungo na lesão. Assim, deve-se evitar colher material em áreas lesionadas mais antigas como o centro das lesões na pele e a região distal das unhas infectadas, pois o fungo geralmente apresenta-se em menor quantidade ou com pouca viabilidade nestes locais.

Os cabelos devem ser coletados junto com a raiz, já que o fungo está presente próximo a estas áreas. Já lesões de pele devem ser raspadas na região intermediária entre a parte lesionada e a parte sã, partindo-se da região próxima ao centro em direção à periferia da lesão. Quando não for possível evidenciar esta diferenciação, deve raspar áreas representativas das lesões.

O teto de bolhas e vesículas pode ser cortado com tesoura e coletado evitando-se, entretanto, o líquido contido nas mesmas, pois geralmente apresenta poucos elementos fúngicos. Já o material de lesões supuradas deve ser colhido com "swab" em virtude da dificuldade de se realizar raspagens neste tipo de lesão.

As unhas devem ser preferencialmente raspadas na sua área distrófica ou descorada até quase atingir o leito ungueal. O material queratinizado que se acumule embaixo da unha também deve ser coletado. Como o material biológico colhido das lesões por dermatofitoses geralmente compõe-se de material sólido, o mesmo deve ser transportado em recipientes secos como placas de Petri pequenas ou mesmo em envelopes de papel resistentes. Caso não for possível realizar o exame laboratorial logo após a coleta, o mesmo pode ser mantido em ambiente seco e ao abrigo da luz por pelo menos uma semana.

Exame microscópico direto

No exame microscópico direto o material colhido deve ser tratado com clarificantes, como o hidróxido de potássio (potassa) em uma concentração de 10-30%, para que as estruturas fúngicas presentes possam ser adequadamente visualizadas ao microscópio.

Dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser acrescentado em proporção variável no sentido de acelerar o processo de clarificação²³. Também pode ser acrescentada glicerina a 10% para evitar a dessecação rápida das lâminas¹⁷. O tempo de clarificação pode variar em função do tipo de material clínico, de alguns minutos como em raspados finos de pele, até muitas horas em se tratado de fragmentos maiores de unha.

Vários autores têm utilizado o branco de calcoflúor na solução de potassa^{6,7,11,25,26}. Este reagente liga-se à parede fúngica tornando os elementos fúngicos fluorescentes sob luz ultravioleta, facilitando assim a sua observação. Haldane & Robart (1990)¹² compararam a sensibilidade do uso de potassa com ou sem calcoflúor no exame microscópico direto de raspados de pele com o objetivo de avaliar a sua sensibilidade e especificidade de cada método para o diagnóstico de dermatofitoses e concluíram que o uso do calcoflúor não aumentou a sensibilidade e especificidade do exame microscópico direto. Além disso, a utilização do calcoflúor exige que a amostra seja observada em microscópio de fluorescência, aumentando assim, os custos deste teste.

Os dermatófitos em geral apresentam morfologia semelhante entre si ao exame microscópico direto³⁰. Em pele e unhas o aspecto mais observado é o da presença de filamentos micelianos septados de tamanho variável e que podem estar ramificados. É possível observar a presença de artroconídeos nos quais os filamentos micelianos separam-se fisicamente em nível dos septos e posteriormente os mesmos arredondam-se formando cadeias semelhantes a um colar de contas. Entretanto, deve-se ter grande cuidado na leitura microscópica, procurando-se esquadrihar todas as áreas da lâmina contendo o material clarificado, já que resultados falso-negativos são comuns em amostras de material contendo poucos elementos fúngicos³⁰.

Nos cabelos os dermatófitos apresentam-se como estruturas arredondadas (artroconídeos) e mais raramente filamentos micelianos, podendo estar tanto localizadas fora do cabelo, sendo chamadas de parasitismo por *ectothrix*, como dentro dos pelos, sendo chamados de parasitismo por *endothrix*. Entre as espécies cuja invasão ao cabelo produz o tipo *ectothrix* de parasitismo, podemos citar o *M. canis*, *M. gypseum* e

TABELA II
Morfologia dos dermatófitos no material clínico colhido nas lesões*

Origem do material clínico	Morfologia do fungo ao exame microscópico direto
Pele	Hifas septadas, ramificadas ou não, artroconídeos
Unha	Hifas septadas, ramificadas ou não, artroconídeos
Cabelos	Artroconídeos arredondados ao redor do cabelo (<i>Ectothrix</i>) Artroconídeos arredondados dentro do cabelo (<i>Endothrix</i>), hifas e bolhas de ar no interior do cabelo**

* Segundo Rippon (1988)³⁰; ** Em infecções por *T. schoenleinii*

T. mentagrophytes. Já aquelas associadas ao tipo endothrix estão *T. tonsurans* e *T. violaceum*, entre outros³⁰. Os resultados devem ser expressos de maneira a se fazer uma descrição morfológica clara e concisa das estruturas fúngicas observadas à microscopia. Na Tabela 2 são descritas resumidamente as estruturas fúngicas mais freqüentes em cada tipo de material biológico.

Cultivo e identificação dos dermatófitos

O cultivo dos dermatófitos é realizado rotineiramente em meio de ágar Sabouraud dextrosado contendo inibidores bacterianos e fúngicos como cloranfenicol e cicloheximide^{5,17,30}. Este meio está disponível no mercado brasileiro com nomes comerciais como "Mycobiotic agar" (Difco), Mycosel (BBL) ou Ágar Sabouraud Seletivo (Biobrás). Outro tipo de meio recomendado para o cultivo rotineiro de dermatófitos é o agar extrato de malte²⁹. A temperatura ótima de crescimento situa-se na faixa de 25 a 30°C. Nestas condições os dermatófitos crescem num período de uma a três semanas.

Como procedimento alternativo de cultivo pode-se utilizar o meio DTM ("Dermatophyte Test Medium"), que mostra a reação alcalina que se segue ao crescimento do dermatófito com mudança de cor para o vermelho, já que utiliza o vermelho de fenol como indicador da reação³³. Entretanto, a utilização deste meio pode prejudicar a visualização de características importantes como a presença de pigmentos, dificultando ou inviabilizando a identificação da espécie do dermatófito. Além disso, têm sido descritas reações falso-negativas para dermatófitos do gênero *Microsporum*, bem como reações falso-positivas para alguns fungos anemófilos²⁷.

Outros meios especializados podem ser utilizados quando o material está fortemente contaminado com bactérias ou leveduras. É o caso do meio CEA, que é constituído por ácido casamínico, eritról e albumina⁹. Segundo os autores, ele pode ser útil para cultivo de dermatófitos a partir de amostras provenientes de pacientes com diabetes ou outras condições patológicas debilitantes, em cujas lesões são encontradas freqüentemente leveduras do gênero *Candida*, principalmente a espécie *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Para a correta identificação da espécie do dermatófito, devem ser avaliadas as características macro e micromorfológicas das colônias e, em alguns casos, critérios fisiológicos e nutricionais^{5,17,30}. O estudo da morfologia inclui características macroscópicas como coloração da superfície e do reverso da colônia, topografia, textura e velocidade de crescimento. Além disso, fragmentos da colônia devem ser corados (geralmente com lactofenol azul de algodão) e examinados ao microscópio para a presença de elementos característicos como modificações de hifas, macro e microconídios (Tabela III). Algumas vezes pode ser necessária a realização de repiques das colônias para meios que favoreçam a formação de conídios, como ágar batata ou lactrimel^{4,14}. Ensaio adicional incluem o

TABELA III
Principais critérios utilizados para a identificação de espécies de dermatófitos*

Tipos de critérios	Parâmetros que podem ser observados
Macromorfológicos	Velocidade de crescimento, textura, topografia e cor do micélio e formação de pigmento reverso nas colônias, nos meios de cultura.
Micromorfológicos	Presença de modificações de hifas como gavinhas, candelabros fávicos, hifas em "raquete" e clamidoconídios no micélio.
Fisiológicos	Assimilação de uréia, estimulação de crescimento em presença de vitaminas (tiamina, ácido nicotínico), aminoácidos (histidina) e álcoois (inositol); perfuração de pelo "in vitro".

* Segundo Rippon (1988)³⁰; Clayton & Midgley (1989)⁵; Lacaz et al. (1991)¹⁷

teste de urease²⁸ e teste de perfuração de pelo "in vitro"¹ para diferenciação das espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e cultivo em grãos de arroz para diferenciação de espécies de *Microsporum*³¹. Além disso, algumas espécies de dermatófitos que são menos freqüentes na rotina laboratorial, apresentam requerimentos nutricionais especiais de maneira que, para o seu isolamento, é necessário que os mesmos sejam acrescentados ao meio de isolamento. Assim, o *Trichophyton equinum* necessita de ácido nicotínico enquanto que o *T. verrucosum* necessita de inositol e tiamina para o seu crescimento³¹.

Identificação dos dermatófitos baseada na detecção do seu DNA

Uma das áreas que tem sido objeto de interesse por parte dos pesquisadores é o da composição genética dos dermatófitos, como é demonstrado pelo grande número de publicações recentes abordando este tema^{2,3,10,13,15,16,18,22,24,32}. Alguns destes estudos tiveram por objetivo utilizar técnicas de biologia molecular na detecção do DNA do dermatófito e por consequência na sua identificação. Assim, Liu et al. (1997)¹⁹, por meio da técnica de AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) conseguiram identificar e diferenciar amostras de 16 espécies de dermatófitos. Posteriormente, os mesmos autores aperfeiçoaram esta técnica e conseguiram identificar corretamente a espécie de dermatófito de 23 entre 25 amostras desconhecidas²⁰. Entretanto, nestes trabalhos, eles utilizaram DNA extraído de culturas de dermatófitos e não do material biológico das lesões como seria desejável.

A possibilidade de detectar diretamente DNA de dermatófitos a partir de material clínico foi recentemente demonstrado por Turin et al. (2000)³⁴. Eles aplicaram um ensaio de PCR no qual foram amplificadas regiões do DNA ribossomal e assim conseguiram detectar DNA de várias espécies de fungos, incluindo-se entre elas dermatófitos, em 40 amostras clínicas de origem humana e animal. Machouart-Dubach et al. (2001)²¹ por sua vez compararam o ensaio de

PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Lengthy Polymorphism*), no qual fragmentos de DNA do dermatófito, contidos material de lesão, foram extraídos, amplificados e posteriormente digeridos com enzimas de restrição. As amostras identificadas desta forma apresentaram uma correspondência de 98,7% com o método padrão de cultivo das amostras em ágar Sabouraud.

Apesar de todos estes avanços e da intensa pesquisa que está sendo realizada neste campo, o diagnóstico baseado na detecção e identificação de DNA fúngico ainda não pode ser considerado uma metodologia recomendada para ser utilizada no dia a dia da rotina de diagnóstico das dermatofitoses, tendo em vista a inexistência até o momento de uma padronização para os diferentes ensaios genéticos, o alto custo dos reagentes utilizados, a infra-estrutura necessária para a realização destes testes e o treinamento do pessoal de laboratório.

CONCLUSÕES

O diagnóstico laboratorial das dermatofitoses ainda se baseia nos métodos tradicionais de exame microscópico direto do material clínico e no cultivo do fungo em ágar Sabouraud ou meios similares, que contenham inibidores. Para que se alcance a sensibilidade e especificidade esperadas nestes métodos, é necessário que o profissional envolvido na rotina micológica tome os devidos cuidados na colheita, conservação e transporte do material clínico, já que influenciarão muito no resultado final do exame. Novas metodologias que vem sendo desenvolvidas para serem aplicadas na identificação dos dermatófitos a partir do seu DNA contido no material clínico proveniente da lesão, ainda não atingiram adequada padronização e uma relação custo/benefício que justifiquem a sua utilização na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

- Ajello, L.; Georg, L. K. *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 8:3-17, 1957.
- Baek, S. C.; Chae, H. J.; Houh, D.; Byun, D. G.; Cho, B. K. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Int. J. Dermatol.*, 37:682-686, 1998.
- Bock, M.; Maiwald, M.; Kappe, R.; Nickel, P.; Näher, H. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. *Mycoses*, 37:79-84, 1994.
- Borelli, D. Medios caseros para micologia. *Arch. Venez. Med. Trop. y Parasitol.*, 4: 301-310, 1962.
- Clayton, Y. M.; Midgley, G. Identification of agents of superficial mycoses. In: Evans, E. G. V.; Richardson, M. D. *Medical Mycology - a practical approach*. IRL Press, Oxford, 1989.
- Davey, K. G.; Campbell, C. K.; Warnock, D. W. Mycological techniques. *J. Clin. Pathol.*, 49:95-99, 1996.
- Elder, B. L.; Roberts, G. D. Rapid methods for the diagnosis of fungal infections. *Lab. Med.*, 17: 591-596, 1986.
- Evans, E. G. V.; Richardson, M. D. General guidelines on laboratory diagnosis. In: Evans, E. G. V.; Richardson, M. D. *Medical Mycology - a practical approach*. IRL Press, Oxford, 1989.
- Fisher, J. B.; Kane, J. The laboratory diagnosis of dermatophytosis complicated by *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.*, 20: 167-182, 1974.
- Gräser, Y.; Kuijpers, A. F. A.; Presber, W.; De Hoog, G. S. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton tonsurans*. *Med. Mycol.*, 37:315-330, 1999.
- Hageage, G. L.; Harrington, B. J. Use of calcofluor white in clinical mycology. *Lab. Med.* 15:109-112, 1984.
- Haldane, D. J. M.; Robart, E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 13: 337-339, 1990.
- Harmsen, D.; Schwinn, A.; Brocker, E. B.; Frosch, M. Molecular differentiation of dermatophyte fungi. *Mycoses* 42:67-70, 1999.
- Kaminski, G. W. The routine use of modified Borelli's Lactrimel agar (MBLA). *Mycopathology*, 91:57-59, 1985.
- Kano, R.; Nakamura, Y.; Watanabe, S.; Tsujimoto, H.; Hasegawa, A. Phylogenetic relation of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporum* and *Trichophyton* in chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences. *Mycopathology*, 146:111-113, 1999.
- Kano, R.; Okabayashi, K.; Nakamura, Y.; Ooka, S.; Kashima, M.; Mizoguchi, M.; Watanabe, S.; Hasegawa, A. Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Med. Mycol.* 38:47-50, 2000.
- Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C. *Micologia Médica*. Sarvier, 8ª ed., São Paulo, 1991.
- Leclerc, M. C.; Philippe, H.; Guého, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.*, 32:331-341, 1994.
- Liu, D.; Coloe, S.; Baird, R.; Pedersen, J. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *B. J. Dermatol.*, 137:351-355, 1997.
- Liu, D.; Coloe, S.; Baird, R.; Pedersen, J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.*, 49:493-497, 2000.
- Machouart-Dubach, M.; Lacroix, C.; De Chauvin, F. M.; Le Gall, L.; Giudicelli, C.; Lorenzo, F.; Derouin, F. Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium* spp, and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism ribotyping method. *J. Clin. Microbiol.*, 39:685-690, 2001.
- Makimura, K.; Tamura, Y.; Mochizuki, T.; Hasegawa, A.; Tajiri, Y.; Hanazawa, R.; Uchida, K.; Saito, H.; Yamaguchi, H. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.*, 37:920-924, 1999.
- Milne, L. J. R. Direct microscopy. In: Evans, E. G. V.; Richardson, M. D. *Medical Mycology - a practical approach*. IRL Press, Oxford, 1989.
- Mochizuki, T.; Kawasaki, M.; Ishizaki, H.; Makimura, K. Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in nuclear ribosomal DNA. *J. Dermatol.* 26:276-81, 1999.
- Monheit, J. E.; Brown, G.; Kott, M. M.; Schmidt, W. A.; Moore, D. G. Calcofluor white detection of fungi in cytopathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 108:616-618, 1986.
- Monheit, J. E.; Cowan, D. F.; Moore, D. G. Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 108:616-618, 1984.
- Moriello, K. A.; Deboer, D. J. Fungal flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, 29:219-230, 1991.
- Philpot, C. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *Trichophyton rubrum* by a single urease test. *Sabouraudia*, 5:189-193, 1967.
- Richardson, M. D.; Evans, E. G. V. Culture and isolation of fungi. In: Evans, E. G. V.; Richardson, M. D. *Medical Mycology - a practical approach*. IRL Press, Oxford, 1989.
- Rippon, J. W. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. WB Saunders, 3ª, Philadelphia, 1988.
- Shadowy, H. J.; Philpot, C. M. Utilization of standard laboratory methods in the laboratory diagnosis of problem dermatophytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 74:197-201, 1980.
- Summerbell, R. C.; Haugland, R. A.; Li, A.; Gupta, A. K. rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.*, 37:4005-4011, 1999.
- Taplin, D.; Zaias, N.; Rebell, G.; Blank, H. Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM). *Arch. Dermatol.*, 99:203-209, 1969.
- Turin, L.; Riva, F.; Galbiati, G.; Cainelli, T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur. J. Clin. Invest.*, 30:511-518, 2000.

Endereço para correspondência:

Prof. Jairo Ivo dos Santos
Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde - UFSC
Campus Universitário, Florianópolis, SC - 88040-970
Tel.: (0xx48) 331-9712
E-mail: jivo@cc.ufsc.br

Pesquisa de *Cryptosporidium* em pacientes com AIDS*

Cryptosporidium research in AIDS's patients

Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino; Flávia Cristina de Fortuna Freitas;
Julia Fernandes de Lima Nunes & Edna Marques de Araújo Silva

RESUMO – O *Cryptosporidium sp* é um coccídio intestinal que vem apresentando grande destaque com o advento da AIDS. Parasito encontrado em indivíduos imunodeficientes e imunocompetentes, causando diarreias crônicas, muitas vezes, tomando proporções perigosas, do ponto de vista da Saúde. O estudo deste protozoário foi efetuado no Laboratório de Parasitologia Clínica do DACT-UFRN, através da técnica de Ziehl-Neelsen modificado, em 285 amostras fecais de pacientes internados no Hospital Giselda Trigueiro, na cidade do Natal-RN, portadores do vírus HIV e que se encontravam com diarreia no momento da coleta. Foram observados 36 (12,6%) amostras positivas e 249 (87,4%) com ausência do *Cryptosporidium sp*. Entre os casos positivos, 29 (10,2%) foram do sexo masculino e 7 (2,4%) do sexo feminino.

PALAVRAS-CHAVE – *Cryptosporidium*, AIDS, Ziehl-Neelsen modificado.

SUMMARY – The *Cryptosporidium sp* is an intestinal coccidium that is having a great projection since the AIDS's advent. This parasite is found in immunodeficient and immunocompetent people, and cause chronicle diarrhoea that many times become dangerous for the health the protozoan's research was done in the Laboratório de Parasitologia Clínica of the DACT-UFRN where it was identified in the changed Ziehl-Neelsen's technique in people contaminated with the HIV and who were with diarrhoea in the collect moment, in a whole of 285 faecal samples from Hospital Giselda Trigueiro in Natal-RN. In the samples were examined 36 (12.6%) positive sample and 249 (87.4%) without the *Cryptosporidium sp*. Among the positive sample 29 (10.2%) were of the masculine sex and 7 (2.4%) feminine.

KEYWORDS – *Cryptosporidium*, AIDS, changed Ziehl-Neelsen.

INTRODUÇÃO

Com o aumento das descobertas científicas, cada vez é maior o interesse da classe médica a respeito de determinados assuntos, levando ao estudo específico de cada doença. Assim, cresce também o interesse em um tema que hoje está em bastante discussão, a criptosporidiose, parasitose oportunista, que com o advento da AIDS e também de outros fatores que debilitam o paciente (uso de quimioterápicos), vem se destacando em número de casos.

Esta doença, geralmente vem acompanhada de uma diarreia aguda autolimitada em pacientes imunocompetentes, não passando de poucos dias a uma ou duas semanas de sintomatologia acentuada, enquanto que, nos pacientes que se encontram imunodebilitados, como portadores de HIV e/ou em uso de quimioterápicos, é observado que esta diarreia aguda tende a se cronificar, deixando de ser controlada pela própria resposta imunológica do paciente, passando a cursar de forma grave durante a evolução da doença.

A primeira ocorrência descrita da criptosporidiose humana ocorreu na América do Norte, sendo observada através de biópsia intestinal em uma criança de três

anos de idade, apresentando enterocolite grave autolimitada. Em 1976, foi também constatada a presença do parasita na mucosa intestinal de um fazendeiro, que fazia uso de imunossupressor²³. Porém, já em 1907, Tyzzer tinha observado um pequeno coccídio nas glândulas gástricas de camundongos, denominando-o de *Cryptosporidium muris*, como também, em 1911, tinha sido encontrado uma espécie menor, localizada no intestino delgado de camundongo, descrito como *Cryptosporidium parvum*¹⁸.

O *Cryptosporidium sp* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina. Nesta última, inclui os organismos freqüentemente referidos como coccídios, dos quais, os patógenos humanos mais comuns são: *Isoospora*, *Toxoplasma* e *Sarcocystis*. A família Cryptosporidiidae apresenta apenas um gênero *Cryptosporidium* com onze espécies^{11,23,25,26,28}. Descrito como homogêneo, o *Cryptosporidium* apresenta desenvolvimento na superfície da célula hospedeira ou no interior de sua borda em escova, e não propriamente na célula (intracelular e extracitoplasmática). O parasita possui ciclo monoxênico, com fases sexuada e assexuada, com desenvolvimen-

Recebido em 3/12/2001
Aprovado em 6/12/2001

*Lab. de Parasitologia Clínica do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas-DACT da Faculdade de Farmácia da Univ. Fed. do Rio Grande do Norte-UFRN

to preferencial nas microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal, ou mais raramente no parênquima pulmonar, vesícula biliar, ductos pancreáticos, esôfago e faringe do hospedeiro²¹. Apresenta diferentes formas estruturais que podem ser encontradas nos tecidos, fezes e meio ambiente. O oocisto pode ser ingerido ou inalado, do meio ambiente, alimentos ou água contaminada com fezes humanas ou de animais, liberando os quatro esporozoítos do seu interior nas primeiras porções do intestino delgado, infectando novas células intestinais^{15,22}.

A patogenia e o quadro clínico são influenciados por vários fatores, como, idade, estado imunológico e associação com outros patógenos. Porém, quando instalados na mucosa intestinal, as alterações provocadas interferem nos processos digestivos, podendo resultar na Síndrome da Má Absorção^{19,24}. A diarreia é a principal manifestação clínica da criptosporidiose, sendo caracterizada por evacuações coleriformes alternadas com períodos de constipação e de evacuações normais, porém outras manifestações podem aparecer como, colite, apendicite aguda, dilatação do ducto hepático e pneumopatias. A criptosporidiose pode vir associada a outros patógenos do trato digestivo, tais como, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Shigella sp* e *Citomegalovírus*^{16,27,29,32}.

Em indivíduos imunocompetentes, a doença se caracteriza por diarreia aquosa de um a trinta dias, anorexia, dor abdominal, náusea, flatulência, febre e dor de cabeça. O quadro clínico geralmente é benigno e autolimitante, podendo evoluir de forma inaparente ou com diarreia aquosa de grande volume. Em crianças, os sintomas são mais severos e podem vir acompanhados de vômito e desidratação, sendo considerado um importante agente patogênico envolvido na doença da diarreia infantil^{2,11,19,30}. Em indivíduos imunodeficientes, os sintomas são crônicos, caracterizados por vários meses de diarreia aquosa refratária à medicação antimicrobiana, acentuada perda de peso, desequilíbrio eletrolítico, má absorção, podendo levar a morte, principalmente em pacientes portadores do HIV. A diarreia é profusa, com restos alimentares e grande perda de líquido, cerca de três litros por dia^{1,6,18,31}.

O diagnóstico dos *Cryptosporidium* era realizado através de biopsia intestinal, com a demonstração histológica do parasita ligado à borda em escova das células epiteliais. Hoje, a pesquisa pode ser realizada nas fezes, através dos métodos de coloração e concentração¹⁴.

O tratamento de *Cryptosporidium sp* mostrou-se ineficaz aos medicamentos, sendo feito apenas o alívio da sintomatologia, principalmente dos efeitos da diarreia e desidratação, no entanto, a cura nos indivíduos imunocompetentes é geralmente espontânea.

Visando contribuir com a elucidação do diagnóstico do paciente, juntamente com o médico, dando um laudo analítico representativo do que realmente o indivíduo apresenta, através de uma técnica específica, que geralmente não é realizada rotineiramente dentro do Laboratório de Análises Clínicas, houve a necessidade

de identificar um método com alta sensibilidade e financeiramente viável para facilitar o seu emprego. Com isso, o objetivo é implantar esta técnica no Laboratório de Parasitologia Clínica do DATC-UFRN, devido ao aumento do número de solicitações de Pesquisa de *Cryptosporidium sp*, e com os resultados, realizar uma análise criteriosa dos exames, observando variações frente ao sexo, sintomatologia, estado imunológico, presença de diarreia e outros fatores que possam ajudar no diagnóstico da doença, e com isso, a terapêutica clínica e farmacológica empregada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Reagentes, materiais e equipamentos

Os reagentes, materiais e equipamentos utilizados foram os encontrados no Laboratório de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Amostras

As amostras foram provenientes de pacientes internados no Hospital Giselda Trigueiro, que apresentavam diarreia crônica ou aguda, imunodeprimidos, portadores do vírus HIV, ambos os sexos e de todas as idades.

Métodos

Coleta da amostra

A coleta das amostras foi realizada em frasco plástico contendo solução de formalina à 10% na proporção de 1:3 de fezes.

Método de concentração

Etapa importante, já que o número de parasitas em amostras diarreicas geralmente é pequeno, e a técnica de montagem da lâmina a fresco diretamente pode não detectar os parasitas. Esta técnica detecta ovos, larvas e cistos, mesmo em pequena quantidade nas fezes, tornando a análise do material biológico mais fidedigno.

O método de concentração empregado foi o formalina-éter, que baseia-se na homogeneização e filtração em gaze dupla do material coletado em 10ml de solução de formalina a 10%, e centrifugação a 2500-3000rpm por 5 a 7min. Em seguida, após decantar o sobrenadante, é realizado uma agitação enérgica do sedimento com éter, desengordurando o material fecal, evitando resultados falsos positivos. Então, é realizada a centrifugação por 5min a 1500rpm. Após a segunda centrifugação, decanta-se o sobrenadante, desprende das paredes do tubo a gordura e realiza o emprego do sedimento na lâmina^{4,5,12}.

Método de coloração

Etapa de identificação dos oocistos que tomaram a coloração de acordo com a técnica de coloração utilizada, Ziehl-Neelsen modificada ou Azul de Metileno-Safranina.

Técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada

Baseia-se na fixação dos oocistos por 10 min em metanol, aplicação da fucsina por 20 min, e descoloração do esfregaço com álcool-ácido, já que os oocistos são álcool-ácido resistente, para então colocar por 5 min o azul de metileno ou verde de malaquita, corantes de fundo^{3,5,12}.

Técnica de coloração de azul de metileno-safranina

Baseia-se na característica álcool-ácido resistente dos oocistos, fixados inicialmente por 10 min com metanol, para posterior coloração por 15 min com a safranina, descoloração com álcool-ácido e coloração de fundo por 5 min com o azul de metileno.

Esta técnica sofre mais interferências, pois os oocistos se coram de laranja pela safranina, e são confundidos com gotículas de gordura e/ou outros artefatos possíveis presentes na amostra fecal, e que não são eliminados nos procedimentos que antecedem a coloração^{10,17,20}.

Aspectos analisados

O aspecto microscópico do material biológico e o questionamento junto aos pacientes quanto aos principais sinais e sintomas foram importantes para auxiliar no diagnóstico laboratorial, identificando a necessidade de uma nova coleta de material biológico^{7,8,13}. Os aspectos analisados:

- presença ou não de diarreia aguda, febre, vômito, desidratação, leucócito nas fezes, e outras patologias associadas;
- número de evacuações diárias;
- tempo de duração das diarreias; e
- uso de medicamentos (antibióticos ou antiparasitários) que possam mascarar o diagnóstico.

RESULTADOS

Foram analisadas 285 amostras fecais diarreicas, que ao serem submetidas às técnicas de concentração e coloração, apresentaram 36 casos positivos, com a presença de *Cryptosporidium sp*, perfazendo uma positividade bastante elevada de 12,6% em sua totalidade, se levarmos em consideração que se trata de uma parasitose oportunista e de curso autolimitado (Tabela I). Dos casos positivos, 29 (10,2%) eram do sexo masculino e 7 (2,4%) do sexo feminino, dentro de um contingente de 196 (68,8%) pacientes do sexo masculino e 89 (31,2%) do sexo feminino (Tabela II).

Quanto à técnica de coloração, foi observado que a Ziehl-Neelsen modificada foi a melhor técnica de coloração para visualização dos *Cryptosporidium sp*, já que

TABELA I
Cryptosporidium sp em pacientes com AIDS

Exames	nº	%
Positivos	36	12,6
Negativos	249	87,4
Total	285	100,0

TABELA II
Distribuição de *Cryptosporidium sp* em relação ao sexo

Exames	Sexo				Total	
	Masc.		Fem.			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivos	29	10,2	7	2,4	36	12,6
Negativos	167	58,6	82	28,8	249	87,4
Total	196	68,8	89	31,2	285	100

a coloração laranja tomada pela safranina prejudica o diagnóstico por ser a mesma cor tomada por gotículas de gordura e artefatos de material fecal. Quanto à coloração de fundo, o azul de metileno foi o corante de escolha, pois o verde de malaquita prejudica a visualização por dar um aspecto pálido e manchado.

DISCUSSÃO

Esta parasitose adquiriu dimensões dramáticas com o surgimento da AIDS, representando nos pacientes aidéticos a principal causa de diarreia, com importante morbi-mortalidade no Brasil e em países subdesenvolvidos⁹, estando de acordo com os resultados encontrados, pois os pacientes eram aidéticos e apresentavam diarreia no momento da coleta.

Em países desenvolvidos, como na Europa, esta zoonose atinge cerca de 1-2% da população geral, nos EUA de 0,6-4%, na Ásia, Austrália, África, América do Sul e Central varia de 3-20% nos imunodeprimidos e crianças. No Brasil, foi observado por Weikel e Cols., no Estado do Ceará, uma positividade de 8% em um inquérito epidemiológico em 117 pacientes com diarreia aguda¹⁹. Segundo Elaine Guizelini e Vicente Amato Neto, de uma análise de 807 pacientes com diarreia de intensidade variada, 10,4% dos casos apresentavam a presença de oocistos de *Cryptosporidium sp* na análise¹⁶. Isto mostra que os achados obtidos coincidem com a realidade brasileira, considerada de frequência elevada frente à de outros países.

Portanto, foi realizada a identificação do *Cryptosporidium sp* em pacientes com diarreia e imunodeprimidos, e com isto, a análise da incidência destes parasitas, constatando a presença de uma positividade consideravelmente elevada e que coincide com alguns resultados observados no Brasil. Portanto, é de suma importância a identificação do *Cryptosporidium sp* e a implantação da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada através de concentração pela formalina nos serviços de rotina laboratorial, uma vez que atendeu prontamente às necessidades de identificação do parasita.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, profissionais da área de saúde e demais funcionários do Hospital Giselda Trigueiro que contribuíram para o êxito deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. **Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S.** *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro, Revinter, p.419, 1995.
2. **Alves, J. G. B.** *Cryptosporidium* em crianças com desnutrição grave. *J. Pediatría*. v.65, n.6, p.220-222, 1989.
3. **Amato Neto, V.** *Cryptosporidium* en niñas de Costa Rica: estudio transversal y longitudinal. *Rev. Biol. Trop.*, v.32, n.1, p.129-135, 1984.
4. **Amato Neto, V.; Corrêa, L. L.** *Exames parasitológicos de fezes*. 5ª ed., São Paulo, Sarvier, 1991.
5. **Attilio, G. C.** *Coloração específica para microsporídeos*. Porto Alegre, p.1-31, 1994.
6. **Attilio, G. C.** Identificação de coccídios intestinais: modificações do método de Ziehl-Neelsen. *Rev. Bras. Anál. Clin.*, v.27, n.3, p.83-87, 1995.
7. **Castro, B. G.** Síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). *Ciência Hoje*, v.5, n.27, p.27-37, 1986.
8. **Chacinbonilla, L.** *Cryptosporidium* among patients with the acquired immunodeficiency syndrome in Maracaibo, Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.30, n.4, p.333-335, 1991.
9. **Ceccarelli, V. R. S. M.; Vinagre, A. C. P.; Yara, T. I.** Freqüência de enteropatógenos intestinais isolados no período de julho de 1991 a julho de 1993, no Laboratório de Bio-Ciências/Lavoisier. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.26, n.3, p.89-90, 1994.
10. **David, M.; Asmuth, M. D.** Microsporidia and diarrhea in AIDS patients. *Clin. Microbiol. News Lett.*, v.16, n.23, p.179-183, 1994.
11. **De David, S. M. M.** Demonstração de *Isospora belli* pelo método modificado de Kinyoun em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.27, n.4, p.111-112, 1995.
12. **De Carli, G. A.** Diagnóstico de laboratório da criptosporidiose humana. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.23, n.2, p.26-30, 1995.
13. **Dias, R. M. D. S.** Criptosporidiasis among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the country of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.30, n.4, p.310-312, 1988.
14. **Genebra. Organização Mundial de Saúde.** *Procedimentos laboratoriais em parasitologia médica*, 1ª ed., Santos, 1994.
15. **GUDERIAN, R. H.** Criptosporidiasis humana en el Ecuador. *Rev. Fac. Ciênc. Méd. (Quito)*, v.10, p.5-9, 1985.
16. **Guizelini, E.; Amato Neto, V.** Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium sp* nas fezes diarreicas de adôlescentes e de crianças e adultos imunocompetentes em São Paulo. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, v.47, n.3, p.150-152, 1992.
17. **Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A.; Brooks, G. F.; Butel, J. S.; Ornstun, L. N.** *Microbiologia médica*, 18ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.383-384, 1991.
18. **Labarca, J. L.** Colecistis aguda alitiásiaca por *Cryptosporidium sp* em um paciente com SIDA. *Rev. Médica*, v.120, n.7, p.789-793, 1992.
19. **Loureiro, E. C. B.** Criptosporidiasis em crianças de 1 a 2 anos de idade, com diarreia aguda em Belém do Pará, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.84, n.1, p.117-122, 1989.
20. **Mata, L.** Criptosporidiasis. *Centro de Ciências da Saúde*, v.6, n.2, p.53, 1984.
21. **Mendez, P. E.** Criptosporidiasis presentacion de dos casos y revision de la literatura. *Rev. Medic. Int.*, v.2, n.1, p.64-66, 1996.
22. **Mercador, R. T. M.** *Cryptosporidium sp*: deteccion de ooquistes en deposiciones preservadas em fenol-alcohol-formalina (PAF) y acetato de sódio, acido acetico y formalina (SAF). *Parasitol. al Diag.*, v.10, n.2, p.60-63, 1986.
23. **Mercador, R. T. M.** Diagnóstico de laboratório de la criptosporidiasis intestinal. *Biol. Hosp. San Juan de Dios*, v.33, n.2, p.87-91, 1996.
24. **Miche, M. P. E. Cury, A. E.** *Isosporose humana*, n.37, São Paulo, 1995.
25. **Moura, H.; Oliveira, L. M.** *Cryptosporidium sp*: parasito de imunocomprometidas?. *Rev. Bras. de Pat. Clin.*, v.21, n.6, 1985.
26. **Neves, D. P.** *Parasitologia*, 8ª ed., Minas Gerais, Atheneu, 1991.
27. **Nuez, M. R. Z.** Gastroenterite erosiva associada a *Cryptosporidium sp* num paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, v.45, n.4, p.188-189, 1990.
28. **Oliveira, A. A.; Irmão, J. I.; Lima, M. C. P. E. Camelo, J. M. A.** *Cryptosporidium parvum*: a propósito de um estudo morfo-métrico. *NewsLab*, 17ª ed., 1996.
29. **Rodrigues, J. L. N.** Prevalência de criptosporidiasis na síndrome diarreica do paciente HIV positivo A.M.B. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.37, n.2, p.79-84, 1991.
30. **Roitt, I. M.; Mims, C. A.; Playfair, J. H. L.; Wakelin, D.; Williams, R.; Anderson, R. M.** *Microbiologia médica*. 1ª ed., Manole, São Paulo, c.25 e 33, p.25.18-25.19,33.13; 1995.
31. **Tassara, R.** Criptosporidiasis humana: características clínicas de 11 casos. *Bol. Hosp. San Juan de Dios*, v.33, n.4, p.237-240, 1986.
32. **Wittz, J. C.** Freqüência de *Cryptosporidium sp* em pacientes hospitalizados com sintomas digestivos. *Rev. Chilena Pediatría*, v.57, n.1, p.10-12, 1986.

Endereço para correspondência:

Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino
Av. Boa Viagem, 6836, bl. 19, ap. 11 - Boa Viagem - 51130-000 - Recife/PE
Tel. (0xx81) 3462-9574 / 9977-1009
E-mail: sassuana@bol.com.br

Você está gostando da RBAC?

Queremos saber a sua opinião sobre a nossa revista, pois só assim poderemos melhorar a forma de sua apresentação.

A sua colaboração, elogio, crítica, sugestão, podem ser encaminhadas através do nosso e-mail:

geral@sbac.org.br

ou pelo fax **(0xx21)2264-4449**

Estudo comparativo entre contagem de plaquetas em sangue colhido em tubos de vidro e plástico*

Comparative study between platelets count in blood collected into glass and plastic tubes

E. L. T. Shimauti¹, Y. Fukushige² & M. F. A. T. E. Araujo³

RESUMO – Devido à tendência das plaquetas em aderirem nas superfícies estranhas, além da facilidade destas em aglutinarem e desintegrarem, contagem de plaquetas realizada por método manual apresenta certa dificuldade operacional, estando assim sujeita a resultados errôneos. Presente estudo teve como finalidade verificar o efeito dos materiais mais comumente utilizados na colheita e diluição das amostras sanguíneas, sobre plaquetometria. Foram analisadas amostras de sangue de 18 indivíduos adultos, colhidas simultaneamente em recipientes de vidro e de plástico contendo EDTA 10%. Diluição destas amostras foram realizadas em tubos de plástico e vidro com oxalato de amônio 1% e a contagem realizada em câmara espelhada de Neubauer. Resultados apontaram que, faixas plaquetárias obtidas de sangue submetido a diferentes tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, indicando por conseguinte que, tanto vidro quanto plástico podem ser utilizados sem restrições para realização desse exame.

PALAVRAS-CHAVE – Contagem de plaquetas, tubos de plástico, tubos de vidro.

SUMMARY – Because of the platelets tendency to adhere strange surfaces, besides their facility to agglutinate and disintegrate, the manual platelets count presents some technical difficulties wich may lead to incorrect results. The purpose of this study was to verify the effects of the more commonly used material in the collection and dilution of blood samples over the platelets count. Blood samples simultaneously collected into glass and plastic tubes containing 10% EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid) of 18 adult individuals were analysed. The dilution of these samples were made in glass and plastic tubes with 1% ammonium oxalate and the counting was made in a polished Neubauer chamber. The results showed that platelets ranges obtained from blood submitted to different treatments didn't present significant statistical differences, wich indicates that both glass and plastic may be used without restriction for the procedure of this exam.

KEYWORDS – Platelets count, plastic tubes, glass tubes.

INTRODUÇÃO

A contagem de plaquetas é empregada amplamente na prática clínica, seja para avaliar o risco de sangramento realizada como procedimento pré-cirúrgico, investigação dos distúrbios hemostáticos e, principalmente, no acompanhamento dos pacientes com trombocitopenia (Almeida, 1984; Koepke, 1998).

Plaquetas são derivadas dos megacariócitos, na medula óssea e devem estar presentes no sangue periférico em número suficiente para exercer seu papel efetivo na hemostasia primária e coagulação (Coelho *et al.*, 1981; Almeida, 1984; Carvalho, 1994; Hoffbrand, 1994; Lorenzi, 1999). A interação das plaquetas com estrutura lesada do endotélio vascular, proteínas plasmáticas e células sanguíneas circulantes são fato-

res fundamentais para regulação da hemostasia e patogênese da trombose (Rifkin, 1998).

A avaliação do parâmetro plaquetário é atualmente realizada por método automatizado altamente reprodutível, preciso e exato. Entretanto, laboratórios de pequeno porte, os quais representam a maioria dos laboratórios do Brasil, não dispõem de contador eletrônico apropriado, sendo sua contagem processada pela técnica manual, em hemocitômetro. O processamento por método manual apresenta certa dificuldade operacional, devido à tendência das plaquetas em aderirem nas superfícies estranhas e também pela facilidade destas em se aglutinarem e desintegrarem (Garvin, 1961; Vallada, 1988; Carvalho, 1994), podendo desse modo ocasionar erro e imprecisão nos resultados. Para minimizar esses inconvenientes, tem sido

Recebido em 8/2/2002

Aprovado em 18/2/2002

*Trabalho realizado no Lab. de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) do Depto. de Análises Clínicas (DAC) da Univ. Est. de Maringá (UEM) – PR

¹Prof^º da disciplina de Hematologia Clínica - DAC - UEM; ²Prof do Depto. de Estatística - UEM;

³Farmacêutica-Bioquímica do setor de Hematologia Clínica do LEPAC - DAC – UEM

Fonte financiadora - LEPAC

recomendado alguns cuidados técnicos tais como, uso de anticoagulante apropriado (SBHH,1975; Moura, 1977), emprego do microscópio de contraste de fase (Coelho *et al.*, 1981; Vallada, 1988), tempo decorrente entre punção venosa e análise (Lampasso,1968; Carvalho,1994) e utilização do recipiente de plástico ou de vidro siliconizado para colheita, armazenamento e análise da amostra sanguínea(ODJJ, 1973; SBHH, 1975; Azevedo *et al.*,1977; Moura *et al.* 1977). No tocante ao tipo de material para armazenamento da amostra biológica, Brandão *et al.* (1986) tem demonstrado que sangue destinado para contagem plaquetária pode ser colhido em tubo de vidro comum sem preocupação adicional da utilização do tubo de plástico ou de vidro siliconizado.

Diante dessa controvérsia, resolvemos realizar um estudo com intuito de avaliar os efeitos dos tubos de vidro sem revestimentos de silicone e de plástico, sobre plaquetometria, utilizados na colheita e diluição das amostras de sangue e, por conseguinte preconizar um procedimento seguro e adequado na bancada de exames.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 36 amostras de sangue obtidas de 18 indivíduos aparentemente saudáveis, de ambos os sexos, na faixa etária de 18 a 50 anos, provenientes do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC). De cada indivíduo foram coletados 10 ml de sangue com seringa de plástico, dos quais, 5 ml transferidos em recipiente de plástico e outros 5 ml em recipiente de vidro, contendo em ambos 0,05 ml de EDTA 10%. Cada uma dessas amostras foram submetidas à diluição de 1/20 em oxalato de amônio 1% (Coelho *et al.*, 1981) nos tubos de plástico e de vidro e, em seguida, preenchidas em câmara espelhada de Neubauer. Essas preparações foram colocadas em câmara úmida por 20 minutos para sedimentação plaquetária e a contagem processada em microscópio ótico, com 400x de aumento, em 1 mm² do retículo central do hemocítmetro de Neubauer. Número resultante desta contagem foi multiplicado por 200 (Coelho *et al.*, 1981), em seguida, checado pela extensão sanguínea correspondente, corada segundo Leishman. Amostras foram processadas no prazo de até 2 horas após punção venosa. Os dados foram analisados empregando-se o t de Student com $p < 0,05$ (Costa Neto, 1997), utilizando o *software Statistica*.

RESULTADOS

A Tabela I discrimina resultados da contagem plaquetária e seus respectivos valores médios obtidos de 36 amostras submetidas a diferentes tipos de tratamentos. Análise dos resultados revela que, embora haja visualmente, tendência à redução do número de plaquetas quando amostras são processadas em recipientes de vidro, estatisticamente não foi observada diferença significativa entre as médias auferidas das amostras armazenadas e diluídas em materias de vidro e de plástico (Tabela II).

TABELA I
Demonstrativo das faixas plaquetárias obtidas de acordo com as condições em que o sangue foi colhido (RV e RP) e diluído (TP e TV)

Amostras	Plaquetas (mm ³)		Plaquetas (mm ³)	
	RV		RP	
	TP	TV	TP	TV
1	193 000	172 000	220 000	214 000
2	213 000	202 000	244 000	225 000
3	167 000	154 000	146 000	148 000
4	262 000	255 000	251 000	246 000
5	189 000	170 000	165 000	176 000
6	231 000	233 000	226 000	234 000
7	214 400	207 600	226 000	238 200
8	208 000	203 000	200 000	220 000
9	142 200	134 400	170 000	176 800
10	265 000	279 000	355 000	308 000
11	211 000	193 000	197 400	199 600
12	173 400	160 000	175 200	181 600
13	196 000	184 600	190 000	184 000
14	264 400	303 000	302 000	275 200
15	188 000	162 200	174 200	179 200
16	220 400	208 200	232 000	227 000
17	142 000	151 600	174 000	169 000
18	186 600	198 000	190 800	187 200
Média	203 688,9	198 366,7	213 266,7	210 488,9

RV - Recipiente de vidro; RP - Recipiente de plástico; TP - Tubo de plástico; TV - Tubo de vidro

TABELA II
Estudo comparativo entre valores médios das plaquetas obtidos das amostras sanguíneas submetidas a diferentes tratamentos, utilizando o Teste t de Student. Nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Trat. 1 x Trat. 2	Plaquetas (mm ³)		Valor	
	(Trat. 1)	(Trat. 2)	t	p
RPTP x RVTP	213 266,7	203 688,9	0,6392	0,5269
RPTV x RVTV	210 488,9	198 366,7	0,846	0,4034
RVTP x RVTV	203 688,9	198 366,7	0,387	0,7008
RPTP x RPTV	213 266,7	210 488,9	0,1789	0,8591

RPTP - Recipiente de plástico, Tubo de plástico; RPTV - Recipiente de plástico, Tubo de vidro; RVTP - Recipiente de vidro, Tubo de plástico; RVTV - Recipiente de vidro, Tubo de vidro; Trat. - Tratamento

DISCUSSÃO

Estudo de adesividade plaquetária em diferentes superfícies, tais como de vidro comum, vidro siliconizado e de plástico, tem sido relatado na literatura (Lewis e Stoddart, 1971; Page e Mitchell, 1979; Bran-

dão *et al.*, 1986). Apesar da demonstração previa, enfatizando importância do emprego sistemático de recipientes de vidro siliconizado ou de plástico para armazenamento das amostras sanguíneas destinadas à plaquetometria, o presente experimento demonstrou que número de plaquetas obtido das amostras sanguíneas colhidas e diluídas em materiais de vidro, bem como em plástico, não sofreu diferença estatisticamente significativa (Tabela II). Da mesma forma, análise realizada por Lewis e Stoddart (1971) bem como por Brandão *et al.* (1986), também não mostraram diferença estatisticamente relevante entre diferentes tipos de materiais, reforçando assim os dados obtidos neste trabalho.

Considerando o aumento expressivo da adesividade plaquetária após cirurgia e infarto do miocárdio (Page e Mitchell, 1979), foram incluídas no presente estudo, somente amostras provenientes de indivíduos aparentemente saudáveis, sem história recente de cirurgias e com faixa plaquetária situada nos limites de referência, segundo Dacie e Lewis (1996), para assim evitar possíveis variáveis.

Dados demonstrados neste trabalho sugerem que a amostra sanguínea destinada à avaliação do número de plaquetas pode ser processada sem restrição em qualquer um dos recipientes estudados, ou seja, vidro ou plástico, desde que seja executada conforme recomendações técnicas. Padronização adequada bem como controle da qualidade do método é fundamental na eliminação dos interferentes e obtenção do valor confiável de plaquetas. Estudos posteriores utilizando outros tipos de amostragem, tais como, número anormal de plaquetas ou indivíduos expostos a determinadas condições patológicas, poderiam enriquecer as informações acerca da adesividade plaquetária em superfícies de diferentes materiais e seu efeito sobre plaquetometria.

REFERÊNCIAS

1. Almeida, T. P. Púrpura Trombocitopênica. In: **Marinho, H. M.** *Hematologia*. São Paulo: Sarvier. cap.28, p.267-272, 1984.
2. Azevedo, C. B.; Baré, L. F.; Gonzaga, A. L. Técnicas de hemostasia e coagulação. *Rev. Bras. Anál. Clin.* 9(3):1-34, 1977.
3. Brandão, A.B.; Toniolo, M. L. M.; Canto, T. S. Recipientes siliconizados na coleta de sangue para contagem de plaquetas. *Saúde*. 12(1):99-105, 1986.
4. Carvalho, W. F. *Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia*. Belo Horizonte: Coopmed. 1994. p. 90-96.
5. Coelho, E.; Sale, M. Z.; Jamra, M. *Técnicas de estudo da coagulação*. São Paulo: Santos Ed. p.122 1981.
6. Costa Neto, P. L. O. *Curso de Estatística*. São Paulo: Blucher Ed., 1977.
7. Dacie, J. V.; Lewis, S. M. *Practical hematology*. 8th ed. New York: Churchill Livingstone Ed. p.9-19. 1996.
8. Garvin, J. E. Factors effecting the adhesiveness of human leucocytes and platelets in vitro. *J. Exp. Med.* 114:51-72, 1961.
9. Hoffbrand, A. V.; Petit, J. E. *Clinical hematology*. London: Sandoz. 360p. 1994.
10. Koepke, J. A. Laboratory evaluation of platelets. In: **Stiene-Martin, E. A.;** **Lotspeich-Steininger, C. A.;** **Koepke, J. A.** *Clinical hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott. cap.56, p.707-716. 1998.
11. Lampasso, J. A. Changes in hematologic values by storage of ethylenediaminetetraacetate human blood for varying periods of time. *Amer. J. Clin. Path.* 49:443-447, 1968.
12. Lewis, S. M.; Stoddart, C. T. H. Effects of anticoagulants and containers (glass and plastic) on the blood count. *Lab. Pract.* 20(10):787-792, 1971.
13. Lorenzi, T. F. *Manual de hematologia propedêutica e clínica*. 2^a ed. Rio de Janeiro: MEDSI. p.169-183. 1999.
14. Moura, R. A. A. *Técnicas de laboratório*. Rio de Janeiro: Atheneu. p.449-470. 1977.
15. [ODJJ] **Ortho Diagnostics-Johnson & Johnson**. *Técnicas de coagulação*. São Paulo. 53p. 1973.
16. Page, R. L.; Mitchell, R. A. Platelet adhesiveness to glass. *Journal of the International Society on Thrombosis and Hemostasis*. 42(2):705-725, 1979.
17. Rifkin, R. M. The megakaryocyte - Platelet system. In: **Stiene-Martin, E. A.;** **Lotspeich-Steininger, C. A.;** **Koepke, J. A.** *Clinical hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott. cap.55, p.689-706. 1998.
18. [SBHH] **Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. *Manual de técnicas e recomendações hematologia*. São Paulo. 316p. 1975.
19. Vallada, E. P. *Manual de técnicas hematológicas*. Rio de Janeiro: Atheneu. p.78-82. 1988.

Endereço para correspondência:

Eliana L. T. Shimauti
Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Análises Clínicas
Av. Colombo, 5.790, zona 07 - 87020-900 Maringá PR
E-mail: eltshimauti@uem.br

Atualização profissional

Encontro Nacional de Professores de Análises Clínicas

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas promoverá o Encontro Nacional de Professores de Análises Clínicas durante o XXIX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e o II Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, no período de 26 a 30 de maio de 2002, em Fortaleza, Ceará.

Serão apresentados os temas Ensino de Graduação e Pós-Graduação *lato sensu* e *stricto sensu*, além de palestras sobre temas de atualização.

A SBAC oferecerá inscrição gratuita no Congresso para os professores atuantes nas áreas das análises clínicas; o documento comprobatório é a xerocópia do vínculo empregatício com a instituição onde atua.

Contato:

Prof. Antenor Pedrazzi
E-mail: ahppedrazzi@uol.com.br
Tel.: (0xx16)625-4970

Determinação da atividade da fosforilase b-quinase em hemácias*

Determination of the phosphorylase b-kinase in erythrocytes

Jane Maciel Almeida Baptista¹ & Gláucia Lopes Viana²

RESUMO – A enzima fosforilase b-quinase catalisa a fosforilação da fosforilase (b), inativa, em fosforilase (a), ativa. A sua deficiência provoca a glicogenose tipo IX. Neste trabalho é desenvolvido um método para a determinação da atividade da fosforilase b-quinase em hemácias possibilitando o diagnóstico laboratorial desta doença de estocagem de glicogênio.

PALAVRAS-CHAVE – Fosforilase b-quinase, hemácias, glicogenose tipo IX.

SUMMARY – The enzyme phosphorylase b-kinase catalyzes the phosphorylation of the phosphorylase (a), inactive form, in phosphorylase (b), active form. This deficit is named glycogenose type IX. In this article a method is presented to the determination of the phosphorylase b-kinase activity in the erythrocytes. The technique makes possible the laboratorial diagnostic of this glycogen storage disease.

KEYWORDS – Phosphorylase b-kinase, erythrocytes, glycogenose type IX.

INTRODUÇÃO

As Doenças de Estocagem de Glicogênio (DEG) ou glicogenoses caracterizam-se por um excesso de glicogênio nos tecidos e/ou por um polímero com estrutura anormal. Estas situações advêm de defeitos inerentes que afetam várias enzimas envolvidas na síntese e na degradação do glicogênio. São descritos 1 caso em cada 50.000 nascimentos (Howell & William, 1983). As glicogenoses são classificadas numericamente (Cori, 1958; Howell & William, 1983). São descritos doze diferentes tipos, resultantes de deficiências enzimáticas distintas. Clinicamente são reconhecidos três grupos principais: as glicogenoses hepáticas (Tipos 0, I, III, IV, VI, VIII, IX, X, XI), as glicogenoses musculares (Tipos V, VII) e as glicogenoses generalizadas (Tipo II).

Dentre as glicogenoses hepáticas, distingue-se a glicogenose tipo IX, produzida pelo déficit em fosforilase b-quinase (PK, E.C. 2.7.1.38). A PK é a enzima que atua, na cascata de reações para a quebra do glicogênio, transformando a fosforilase b, inativa, em fosforilase a, ativa (Figura 1). Esta deficiência é responsável por 25% de todos os casos de DEG e ocorre em uma frequência de 1 caso em 100.000 nascimentos (Maichele *et al.*, 1996). Ela foi descrita pela primeira vez em uma criança que apresentava atividade diminuída de fosforilase, a qual se normalizava com o uso de fosforilase quinase exógena (Hug *et al.*, 1966). Nesta deficiência os pacientes apresentam hepatomegalia benigna e sinais clínicos pouco evidentes. Dentre eles citam-se discreta fraqueza muscular, hipoglicemia de

jejum assintomática, retardo de crescimento na infância, com recuperação posterior (Calçado, 1996). Algumas manifestações associadas são também citadas, tais como sinais hemorrágicos e de desmineralização óssea (Baussan, 1986). A hiperlipemia é freqüente, com alteração nos níveis de colesterol e triglicérides, e, em alguns pacientes, a única anormalidade bioquímica citada foi uma elevação na atividade da aspartato aminotransferase (Maire *et al.*, 1991). A ausência de anormalidades bioquímicas é relatada com freqüência nesta deficiência, como também, a ausência de modificações no estilo de vida do paciente (Schimke *et al.*, 1973).

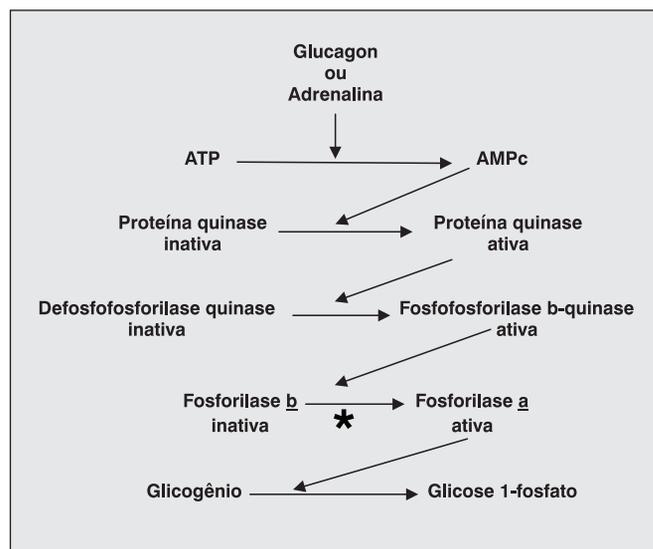


FIG. 1 - Sistema de ativação da fosforilase. (*Reação catalisada pela fosforilase b-quinase)

Recebido em 24/9/2000

Aprovado em 22/11/2001

*Trabalho desenvolvido no Lab. de Bioq. Clínica do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG - Apoio: FAPEMIG, CNPq

¹Professora Adjunta de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

²Bolsista de Iniciação Científica (BIC/CNPq)

Entretanto, alguns casos foram descritos com manifestações clínicas e bioquímicas pronunciadas, tais como cetose e hiperlipemia acentuada (Tuchman *et al.*, 1986), problemas renais associados a uma acidose tubular proximal (Nagai *et al.*, 1988), deficiência de fator XI, fator Hageman da coagulação sanguínea (Soldier *et al.*, 1995), hipoglicemia recorrente (Ficicioglu *et al.*, 1996), elevação de aminotransferases com cirrose progressiva (Kagalwalla *et al.*, 1995) e fibrose hepática (Van Beurden *et al.*, 1997).

Existem duas formas de transmissão desta deficiência, o que permite a sua classificação em sub-tipos (Bashan *et al.*, 1987): herança autossômica recessiva e herança ligada ao sexo (*X-linked*). Na transmissão autossômica recessiva são descritas deficiências enzimáticas no fígado, no fígado e músculos, somente nos músculos e no fígado e rins. A transmissão "*X-linked*" é a forma mais comum de transmissão e a deficiência enzimática ocorre somente no fígado. Apenas um paciente com deficiência enzimática cardíaca foi descrito (Servidei *et al.*, 1988).

Estes tipos de transmissão são compatíveis com a estrutura heteropolimérica da fosforilase b-quinase (Taira *et al.*, 1982). Esta proteína multimérica é formada por quatro subunidades, alfa, beta, gama e delta. As quatro subunidades são codificadas por diferentes cromossomos. Os genes que codificam para as subunidades alfa, beta e gama estão localizados, respectivamente, nos cromossomos X, 16 e 17 (Van Den Bergh & Berger, 1990). A subunidade delta é uma calmodulina e confere, à enzima, sensibilidade ao cálcio (Nadeau *et al.*, 1997). A heterogeneidade na apresentação da deficiência em fosforilase b-quinase pode ser explicada pela complexidade na estrutura da enzima e pela diversidade de isoformas apresentadas pela mesma.

A atividade da fosforilase b-quinase foi determinada através da medida da atividade da fosforilase a, liberada após a ação da fosforilase b-quinase, de acordo com a reação catalisada pela mesma:



Para uma correta determinação da atividade da fosforilase b-quinase é necessário que a fosforilase b, adquirida do comércio e que atua como substrato da reação enzimática esteja numa atividade de 7,5 unidades (Lederer *et al.*, 1975). Em uma primeira etapa faz-se a determinação da atividade desta enzima, após reconstituição do liofilizado.

A determinação da atividade da fosforilase b-quinase se processa em três tempos (Tabela I):

- 1) Ativação da fosforilase b em fosforilase a, em pH 6,8 e em presença de ATP e de magnésio, pela ação da fosforilase b-quinase;
- 2) Determinação da atividade da fosforilase a formada;
- 3) Dosagem do fósforo inorgânico liberado.

A reação colorimétrica corresponde a formação de um complexo fosfomolibdico, de cor azul, após a adição de molibdato de amônio e sulfonato de aminonaf-tol (Fiske & Subbarow, 1925). A leitura espectrofotométrica é feita em 660nm.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

A determinação da atividade foi feita em sangue total, colhido sob heparina.

Reagentes

a) Reagentes para a medida da atividade da fosforilase b do comércio:

a-1) Substrato de glicose 1-fosfato 24mmol/L pH 6,1: dissolver em 8mL de água destilada 150,5mg de glicose 1-fosfato de sódio (Boehringer Mannheim, 105.279), 21mg de NaF (Sigma, S6521) e 57mg de glicogênio (Sigma, G8876). Acertar o pH para 6,1, com algumas gotas de HCl 1N. Completar para 10mL com água destilada. Conservar a -20°C.

a-2) Solução estoque de fosforilase b: dissolver extemporaneamente 11 mg de fosforilase b liofilizada (Sigma, P6635) em 0,2mL de água destilada fria. Homogeneizar bem no vortex. Guardar no gelo até o momento de uso.

a-3) AMP 5 mmol/L: dissolver extemporaneamente 12,5 mg de AMP dissódico (Sigma, A1877) em 5mL de água destilada fria. Homogeneizar bem no vortex. Guardar no gelo até o momento de uso.

a-4) Ácido tricloroacético a 10% (p/v): pesar 10g de ácido tricloroacético (Sigma, T6399) e diluir para 100mL com água destilada. Conservar a 4°C.

b) Reagentes para a medida da atividade da fosforilase b-quinase:

b-1) Tampão Tris-glicerofosfato de sódio 150mol/L pH 6,8: dissolver em 80mL de água destilada 1,8g de Tampão Tris (Sigma, T1503) e 4,6g de b-glicerofosfato de sódio (Sigma, G6251). Ajustar o pH a 6,8 com HCl 1N. Completar o volume para 100mL. Conservar a -20°C.

b-2) Acetato de magnésio 75mmol/L: dissolver extemporaneamente 16mg de acetato de magnésio (Sigma, M9147) em 1mL de água destilada. Homogeneizar bem no vortex. Guardar no gelo até o momento de uso.

b-3) ATP 90 mmol/L: dissolver extemporaneamente 54,4mg de ATP dissódico (Sigma, A5394) em 1mL de água destilada. Homogeneizar bem no vortex. Guardar no gelo até o momento de uso.

b-4) Solução de EDTA 5mmol/L e NaF 0,1mol/L: dissolver em volume apropriado de água destilada 186mg de EDTA dissódico (Grupo Química, A-25) e 420mg de NaF. Homogeneizar. Completar o volume para 100mL com água destilada. Conservar a -20°C.

b-5) Solução estoque de fosforilase b: já preparada no item a-2.

b-6) Ácido tricloroacético a 10% (p/v): pesar 10g de ácido tricloroacético (Sigma, T6399) e diluir para 100mL com água destilada. Conservar a 4°C.

TABELA I
Condições de incubação para a determinação da atividade da fosforilase b-quinase eritrocitária

Ativação da fosforilase b	
Hemolisado diluído a 1/3	0,05mL
Reagente de ativação	0,10mL
Temperatura de incubação	30°C
Duração da incubação	30 minutos
Fração do meio da reação	0,01mL
Mistura EDTA-NAF	0,20mL
Determinação da atividade da fosforilase a	
Fração do meio da reação	0,05mL
Reagente para fosforilase a	0,2mL
Temperatura de incubação	30°C
Duração da incubação	30 minutos
Final da reação	ácido tricloroacético: 0,25mL Água destilada: 1,65mL
Centrifugação	3000 rpm/ 5 minutos
Dosagem do fósforo inorgânico liberado	
Volume de reação	2,500ml
Alíquota do sobrenadante	2,150ml
Reagente molibdíco sulfúrico	0,250ml
Reagente aminonaftolsulfônico	0,100ml
Temperatura da reação	25°C
Incubação na obscuridade	10 minutos
Leitura espectrofotométrica	660 nm

c) Reagentes para a dosagem do fósforo (Fiske & Subbarow, 1925):

c-1) Reagente molibdíco-sulfúrico (MOS): dissolver 2,5g de Molibdato de amônio (Sigma, A7302) e 4,2mL de ácido sulfúrico concentrado em 100mL de água destilada. Homogeneizar. Conservar a temperatura ambiente por um mês.

c-2) Reagente aminonaftolsulfônico (ANS): dissolver 14,6 g de metabissulfito de sódio (Sigma, S1516) e 0,5 g de sulfito de sódio (Sigma, S0505) em 100mL de água destilada. Homogeneizar até dissolução. Adicionar 100mg de ácido aminonaftol sulfônico (Sigma, A0505). Agitar até dissolução completa. Conservar a temperatura ambiente por um mês.

c-3) Padrão estoque de fósforo 50mmol/L: dissolver 680,4mg de fosfato monopotássico anidro (KH₂PO₄) em 100mL de ácido sulfúrico 0,5N. Conservar a temperatura ambiente por três meses.

c-4) Padrão de uso de fósforo 1mmol/L: diluir o padrão estoque a 1:50, em água destilada. Preparar no momento de uso.

MÉTODOS

a) Preparação do material biológico

Logo após a coleta o sangue foi colocado no gelo, até o momento de processamento. Para processar, cen-

trifugar o tubo de sangue coletado a 3000 rpm, durante 5 minutos, a 5°C. Eliminar o soro e a primeira camada de hemácias que contém glóbulos brancos. Adicionar o mesmo volume de NaCl a 154mmol/L, frio. Centrifugar a 3000rpm, durante 5 minutos, a 5°C. Eliminar o sobrenadante e adicionar o mesmo volume de NaCl a 154mmol/L, frio, homogeneizar e centrifugar novamente a 3000 rpm, durante 5 minutos, a 5°C. Lavar as hemácias mais duas vezes, como indicado. O sangue lavado pode ser conservado a -20°C, por no máximo 48 horas. Antes da dosagem adicionar ao lavado de hemácias 2 volumes de água destilada fria e homogeneizar bem no vortex, para lisar as hemácias. Se a determinação da atividade for executada no mesmo dia da coleta, congelar e descongelar a amostra, para facilitar a hemólise.

b) Dosagem de hemoglobina

Realizada em duplicata utilizando-se o aparelho automatizado Coulter-T890.

c) Medida da atividade da fosforilase b

- Diluir a solução estoque de fosforilase b (a-2) a 1:600 e a 1:1200
- Fazer as dosagens em duplicata
- Em tubos de 5mL distribuir:

Reagentes	Branco G1P	Reação
AMP 5 mmol/L (a-3)	50mL	50µL
Subtrato glicose 1-fosfato (a-1)	150mL	150µL
Fosforilase b diluída (1:600 e 1:1200)	-	50µL
Água destilada	50mL	-

- Incubar 10 minutos a 30°C
- Parar a reação pela adição de ácido tricloroacético (a-4) a 10%, frio
- Adicionar 1,65mL de água destilada
- Centrifugar a 3000 rpm / 5 minutos / 20°C
- Fazer a dosagem do fósforo liberado na totalidade do sobrenadante

d) Dosagem do fósforo inorgânico

Reagentes	Branco reativo (1 mmol/L)	Padrão de uso de fósforo	Branco G1P	Reação
Sobrenadante da 1ª reação	-	-	total	total
Padrão de uso de fósforo (c-4)	-	0,25mL	-	-
Água destilada	2,15mL	1,90mL	-	-
MOS (c-1)	0,25mL	0,25mL	0,25mL	0,25mL
ANS (c-2)	0,1mL	0,1mL	0,1mL	0,1mL

- Homogeneizar
- Aguardar no escuro por 10 minutos
- Ler em 660nm contra o branco reativo.

e) Medida da atividade da fosforilase b-quinase

- Fazer as dosagens em duplicata
- Em tubos de 5mL pipetar:

Reagentes	Branco Fosforilase b	Reação
Tampão Tris-glicerofosfato (b-1)	50mL	50mL
ATP 90mmol/L (b-3)	10mL	10mL
Acetato de Magnésio 75mol/L (b-2)	20mL	20mL
Fosforilase b (a-2)	20mL	20mL
Água destilada	50mL	-
Hemolisado	-	50mL

- Incubar a 30°C
- Após 30 minutos, pipetar 10mL da mistura e colocar em 200mL de solução de EDTA 5mmol/L e NaF 0,1mol/L (b-4), fria.
- Medir a atividade da fosforilase a formada em 50mL desta mistura final.

f) Medida da atividade da fosforilase a formada

Reagentes	Volume
Substrato de glicose 1-fosfato (a-1)	150mL
Água destilada	50mL
Mistura anterior (item e)	50mL

- Incubar a 30°C, durante 30 minutos
- Parar a reação pela adição de 0,25mL de ácido tricloroacético a 10% (a-4), frio
- Adicionar 1,65mL de água destilada
- Centrifugar a 3000rpm/ 5 minutos/ 20°C
- Dosar o fósforo na totalidade do sobrenadante, de acordo com o item d).

Cálculos

a) Medida da atividade da fosforilase b:

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{0,25 \times (\text{Abs. reação} - \text{Abs. branco}) \times \text{Fator de diluição}}{\text{Abs. padrão} \times \text{Volume de amostra}}$$

b) Cálculo da diluição da solução de fosforilase b para se ter 7,5 Unidades nos 20mL utilizados na reação de ativação:

$$\text{Diluição} = \frac{\text{Atividade } (\mu\text{mol/min/mL}) \times 0,02}{7,5}$$

c) Cálculo da atividade da fosforilase a:

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol/min./g de Hemoglobina}) = \frac{0,25 \times (\text{Abs. reação} - \text{Abs. branco}) \times 100 \times 63}{\text{Abs. padrão} \times \text{tempo(min.)} \times \text{Hb(g/L)} \times \text{Volume de amostra(mL)}}$$

d) Cálculo da atividade da fosforilase b-quinase:

$$\text{Atividade (U/g de Hemoglobina)} = \frac{\text{Atividade } (\mu\text{mol/min/g de Hemoglobina})}{\text{Tempo de ativação}}$$

A atividade da fosforilase é obtida através da definição da atividade enzimática que corresponde à quantidade da enzima que libera 1 micromol de fósforo por minuto. Esta atividade é expressa em U/por grama de hemoglobina.

RESULTADOS

Dosagem de hemoglobina

Os valores de hemoglobina encontrados nas várias dosagens efetuadas nos hemolisados recém-preparados variaram de $4,8 \pm 1,5\text{g/dL}$.

Determinação da atividade da fosforilase b do comércio

A Tabela II mostra a atividade da fosforilase b do comércio, medida antes da determinação da atividade da fosforilase b-quinase.

TABELA II
Atividade da fosforilase b do comércio

Determinação	Atividade (mmol/mL)	Determinação	Atividade
1	74,4	8	0,0
2	34,9	9	461,9
3	141,7	10	489
4	114,7	11	631
5	428,5	12	0,0
6	359,4	13	0,0
7	0,0	-	-

Determinação da atividade da fosforilase b-quinase

A Tabela III mostra o resultado da atividade de 20 determinações realizadas.

TABELA III
Atividade da fosforilase b-quinase

Determinação	Atividade (U/g de hemoglobina)	Determinação	Atividade (U/g de hemoglobina)
1	4,8	11	2,0
2	3,7	12	3,3
3	3,8	13	3,9
4	5,0	14	2,6
5	4,8	15	3,8
6	6,8	16	6,3
7	6,6	17	5,2
8	6,8	18	4,9
9	2,1	19	4,9
10	2,1	20	5,0
			$\Sigma = 88,4$ Média = 4,4 U/g de hemoglobina

Determinação da atividade da fosforilase b-quinase em vários tempos de incubação

Esta variável foi executada para se determinar a linearidade do método, de acordo com o tempo de incubação e está demonstrada na Tabela IV.

TABELA IV
Linearidade do método

Experiência	Tempo de incubação	Atividade (U/g de hemoglobina) Sem considerar tempo de incubação	Atividade (U/g de hemoglobina) Considerando o tempo de incubação
Experiência 1	10 minutos	67,6	6,76
	20 minutos	135,2	6,76
	30 minutos	196,6	6,55
Experiência 2	10 minutos	21,2	2,12
	20 minutos	42,8	2,14
	30 minutos	58,9	1,96

Estabilidade da enzima no material biológico

A estabilidade da atividade enzimática nas hemácias lavadas foi testada e observou-se uma perda da atividade, após uma semana de conservação do material a -20°C , como demonstrado na Tabela V.

TABELA V
Estabilidade da fosforilase b-quinase no lavado de hemácias conservado a -20°C

Dia	Atividade (U/g de hemoglobina)
1	6,8
7	0,5

DISCUSSÃO

A determinação da atividade da fosforilase b-quinase pelo método estudado exigiu várias etapas de procedimento. Na primeira etapa padronizou-se a obtenção do material biológico e o processamento do mesmo. O sangue total foi colhido com heparina, já que este anticoagulante natural não interfere na atividade enzimática (Baussan *et al.*, 1981). O processamento da lavagem de hemácias foi feito como descrito na literatura (Baussan *et al.*, 1981). A lise das hemácias foi feita com água destilada e testada também a lise através de ultra-som. Este último procedimento não foi utilizado porque, em uma experiência executada não foi obtida atividade enzimática; o ultra-som pode ter alterado a estrutura primária da enzima e ocasionado, portanto, a perda da atividade da mesma. O processamento da amostra biológica foi executado de acordo com a descrição no item Material e Métodos. Como demonstrado, na Tabela V, a enzima perde atividade no material biológico conservado a -20°C , portanto todas as determinações foram executadas no dia da coleta do material biológico.

A metodologia estudada considerou que a atividade da fosforilase b ideal para a medida da atividade da

fosforilase b-quinase fosse de 7,5 Unidades (Lederer *et al.*, 1975). Para cada determinação a atividade desta enzima foi avaliada. A enzima foi adquirida do comércio (Sigma- P6635) e observou-se que ela é extremamente instável, em termos de conservação. Pela Tabela II apresentada observa-se a variação da atividade da enzima em várias determinações. Este fato fez com que, várias amostras fossem descartadas devido a uma perda total de atividade. Isto pode ser explicado pela conservação da enzima durante o transporte desde a sua compra, envio ao Brasil, tempo de espera no aeroporto, etc. Ela deveria ter sido conservada em gelo seco. Portanto, perdeu-se muitas amostras e experimentos devido à ausência de atividade enzimática. Este fato pode ter influenciado os resultados posteriores encontrados nos experimentos realizados.

A determinação da atividade da fosforilase b-quinase foi realizada levando-se em consideração vários fatores. O tampão de escolha foi o tampão Tris-b-glicerofosfato em pH 6,8, indicado pela maioria dos autores. Esta condição permite a manutenção do pH em condições para a ação da enzima fosforilada. A concentração de b-glicerofosfato a 50mol/L inibe a forma inativa e a defosforilação da forma ativa (Baussan, 1986). O complexo [ATP-Mg], que funciona como doador do grupo fosfato, deve estar presente em excesso na solução. Portanto as concentrações utilizadas foram: de ATP, 6 mmol/L e de acetato de magnésio, 10 mmol/L. O tempo de incubação foi testado e demonstrou-se, pela Tabela IV, que a reação foi linear até 30 minutos. Este tempo foi escolhido para as determinações posteriores, porque obteve-se uma atividade mais elevada, com leituras espectrofotométrica numa faixa de mais alta sensibilidade. A reação foi paralisada pela adição de uma mistura reativa que permitisse a determinação subsequente da fosforilase a. Esta mistura reativa (EDTA-NaF) tem a vantagem de inibir a fosforilase quinase e a fosforilase fosfatase (Baussan, 1986). A determinação da atividade da fosforilase a foi feita de acordo com método descrito anteriormente, pela mesma equipe da Faculdade de Farmácia da UFMG (Takahashi *et al.*, 1999).

Os resultados encontrados para a determinação da atividade da fosforilase b-quinase em todas as determinações realizadas, como descrito na Tabela III, com uma média de 4,4 U/g de hemoglobina, estão abaixo daqueles citados na literatura, 8,0 a 18,0 U/g de hemoglobina (Baussan, 1986) e $14,6 \pm 4,6$ U/g de hemoglobina (Centre de Maladies Métaboliques, Hôpital Debrousse). Isto pode ser explicado pelas diferentes condições de trabalho experimental, levando-se em consideração a atividade da fosforilase adquirida. Como explicado anteriormente, nos experimentos realizados a atividade da fosforilase b do comércio sempre se manteve abaixo da ideal. A atividade desta enzima deveria estar em 7,5 unidades nas condições de incubação para a determinação da fosforilase b-quinase. Ela sempre esteve em atividade mais reduzida do que esta, devido a ser uma enzima instável que exige condições de conservação que, provavelmente não foram obedecidas. Entretanto, encontrou-se uma

atividade mensurável da fosforilase b-quinase em todos os experimentos realizados.

Não foi possível a obtenção de material biológico de pacientes suspeitos de Glicogenose tipo IX, devido, provavelmente, à raridade da doença.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), respectivamente, pelas bolsas e pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. **Bashan, N.; Potashnik, O.; Erlich, T.; Moses, S.** Phosphorylase kinase in leukocytes and erythrocytes of a patient with glycogen storage type IX. *J. Inher. Metab. Dis.*, v.10, p.119-127, 1987.
2. **Baussan-Valette, C.** *Diagnostic enzymatique et surveillance biochimique des glycoséoses hépatiques.* Thèse pour Docteur Es-Sciences Pharmaceutiques (Diplôme d'Etat). Université Paris-Sud. 1986.
3. **Baussan, C.; Moatti, N.; Odievre, M.; Lemonnier, A.** Liver glycogenosis caused by a defective phosphorylase system: hemolysate analyses. *Pediatrics*. v. 67, p.107-112, 1981.
4. **Calçado, A. C.** Glicogenoses hepáticas. In: **Penna, F. J.; Mota, J. A. C.; Roquete, M. L. V.; Ottoni, C. M. C.** *Doenças do fígado e das vias biliares na infância.* Rio de Janeiro, MEDSI, p.149-188. 1996.
5. **Cori, G. T.** Biochemical aspects of glycogen deposition disease. *Mod. Probl. Paediatr.* v.3, p.344, 1958.
6. **Ficioglu, C.; Aydin, A.; Mikla, S.; Cam, H.; Shin, Y.** Neonatal-onset severe recurrent hypoglycaemia in an infant with hepatic phosphorylase kinase deficiency with normal enzyme activity in erythrocytes. *J. Inher. Metab. Dis.* v.19, p.84-85, 1996.
7. **Fiske C. H.; Subbarow, Y.** The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* v.66, p.375-400, 1925.
8. **Hendrickx, J.; Coucke, P.; Bossuyt, P.; Wauters, J.; Raeymaekers, P.; Marchau, F.; Smit, G. P.; Stolte, I.; Sardharwalla, I. B.; Berthelot, J. et al.** X-linked liver glycogenosis: localization and isolation of a candidate gene. *Hum. Mol. Genet.* v.2, p.583-589, 1993.
9. **Howell, R. R.; William, J. C.** The glycogen storage diseases. In: **Stanbury, J. B.; Wyngaarden, J. B.; Fredrickson, D. S.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.** *The metabolic basis of inherited disease.* Philadelphia, Mc Graw Hill Book Company, 5ª edição, p.141-166. 1983.
10. **Hug, G.; Schubert, W. K.; Chuck, G.** Phosphorylase kinase of the liver: deficiency in a girl with increased hepatic glycogen. *Science.* v.153, p.1534-1536, 1966.
11. **Kagalwalla, A. F.; Kagalwalla, I. A.; Al-Ajaji, S.; Gorka, W.; Ali, M. A.** Phosphorylase b kinase deficiency glycogenosis with cirrhosis of the liver. *J. Pediatr.* v.127, p.602-605, 1995.
12. **Lederer, B.; Van Hoof, F.; Van Den Berghe, G.; Hers, H. G.** Glycogen phosphorylase and its converter enzymes in haemolysates of normal human subjects and of patients with type IX glycogen storage disease. *Biochem J.* v.147, p.23-25, 1975.
13. **Maire, I.; Baussan, C.; Moatti, N.; Mathieu, M.; Lemonnier, A.** Biochemical diagnosis of hepatic glycogen storage diseases: 20 years French experience. *Clin. Biochem.* v.24, p.168-178, 1991.
14. **Nadeau, O. W.; Sacks, D. B.; Carlson, G. M.** The structural effects of endogenous and exogenous Ca²⁺/calmodulin on phosphorylase kinase. *J. Biol. Chem.* v.272, p.26202-26209, 1997.
15. **Nagai, T.; Matsuo, N.; Tsuchiya, Y. et al.** Proximal renal tubular acidosis associated with glycogen storage disease type IX. *Acta Paediatr. Scand.* v.77, p.460-460, 1988.
16. **Schimke, R. N.; Zakheim, R. M.; Corder, R. C.; Hug, G.** Glycogen storage disease type IX: Benigne glycogenosis of the liver and hepatic phosphorylase kinase deficiency. *J. Pediatr.* v.83, p.1031-1031, 1973.
17. **Servidei, S.; Metlay, L.; Chodosh, J.; Di Mauro, S.** Fatal infantile cardiopathy caused by phosphorylase kinase deficiency. *J. Pediatr.* v.113, p.82-85, 1988.
18. **Solder, B.; Pechlaner, C.; Sperl, W.; Skladal, D.; Kunz, F.; Shin, Y. S.** Factor XI and phosphorylase b kinase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* v.18, p.89-90, 1995.
19. **Taira, T.; Kii, R.; Sakai, K.; Tabuchi, H. et al.** Comparison of glycogen phosphorylase kinase of various rat tissues. *J. Biochem.* v.91, p.883-888, 1982.
20. **Takahashi, H. I.; Roquete, M. L. V.; Ottoni, C. M. C.; Penna, F. J.; Baptista, J. M. A.** Determinação da atividade da fosforilase do glicogênio para o diagnóstico de doenças de estocagem do glicogênio. *Rev. Bras. Anal. Clin.* v.31, p.63-68, 1999.
21. **Tuchman, M.; Brown, B. I.; Burke, B. A.; Ulstrom, R. A.** Clinical and laboratory observations in a child with hepatic phosphorylase kinase deficiency. *Metabolism.* v.35, p.627-632, 1986.
22. **Van Beurden, E. A.; De Graaf, M.; Wendel, U.; Gitzelman, R.; Berger, R.; Van Den Berg, I. E.** Autosomal recessive phosphorylase kinase deficiency caused by a novel splice-site mutation in the gene encoding the liver gamma subunit (PHKG2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.236, p.544-548, 1997.
23. **Van Den Berg, I. E.; Berger, R.** Phosphorylase b kinase in man: a review. *J. Inher. Metab. Dis.* v.13, p.442-451, 1990.

Endereço para correspondência:

Prof^ª Dr^ª Jane Maciel Almeida Baptista

Faculdade de Farmácia da UFMG

Av. Olegário Maciel, 2360 - Belo Horizonte, MG - 30180-112

Tel. (0xx31)333-97621 - Fax: (0xx31)3339-7666

E-mail: janebap@farmacia.ufmg.br

Tema livre: procedimentos seletivos

O tema livre é uma das atividades do Programa Científico do XXIX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas que será realizado em Fortaleza, de 26 a 30 de maio de 2002, sob a forma de painel apresentado durante o evento.

Para participar é necessário que se envie o resumo de seu tema livre, em formulário próprio, padronizado, para ser submetido à aprovação da Comissão de Temas Livres do Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Essa comissão, nomeada pelo Presidente do Congresso de Análises Clínicas é constituída por sócios da SBAC, possuidores do Título de Especialista em Análises Clínicas e tem por finalidade aprovar - ou recusar - classificar dentro da especialidade, agendar a data e a hora da apresentação e operacionalizar a apresentação do painel durante o Congresso.

Saiba mais sobre estes procedimentos, acessando:

www.cbac.org.br

Exame do líquido sinovial nos laboratórios do estado de Santa Catarina

Synovial liquid examination in the state of Santa Catarina

P. Haas*, K. Thiesen* & L. C. Vituri*

RESUMO – Existem numerosos métodos para estudar o líquido sinovial. Com o objetivo de avaliar o perfil metodológico do exame do líquido sinovial no Estado de Santa Catarina, enviamos questionários para os laboratórios das maiores cidades do Estado. Os que realizam essa análise em suas rotinas responderam aos questionários quanto às análises citológicas, bioquímicas, microbiológicas, imunológicas. Observamos que nas análises citológicas, bioquímicas e imunológicas há uma heterogeneidade nos protocolos, provavelmente, estas vem sendo adaptadas de acordo com as condições do serviço e do paciente atendido. Nas análises microbiológicas, observou-se uma homogeneidade nesses protocolos.

PALAVRAS-CHAVE – Líquido sinovial.

SUMMARY – There are numerous methods that can be used to study the synovial liquid. With the objective of evaluating the methodological profile of the synovial liquid examinations in the state of Santa Catarina, questionnaires were sent to the laboratories in largest cities in the State. The laboratories that perform this analysis in their routines answered the questionnaire regarding the cytological, biochemical, microbiological and immunological analysis. It was observed that in the cytological, biochemical and immunological analysis there was dissimilarity in protocols, which was probably due to an adaptation of the analysis according to the service and the patient attend, while in the microbiological analysis, an equivalency in protocols was observed.

KEYWORDS – Synovial liquid.

INTRODUÇÃO

A articulação é o encaixe de dois ossos, permitindo com isso a realização de movimentos. É um local extremamente sensível que fica protegido por um bolsa chamada de cápsula sinovial. O espaço formado por essa cápsula recebe o nome de cavidade articular. Essa cavidade é preenchida com um líquido viscoso denominado de líquido sinovial⁴. Essas cápsulas, articulares ou fibrosas, são formadas pela membrana sinovial ou tecido sinovial, sendo este constituído de uma camada íntima ou parte celular (sinovócitos) que é responsável pela síntese do ácido hialurônico, fagocitose, pinocitose e fibrogênese; uma camada subíntima formada pelo plexo vascular e linfático, que transfere os constituintes do sangue para o líquido sinovial; além de uma camada de tecido subsinovial rica em colágeno¹.

O líquido sinovial é formado por um ultrafiltrado plasmático acrescido de um mucopolissacarídeo denominado ácido hialurônico ou hialuronato^{1,3,7,9,11}, de uma pequena quantidade de proteínas (cerca de um terço da concentração sanguínea)^{1,9}, íons pequenos e moléculas como glicose, uréia, ácido úrico, entre outros, os quais atravessam facilmente até o espaço articular, daí as semelhanças constitucionais com o plasma^{1,3,9,11}. O fibrinogênio bem como outros fatores de coagulação

estão ausentes no líquido sinovial¹. A presença do hialuronato diferencia o fluido sinovial dos outros fluidos corpóreos⁹, além de fornecer a viscosidade normal do fluido sinovial^{1,9}. Este fluido tem ainda como função: lubrificar as articulações impedindo o desgaste das cartilagens pelo atrito constante; amortecer choques diminuindo o impacto sobre as articulações; nutrir as cartilagens e serve também como fluido de limpeza¹. Em situações normais é encontrado em quantidade inferior a 3,5 ml na articulação do joelho, sendo esta uma das principais articulações de escolha para realização da aspiração da amostra, embora a coleta possa ser feita em qualquer articulação. O procedimento de coleta é chamado de artrocentese¹¹. A amostra geralmente é coletada em caso de derrames articulares, onde há um aumento do volume de líquido sinovial nas articulações, podendo atingir até 20ml⁹.

Em condições patológicas, doenças articulares (artrites), as alterações devem-se à variações da permeabilidade a nível de membrana sinovial e capilares. Essas variações podem ser decorrentes de alterações imunológicas, mecânicas, químicas, bacteriológicas, pela presença de células e cristais⁹. O exame do líquido sinovial é um elemento de valor no diagnóstico das afecções reumáticas⁷. Essas alterações produzem diferentes graus de respostas inflamatórias⁹, sendo desta for-

Recebido em 17/5/2000

Aprovado em 14/2/2001

*Departamento de Análises Clínicas – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

ma dividas em: grau I – não inflamatório; grau II – inflamatório; grau III – séptico ou infeccioso; grau IV – induzido por cristais; grau V – hemorrágico^{7, 11}.

Os protocolos de rotina da análise do líquido sinovial incluem cuidados que vão desde o acondicionamento da amostra, aspectos físico-químicos, exames citológicos, bioquímicos, microbiológicos e imunológicos, tendo também, como possibilidade para avaliação, provas complementares, as quais possuem uma variabilidade das técnicas entre os laboratórios^{1,3,6,7,8,9,11}. Observamos que nas análises citológicas, bioquímicas e imunológicas de amostras de líquido sinovial não há uma homogeneidade nos protocolos entre os laboratórios. Já com relação as análises microbiológicas o que se observa é uma grande homogeneidade nos levantamentos feitos sobre as rotinas dos laboratórios no estado de Santa Catarina.

OBJETIVOS

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

MATERIAIS 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** - cor e aspecto.
- **Citológicas** - citologia global, citologia diferencial, pesquisa de células LE.
- **Bioquímicas** - dosagem de glicose, pesquisa de cristais.
- **Microbiológicas** - bacteroscopia e cultura.
- **Imunológicas** - pesquisa de fator reumatóide.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da metodologia utilizada na análise do líquido sinovial 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 correspondên-

cia 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 sinovial é pequena em relação a outros exames realizados em líquidos corpóreos como por exemplo o líquido cefaloraquidiano (líquor).

Dos laboratórios que responderam ao questionário pode-se analisar que há uma variação entre as formas de acondicionamento da amostra biológica. O anticoagulante utilizado para análises citológicas é a heparina em 23,1% dos laboratórios; o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) em 15,4%; não responderam a pergunta 61,5% dos laboratórios. Quanto ao anticoagulante utilizado para análises bioquímicas: a heparina é utilizada por 15,4% dos laboratórios; utilizado heparina ou separação natural em 7,7%; não responderam 76,9%. Quanto ao anticoagulante utilizado para pesquisa de cristais, a heparina é utilizada por 23,1% dos laboratórios e 76,9% não responderam. Segundo a literatura, para a realização da artrocentese, é recomendada a coleta da amostra em três tubos diferentes preferencialmente, onde a utilização de anticoagulantes é recomendada apenas para as amostras que forem coletadas para a análise microbiológica e para a avaliação microscópica da amostra, já a amostra que seguir para as avaliações bioquímicas e imunológicas, o recomendado é que não se utilize anticoagulante (o líquido sinovial normal não coagula), pois a porção celular pode interferir nas análises pela lise celular^{3,7,9,11}. O anticoagulante de escolha, preferencialmente deve ser os na forma líquida, como heparina sódica e o EDTA líquido, já o EDTA em pó, a heparina lítio, o oxalato de cálcio, devem ser evitados, pois eles podem formar estruturas cristalinas que em algumas situações podem provocar confusão durante o exame pela sua semelhança com o urato monossódico^{1,3,7,9,11}, principalmente em casos onde o volume da amostra é pequeno, devido ao excesso de anticoagulante⁹, também, porque seus cristais são fagocitados pelos leucócitos¹.

Com relação às avaliações físico-químicas pode-se verificar que há uma ligeira variação entre os laboratórios que as realizam. O aspecto é caracterizado em 92,3%, não responderam 7,7% dos laboratórios. O aspecto do líquido sinovial é uma característica importante pois auxilia na classificação da amostra, dentro dos diferentes graus de resposta inflamatória. O fluido normal é viscoso e transparente, semelhante a clara de ovo⁹. As alterações nesse fluido estão relacionadas com o número e o tipo de partículas presentes³, os leucócitos são os principais responsáveis por essas alterações, embora quantidades maciças de cristais possam tornar o líquido leitoso e opaco sem a presença de leucócitos³. Em amostras com aspecto opaco e brilhante há sugestão da presença de um grande número de cristais de colesterol podendo apresentar semelhanças com o material purulento³. Alterações no aspecto são menos frequentes quando ocorre um aumento na concentração de fibrina (observam-se "corpos de arroz" fluando), e partículas de metal ou plástico em pacien-

tes com próteses articulares ou mesmo pedaços de cartilagem em pacientes com osteoartrites³. Se for observado ainda presença de pigmentos semelhantes a "pimenta moída" pode ser resultante da presença de fragmentos cartilaginosos pigmentados, que é um indicio de ocronose³. A cor é avaliada em 92,3% dos laboratórios e 7,7% não responderam, sendo este outro parâmetro importante na análise e classificação do líquido sinovial. A coloração normal desse fluido biológico é amarelo-pálido (decorrente da diapedese de alguns eritrócitos associados a casos onde houve um traumatismo discreto³). A coloração do líquido sinovial varia com o tipo de resposta inflamatória produzida, da seguinte maneira: os distúrbios articulares do tipo não inflamatório geralmente não provocam alteração na cor^{3,9}; os inflamatórios produzem uma coloração amarelo-palha^{3,9}; os infecciosos tem sua coloração ligada ao cromogênio produzido pelo organismo agressor e a resposta do indivíduo, podendo variar desde o amarelo, marrom ou até mesmo verde^{3,9}; já nos induzidos por cristais a coloração geralmente é branco opaca e ocasionalmente verde⁹; nos hemorrágicos deve-se ter um cuidado especial já que a coloração pode ser decorrente de um acidente de punção, sendo esse um risco para a emissão de resultados falsos já que a coloração pode estar associada ao acidente de punção e não a processos hemorrágicos⁶. Em casos de acidente de punção a coloração é desigual durante a artrocentese mas, para se certificar de que não é um acidente de punção, pode-se analisar a coloração do líquido após centrifugação, se o sobrenadante tiver coloração vermelho escuro ou marrom escuro é uma boa evidência de hemartrose patológica, se a coloração for amarelo-claro é um possível indicativo de acidente de punção, por ser esta a cor do líquido normal^{3,9}. São realizados também avaliação de pH em 7,7% dos laboratórios, sendo que este varia de 7,3 à 7,8; a formação de coágulo é avaliada em 7,7% dos laboratórios. O líquido sinovial normal não coagula pela ausência de fibrinogênio e outros fatores de coagulação, porém em alguns casos especiais isso pode ocorrer como por exemplo: em processos inflamatórios, o que causam à exsudação não seletiva de proteínas de maior peso molecular, inclusive fibrinogênio¹.

Quanto às análises citológicas, observou-se que a citologia global é realizada através da contagem em câmara de Neubauer por 46,1% dos estabelecimentos, através da câmara de Fuchs-Rosenthal por 23,1% e 30,8% utilizam dois métodos diferentes, incluindo-se

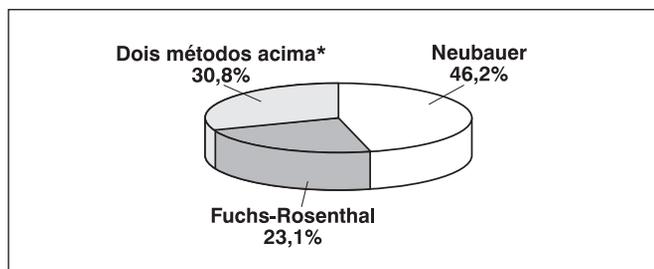


FIG. 1 - Métodos utilizados para contagem de células no líquido sinovial em Santa Catarina. *Incluído aqui a utilização de métodos automatizados juntamente com métodos manuais.

aqui contagem automatizada de células, porém estas estão em todos os casos associadas a contagens manuais (Figura 1). O líquido sinovial normal contém um número pequeno de leucócitos e a presença de hemácias é ausente⁹. A contagem de células deve ser realizada logo após a coleta da amostra, já que há uma perda celular (pela degeneração de leucócitos) 1 hora após a coleta, sendo que os valores encontrados na contagem são auxiliares na diferenciação dos vários graus de resposta inflamatória, porém é inespecífica para qualquer doença articular pela extensa sobreposição de resultados entre elas^{1,3,7,8,9,11,13}.

Para proceder a contagem das células é importante que a amostra seja homogeneizada para que o resultado seja confiável, a contagem pode ser realizada em um hematocítmetro padrão^{3,9,11}. Deve ser realizada a contagem de leucócitos e hemácias, sendo que esta última não deve ser considerada em casos de acidente de punção^{3,7}. Os contadores celulares automatizados podem ser utilizados mas, deve-se cuidar, pois a viscosidade do líquido pode obstruir o aparelho³, ou pode-se obter contagens falsamente elevadas pela presença de partículas não-leucocitárias (cristais, células teciduais e glóbulos gordurosos)^{3,11}. Em contagens leucocitárias acima de 50.000/ml deve-se proceder a diluição da amostra^{3,7,9,11}, o diluente normal de leucócitos (Turk) não pode ser utilizado, devido a presença de ácido acético na sua composição, o ácido acético presente, forma um coágulo de mucina pela complexação das proteínas com o ácido hialurônico, esse coágulo seqüestra células provocando resultados falsamente diminuídos^{3,11}. No lugar do Turk pode-se utilizar solução salina para promover a diluição^{3,7,9,11}.

A adição à salina de uma solução de azul de metileno pode facilitar a contagem, já que o azul de metileno promove a coloração do núcleo dos leucócitos o que auxilia na diferenciação entre os leucócitos e as hemácias^{3,7,9}. Há alguns casos em que o líquido sinovial encontra-se altamente viscoso, para impedir que isso dificulte a contagem deve-se incubar a amostra por 5 minutos com hialuronidase, para que esta promova a degradação do ácido hialurônico e com isso diminua a viscosidade^{3,7,9,11}. Já na citologia diferencial, é utilizado como método de concentração celular a centrifuga em 53,8%, através da câmara de Suta em 15,4%, através de citocentrífuga em 15,4%, são utilizados dois dos métodos de concentração celular acima em 15,4% dos estabelecimentos que participaram da pesquisa (Figura 2). A contagem de leucócitos é im-

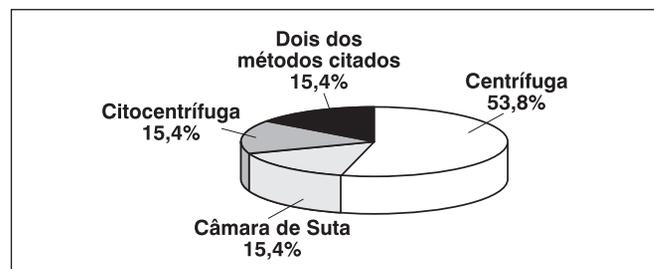


FIG. 2 - Métodos utilizados para concentração celular no estado de Santa Catarina.

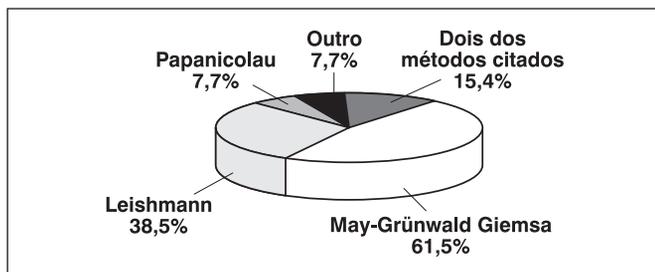


FIG. 3 - Métodos utilizados para coloração celular no estado de Santa Catarina. *Coloração por Gram.

portante na classificação do líquido sinovial como sendo de origem inflamatória, não inflamatória e infecciosa, baseado na porcentagem diferencial de leucócitos. As avaliações da morfologia das células devem ser observadas em no máximo 1 hora após a artrocentese, para evitar a degeneração e a distorção das células^{7,9}. Deve-se executar um método para a concentração celular, sem que ocorra deformação das mesmas⁹. A amostra pode requerer uma preparação prévia com hialuronidase em casos de amostras muito viscosas^{3,9}. As principais células constituintes do líquido sinovial normal são as mononucleares (monócitos, linfócitos, macrófagos), células do tecido sinovial (sem valor diagnóstico^{3,7,9}); os neutrófilos devem corresponder a menos de 25%^{3,11}. Pode-se observar ainda outras células anormais tais como células LE, ragócitos, além de neutrófilos com vacúolos contendo bactérias e cristais^{9,11}. A coloração das células é feita através dos seguintes corantes: Leishman em 38,5% dos laboratórios; May-Grünwald Giemsa em 61,5%; Papanicolau em 7,7%; através da coloração por Gram em 7,7%; são utilizados dois dos métodos acima em 15,4% dos laboratórios (Figura 3). Quanto à coloração para a leitura diferencial, a utilização do corante de Wright^{7,8,9,11} é a mais citada entre os autores; sendo sugerido também a possibilidade da leitura diferencial ser feita em esfregaços corados pelo Gram para que se possa identificar a presença de bactérias no mesmo⁸, uma outra forma descrita pela literatura é a diferenciação ser feita associada a contagem em câmara, utilizando o diluente azul de metileno^{9,11}. A pesquisa de células LE (lúpus eritematoso) é realizada por 76,9% dos estabelecimentos; e 23,1% não responderam. As células LE são formadas no líquido sinovial em casos de lúpus eritematoso sistêmico e em algumas artrites reumatóides^{1,7,8}. Em alguns pacientes, é possível se detectar a presença das células LE no líquido sinovial antes mesmo que elas apareçam no sangue periférico^{1,7}. Sua pesquisa é demonstrada na mesma extensão corada para a contagem diferencial de leucócitos⁸.

Nas avaliações bioquímicas do líquido sinovial, os laboratórios foram questionados nas suas análises de glicose, quanto a forma como é realizado esta prova. Foi observado que nos laboratórios que realizam este teste 76,9% deles o fazem através do método da oxidase; o método da hexoquinase é utilizado por 15,4% dos laboratórios; 7,7% dos laboratórios não responderam (Figura 4). Sendo o líquido sinovial um ultrafiltrado do plasma os valores das análises bioquímicas são semelhantes aos séricos (a diferença soro/líquido sinovial é inferior a 10mg/dl^{1,3,8,11}), daí a necessidade de

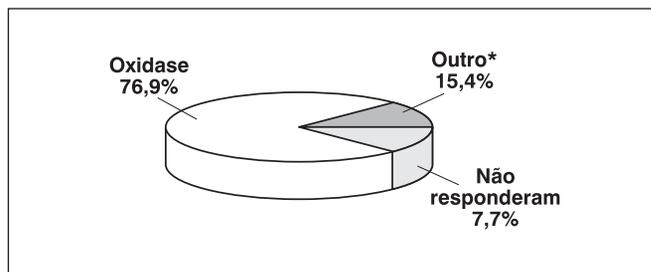


FIG. 4 - Método utilizado para dosagem de glicose no líquido sinovial em Santa Catarina. *Utilizam o método da Hexoquinase.

uma comparação dos seus valores com os valores séricos³; por esse razão deve-se coletar amostras simultâneas de sangue e líquido sinovial, de preferência após um jejum de 8 horas para permitir um equilíbrio entre os dois^{3,7}. São poucas as análises bioquímicas consideradas clinicamente importantes¹¹, a mais solicitada é a glicose, pois quando seus valores são muito baixos é um indicio de distúrbios inflamatórios ou bacteriano^{11,13}, esta diminuição nos níveis de glicose está associada ao seu uso por células em excesso presentes nas articulações¹⁰.

São realizados também provas bioquímicas complementares em alguns laboratórios que participaram da pesquisa (Figura 5). Entre elas estão: a análise de proteínas em 46,1% dos laboratórios. As proteínas no líquido sinovial são qualitativamente semelhantes a do plasma, com exceção do fibrinogênio que é quase ausente, e quantitativamente, são aproximadamente um terço da concentração de proteínas plasmáticas¹. Em artrites associadas a processos inflamatórios e ou hemorrágicos a uma perda na permeabilidade relativa da membrana sinovial, fazendo com que o padrão protéico do líquido sinovial se assemelhe ao do plasma¹, porém a determinação dos níveis de proteína no líquido sinovial não é um parâmetro utilizado para a classificação desses distúrbios^{3,11}. Análise do ácido úrico em 23,1% dos estabelecimentos. Os níveis de ácido úrico no líquido sinovial geralmente são paralelos aos níveis plasmáticos³. A dosagem de ácido úrico no líquido sinovial não possui um valor clínico para o diagnóstico da gota^{1,3,5}, mas pode ser utilizado como indicativo de diagnóstico nos casos em que não puder ser demonstrada presença de cristais na amostra^{7,11}, já que suas taxas estão quase sempre aumentadas em casos de gota^{5,10}. O teste do coágulo de mucina em 7,7% dos laboratórios. O teste do coágulo de mucina avalia o grau de polimerização do ácido hialurônico com proteínas, através da acidificação da amostra, utilizando ácido acético 2 à 5%^{1,3,6,7,8,9,11}. Em um líquido normal isso basta para formar um coágulo sólido circundado por líquido transparente¹¹; em casos onde o coágulo é regular ou fraco (se desagrega com facilidade), reflete a diluição e despolimerização do ácido hialurônico, uma característica inespecífica de várias artrites inflamatórias^{3,9}. Análise de cloretos em 7,7% dos casos. Análise de colesterol (LDH) em 7,7% dos laboratórios. Os lipídeos presentes no líquido sinovial normal representam aproximadamente 30% da taxa sérica, distribuída entre colesterol livre, co-

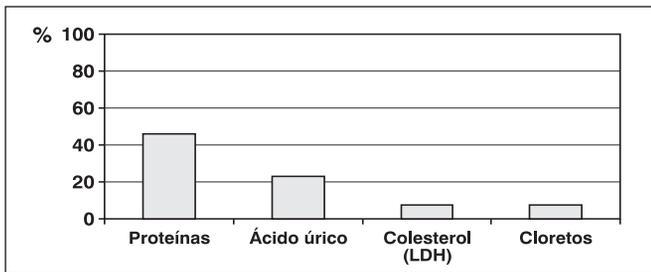


FIG. 5 - Métodos utilizados para diversas dosagens bioquímicas no líquido sinovial.

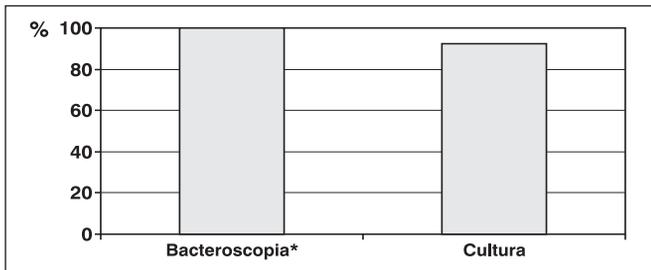


FIG. 7 - Provas microbiológicas realizadas no líquido sinovial em Santa Catarina. *Sendo realizada através da coloração por Gram.

lesterol esterificado e fosfolípidos; os triglicerídeos e ácidos graxos livres praticamente inexistem¹. Em condições anormais todos os lipídeos estão aumentados, principalmente o colesterol livre que pode ultrapassar o nível sérico, sendo as artropatias inflamatórias as patologias onde encontramos os maiores acúmulos de lipídeos no líquido sinovial¹. Sua origem, admitisse seja da síntese lipídica pela membrana sinovial além do aumento da permeabilidade capilar, sendo a síntese lipídica importante apenas nos casos de artrite inflamatória crônica¹.

Quanto a pesquisa de cristais através da microscopia, o que se constatou foi que ela realizada: através de microscópios com luz polarizada em 38,5% dos estabelecimentos; utilizando microscópio com luz comum sem a utilização de corantes por 30,8%; são utilizados dois dos métodos acima em 7,7% dos laboratórios, sendo os métodos utilizados a avaliação através de microscópios com luz polarizada e microscópio com luz comum com a utilização de corantes; e 23,1% deles não responderam (Figura 6). A pesquisa de cristais é um dos mais importantes exames realizados no líquido sinovial, consiste na identificação microscópica de cristais, é utilizado no diagnóstico da artrite¹¹, sendo essa avaliação importante para o diagnóstico diferencial de artrites decorrentes do depósito de cristais^{3,7,8,10,11,13}. O recomendado para a execução desse exame é que ele seja feito logo após a colheita da amostra, pois as alterações na temperatura e no pH do líquido podem afetar a solubilidade dos cristais provocando resultados errôneos¹¹. Outro cuidado que se deve tomar com relação a pesquisa de cristais e quanto a assepsia da lâmina e da lamínula que serão utilizadas, para se evitar a contaminação por corpos polarizantes, partículas de poeira birrefringentes artificiais ou possíveis confusões causadas por partícula fibrosas estranhas que podem também polarizar^{1,8,11}. O líquido deve ser analisado sem

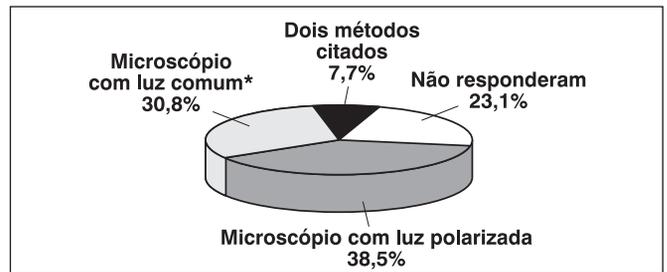


FIG. 6 - Métodos utilizados para pesquisa de cristais no líquido sinovial em Santa Catarina. *Sem a utilização de corante.

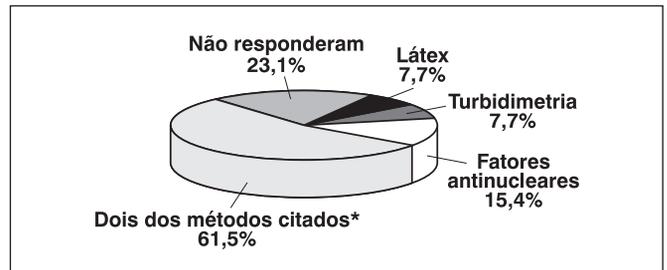


FIG. 8 - Provas imunológicas realizadas no líquido sinovial no estado de Santa Catarina. *Waler Rose juntamente com a prova do látex.

a utilização de corantes, com um microscópio sob luz polarizada direta e compensada com uma placa compensadora vermelha^{3,7,11,13}, para melhor caracterizar os cristais^{3,7,9,10,11}. Os cristais observados com microscópio sob luz polarizada aparecem brancos contra um fundo preto^{7,11}. Pode-se também utilizar um esfregão corado, pelo método de Wright, para observação dos cristais em microscópio comum¹¹.

Quanto as avaliações microbiológicas o que se encontrou foi uma homogeneidade entre as rotinas nos diferentes estabelecimentos prestadores desse serviço: a bacteroscopia é realizada através do método de Gram por 100% dos laboratórios; a cultura é realizada em 92,3% dos estabelecimentos e 7,7% não responderam (Figura 7). A principal função das avaliações microbiológicas na análise do líquido sinovial, é identificar os organismos causadores de infecção nos casos de artrite séptica¹¹, podendo os agentes causadores serem; bactérias, fungos ou vírus^{1,7,11}. Os cuidados com a coleta devem ser tomados, para se evitara penetração de microorganismo pelo buraco deixado pela agulha durante a punção, para se evitar resultados falso positivos para presença de bactérias no líquido sinovial⁷. As artrites sépticas deverão ser encaradas como graves e de urgência terapêutica^{1,13}. As pesquisas quando orientadas pela clínica maximizam as chances de identificação de agente infeccioso^{3,10}, os agentes mais comuns de infecção são a *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus*. A coloração pelo método de Gram, sempre deve ser realizada na rotina do líquido sinovial, pois qualquer inflamação pode decorrer de uma infecção^{3,11}, elas vão indicar se a bactéria causadora da infecção são cocos Gram positivos ou microorganismos Gram negativos auxiliando assim a escolha da antibioticoterapia inicial¹³, até que se obtenha o resultado da cultura para se ter certeza da identidade do agente causador da infecção¹³. A coloração pelo método de Ziehl-Neelsen deve ser utilizadas para bactérias álcool-ácido resistentes

(suspeita de artrite tuberculosa)³. A cultura corresponde a segunda fase da identificação da bactéria¹. Os meios utilizados para o cultivo são os mais variados, sendo que um meio de enriquecimento deve ser utilizado (como o ágar chocolate)¹¹, além dos meios específicos quando necessário^{1,8,10}. Recentemente tem sido utilizado como método de auxílio diagnóstico da artrite séptica com culturas negativas, cromatografia gás-líquida; além de técnicas como inoculação em cobaias; testes sorológicos e imunofluorescência^{1,3,10}. Em pacientes com antibioticoterapia anterior diminuem as chances de identificação do agente causador através da cultura⁸.

Já nas provas imunológicas o que se observou foi: a pesquisa do fator reumatóide é feita através da prova do látex em 7,7% dos laboratórios; através da prova do látex e Waaler-Rose associadamente em 61,5% dos laboratórios; através de métodos turbidimétricos em 7,7%; através do fator antinuclear (FAN) em 15,4% dos estabelecimentos (Figura 8). O fator reumatóide é um anticorpo (IgM) dirigido contra uma imunoglobulina G (IgG) humana normal¹³, sendo uma patologia auto-imune como é o lúpus eritematoso¹¹. Ele é encontrado no líquido sinovial em grande parte dos pacientes com artrite reumatóide, em valores iguais ou inferiores aos séricos³. Entretanto, a sua presença é inespecífica, pois pode apresentar títulos de até 1:320 em pessoas normais com mais de 70 anos de idade¹³. É medido habitualmente por testes de aglutinação com a prova do látex e Waaler-Rose¹³. O FAN é observado em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e alguns casos de artrite reumatóide, mas possuem uma especificidade pequena³.

São realizados também com testes complementares nos laboratórios que responderam a pesquisa, entre eles estão: a pesquisa de ragócitos em 7,7% dos laboratórios. Ragócitos são neutrófilos presentes no líquido sinovial que apresentam inclusões citoplasmáticas, granulares em forma de "grão de uva", próximas a membrana celular, dando aos neutrófilos um aspecto particular^{1,10}. Tais inclusões são decorrentes de material fagocitado e digerido, que são complexos imunes, fibrina e partículas de ADN¹. Não é um achado específico, sendo que se encontrado em taxas acima de 10% dos leucócitos pode ser considerado um indicativo de líquido sinovial inflamatório, e acima de 15-20% constituem elemento sugestivo para o diagnóstico de artrite reumatóide¹⁰.

No entanto, observamos que as técnicas recomendadas pela literatura estão tendo proporções variadas

na rotina de líquido sinovial nos laboratórios de Santa Catarina. Sendo que a adaptação das mesmas não vem trazer danos a emissão dos resultados.

Finalmente, podemos considerar que na rotina do exame de líquido sinovial não há um protocolo uniforme na maior parte das análises, dentro dos laboratórios pesquisados, isso se deve provavelmente a uma adaptação da rotina de acordo com as condições de serviço de cada laboratório, por ser esse um exame que possui normalmente uma pequena rotina. Com exceção das análises microbiológicas, que são um consenso entre todos os estabelecimentos pesquisados, todas as outras análises divergem de um laboratório para o outro. Este padrão de adaptação das metodologias disponíveis, foram observadas também nos exames de líquido e espermograma, mostrando ser uma característica peculiar da análise dos fluidos^{2,12}.

Agradecimentos: aos laboratórios de análises clínicas que participaram da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. **Guimarães, R. X., Guerra, C. C. de C.** *Clínica e laboratório interpretação clínica das provas laboratoriais*. 4ª ed. São Paulo: Editora Sarvier, 1990, p.599-685.
2. **Haas, P. Thiesen, K., Vituri, C. L.** Exame do Sêmen nos laboratórios do Estado de Santa Catarina. *Revista Newslab*, São Paulo, p.143-151.
3. **Henry, J. B.** *Diagnóstico Clínico e conduta terapêutica dos exames laboratoriais*. 19ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1989, v.1, p.467-472.
4. <http://users.sti.com.br/jeans/articulacaoar.htm> A articulação e seu funcionamento.
5. <http://www.pucpr.br/disciplinas/bioquimica/bcclinica/Praticas/uricemia.html>. *Determinação da uricemia*.
6. **Lima, O. A.** *Métodos de laboratório aplicados à clínica Técnica e Interpretação*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
7. **McBride, L. J.** *Textbook of Uryanalysis and body fluids*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, p.219-22.
8. **Ravel, R.** *Laboratório clínico, aplicação clínica dos dados laboratoriais*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.339-40.
9. **Ringscud, K. M., Linné J. J.** *Uryanalysis and body fluids a color text and atlas*. Missouri: Mosby, 1995, p.191-201.
10. **Simon, L.** *Manual de Reumatologia*. Rio de Janeiro: Editora Masson, 1982.
11. **Strasinger, S. K.** *Uroanálise e fluidos biológicos*. 2ª ed. São Paulo: Médica Panamericana, 1991, p.139-44.
12. **Vituri, C. L., Haas, P.** Exame do líquido nos laboratórios do Estado de Santa Catarina. *Revista Laes & Haes*, São Paulo, p.112-122.
13. **Wynngaarden, J. B. Cecil.** *Tratado de Medicina Interna*. 19ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, v.2.

Endereço para correspondência:

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

Seminários de Atualização Científica promovidos pela SBAC Discussão de casos clínicos

Micologia

Março de 2002
Prof. Dr. Paulo Neufeld (UFRJ)

Hematologia

Abril de 2002
Prof. Dr. Marcos K. Fleury (UFRJ)

Microbiologia

Junho de 2002
Prof. Dr. Armando Alves B. Neto (UFRJ)

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

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

Tel. (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2204-0245

Home page: www.sbac.org.br • E-mail: geral@sbac.org.br

Cepas de pseudomonas resistentes a antimicrobianos testados no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará*

Pseudomonas strains resistant to antimicrobials tested at the Hospital Complex of the University Federal of Ceará, Brazil

Everardo Albuquerque Menezes¹; Francisco Clayton Ferreira¹; Francisco Afrânio Cunha¹; Vaulice S. Café² & José Luciano Bezerra Moreira²

RESUMO – O objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência de pseudomonas isoladas no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará, no período de 1º de Janeiro a 30 de Junho de 2000. As amostras de *P. aeruginosa* foram isoladas em placas de ágar sangue, ágar cled, ágar MacConkey, caldo BHI. Das 1084 cepas de bactérias isoladas, 110 (10,15 %) eram de *Pseudomonas* sp e dentro desse gênero a espécie predominante foi a *P. aeruginosa* com 89,09%. A urina e o sangue foram as amostras com maior frequência de isolamentos, com 26,4% e 22,7%, respectivamente. Dos antimicrobianos usados no teste de susceptibilidade, que se mostraram resistentes as *Pseudomonas*, o Imipenem teve a menor frequência, com 26,4%, e a nitrofurantoína teve maior frequência, com 91,7%. A clínica médica II-B (com pacientes da Nefrologia, Urologia e Hemodiálise), foi o setor com maior frequência de resistência, com 14,6%, seguido da Clínica Cirúrgica, com 11,8%.

PALAVRAS-CHAVE – *Pseudomonas*, antimicrobianos, resistência.

SUMMARY – The objective of this study was evaluate the resistance of pseudomonas isolated in University Federal of Ceará Hospital Complex, in January, 01 at June, 30 of 2000. The samples of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated in Petri dish of blood agar, CLED agar, MacConkey agar and BHI broth. Of the 1084 strains of the bacteria isolated, 110 (10.15%) were *Pseudomonas* sp and of this genus the specie *Pseudomonas aeruginosa* was predominant with 89.09%. The urine and blood were the samples with the more frequency of isolated: 26.4% and 22.7%, respectively. From the antimicrobials used in susceptibility test, the Imipenem shows low resistance, with 26.4% and the nitrofurantoin, the most resistant, with 91.7%. The medical clinic II-B (with Nefrology, Urology and Hemodialysis patients), presented the higher frequency, with 14.6%, following by the cirurgic clinical, with 11.8%.

KEYWORDS – *Pseudomonas*, antimicrobials, resistance.

INTRODUÇÃO

O gênero pseudomonas possui bactérias que apresentam baixa exigência nutricional e é encontrado em todos locais, inclusive no ambiente hospitalar, promovendo infecções primariamente oportunistas e clinicamente importante por causa de sua resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos, podendo provocar até morte (Masuda *et al.*, 1995 e Nakae *et al.*, 1999). As pseudomonas podem colonizar equipamentos de terapia respiratória, desinfetantes, pias, água destilada, catéteres venosos centrais, catéter urinário e mesmo pacientes com poucos dias de internação (Trabulsi *et al.*, 1999).

A importância das infecções por pseudomonas reside no fato das altas taxas de mortalidade por pneumonias. A mortalidade por *P. aeruginosa* continua acima de 60%, não sendo menor do que há 25 anos, ape-

sar do fato de hoje haver um número maior de antibióticos mais potentes (Beltrame *et al.*, 2000).

O uso de antibióticos induz à uma pressão seletiva sobre as cepas bacterianas, favorecendo a preservação das cepas que adquiriram a resistência em relação às cepas sensíveis. A disseminação destes agentes ocorre, particularmente quando as medidas básicas no controle das infecções hospitalares não são respeitadas (Padoveze *et al.*, 2000). Considerando a alta resistência das pseudomonas no ambiente hospitalar resolveu-se fazer um estudo destas cepas no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados 1084 culturas no Complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará, constituído pelo Hospital Universitário Walter Cantídio e Mater-

Recebido em 8/11/2001

Aprovado em 18/12/2001

*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Univ. Federal do Ceará

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará

²Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará

idade Escola Assis Chateaubriand, no período de 1º de Janeiro à 30 de Junho de 2000, realizados pelo Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará.

As amostras coletadas para a realização das culturas para o isolamento da pseudomonas foram: sangue, urina, lesão cutânea, escarro, secreções (traqueal, ocular, ouvido, abdominal e bolha), bile, ferida cirúrgica, fragmento ósseo, lavado brônquico e lesão perinatal.

As amostras de pseudomonas foram isoladas em placas de ágar-sangue, ágar cled, caldo de BHI e ágar-MacConkey. A identificação das pseudomonas foi feita através do esquema de King-Weaver, que consiste em observar: crescimento em ágar MacConkey, produção da citocromo-oxidase, motilidade e oxidação-fermentação da glicose (OF) (Koneman *et al.*, 1997).

Para o antibiograma foi utilizado o método de difusão em ágar Kirby e Bauer, fazendo-se leitura em 24 horas. Os discos de antibióticos utilizados para o Teste de Susceptibilidade para as pseudomonas foram padronizados pelo laboratório, e foram os seguintes: cefatazidima, cefoperazona, cefotaxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina, amicacina, netilmicina, tobramicina, imipenem, meropenem, aztreonam, sulbactam, norfloxacin, cloranfenicol, tetraciclina, sulfametoxazol + trimetoprim, sulfonamidas e nitrofurantoína.

RESULTADOS

No período analisado, foram isolados um total de 1084 cepas de bactérias, sendo que destes, 110 (10,15%) foram de pseudomonas (Figura 1). Dentro desse gênero, a espécie isolada predominante foi a *P. aeruginosa*, com 98 cepas (89,09% das pseudomonas).

A urina foi a amostra que apresentou maior frequência de isolamento de cepas de pseudomonas, com 29 amostras (26,4%), de acordo com a Figura 2. Em seguida vieram o sangue com 25 amostras (22,7%); lesão cutânea com 17 amostras (15,5%); escarro com 13 amostras (11,8%); ponta de catéter com 5 amostras (4,5%); secreção ocular, secreção de ouvido e secreção traqueal com 4 amostras (3,6%); fragmento ósseo e bile com 2 amostras (1,8%); secreção abdominal, ferida cirúrgica, lesão perinatal, lavado brônquico e secreção de bolha com uma amostra (0,9%).

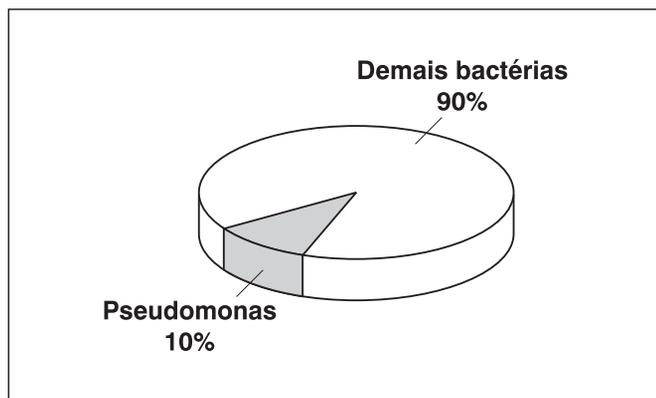


FIG. 1 - Frequência de pseudomonas no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará

TABELA I
Frequência com que os antimicrobianos foram utilizados nos testes de sensibilidade para Pseudomonas isoladas e a proporção de cepas sensíveis e resistentes a esses antimicrobianos no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará

Antibióticos	Total de cepas isoladas	Cepas sensíveis		Cepas resistentes	
		Nº	%	Nº	%
Amicacina	95	57	60,0	38	40,0
Netilmicina	56	35	62,5	21	37,5
Gentamicina	89	56	62,9	33	37,1
Tobramicina	96	56	58,3	40	41,7
Ceftazidima	108	73	67,6	35	32,4
Cefoperazona	98	62	63,3	36	36,7
Cefotaxima	86	26	30,2	60	69,8
Ceftriaxona	96	40	41,7	56	58,3
Cefepima	55	32	58,2	23	41,8
Aztreonam	102	56	54,9	46	45,1
Imipenem	72	53	73,6	19	26,4
Meropenem	50	33	66,0	17	34,0
Sulbactam	27	03	11,1	24	88,9
Norfloxacin	27	13	48,1	14	51,8
Sulfametoprim	75	09	12,00	66	88,0
Cloranfenicol	58	10	17,2	48	82,8
Sulfonamidas	25	11	44,0	14	56,0
Tetraciclina	17	03	17,6	14	82,3
Nitrofurantoína	12	01	8,3	11	91,7

As 110 cepas isoladas positivamente para pseudomonas foram testadas com 20 antimicrobianos diferentes. A Tabela I representa a frequência com que esses antimicrobianos foram utilizados nos testes de sensibilidade (TSA) para as pseudomonas isoladas, e a proporção de cepas sensíveis e resistentes a esses antimicrobianos. Na Figura 3, foi feita uma comparação das cepas resistentes de pseudomonas aos diferentes antimicrobianos.

Quanto a procedência das amostras, houve 16 cepas isoladas (14,6%), provenientes da Clínica Médica II-B (pacientes da Nefrologia, Urologia e Hemodiálise); 13 cepas (11,8%) provenientes da Clínica Cirúrgica; 12 cepas (10,9%) provenientes da Maternidade Escola, da Pediatria e da Hematologia; 11 cepas (10,0%) provenientes da Dermatologia; 10 cepas (9,1%) provenientes da Clínica Médica II-A (Gastroenterologia, Neurologia, Cardiologia e Pneumologia); 9 cepas (8,2%) provenientes do Transplante Renal; 8 cepas (7,3%) provenientes da UTI; 1 cepa (0,9%) proveniente do ambulatório de Pronto Atendimento e 7 cepas (6,4%) sem procedência (Figura 4).

DISCUSSÃO

A frequência de cepas de pseudomonas isoladas no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará foi de 10,15%, o que condiz com o fato de que a pseudomonas, por ser um microrganismo nosocomial e oportunista, é comumente encontrado em infecções hospitalares (Koneman *et al.*, 1997). Deste total de isolados 89,09 % era *P. aeruginosa*

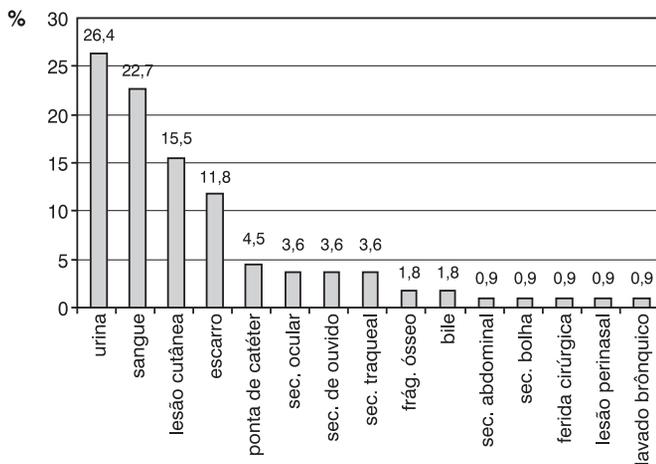


FIG. 2 - Especimen clínico onde foram isoladas pseudomonas no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará

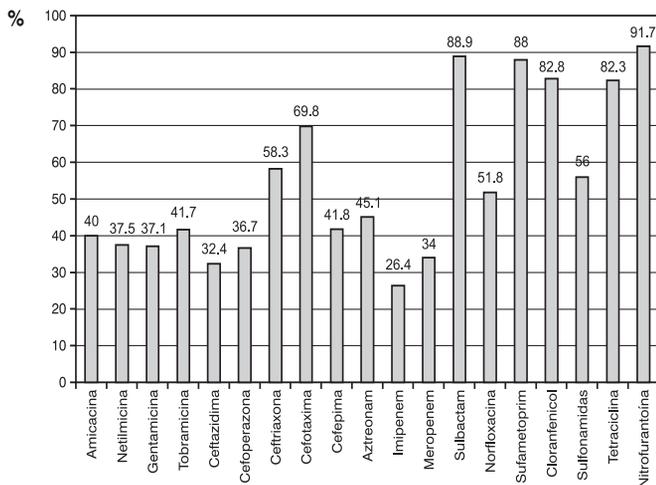
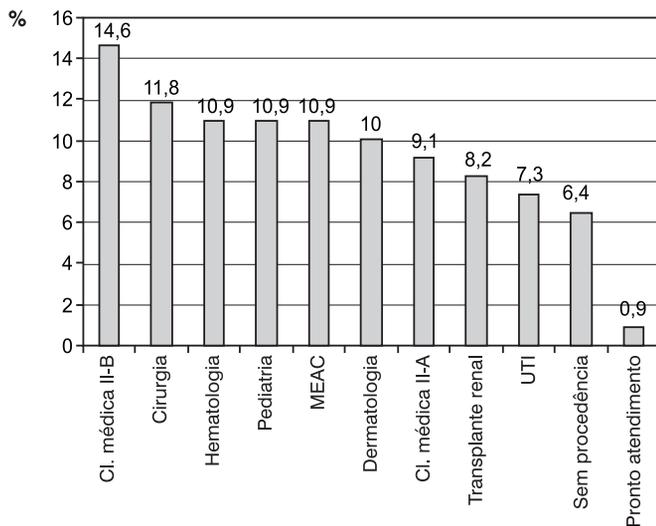


FIG. 3 - Frequência da resistência das pseudomonas isoladas no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará



Cl. Médica II-B: Pacientes da Nefrologia, Urologia e Hemodiálise

Cl. Médica II-A: Pacientes da Pneumologia, Cardiologia, Gastroenterologia e Neurologia

MEAC: Maternidade Escola Assis Chateaubriand

FIG. 4 - Procedência das amostras onde foram isoladas as cepas de pseudomonas no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará

Diferente de outros hospitais, a urina foi a amostra que apresentou maior frequência de isolamento de cepas de pseudomonas, com 26,4%. Em seguida aparece o sangue com 22,7% das amostras. Depois aparecem, lesão cutânea com 15,5%, escarro com 11,8%, ponta de cateter com 4,5%, secreção ocular, secreção de ouvido, secreção traqueal com 3,6%, fragmento ósseo, bile com 1,8%, secreção abdominal, ferida cirúrgica, lesão perinatal, lavado brônquico e secreção de bolha com 0,9%. O mais comum isolamento é em ponta de cateter, lesão cutânea e secreções de uma maneira em geral (Murray *et al.*, 2000).

Quanto à procedência das amostras, observamos que a Clínica Médica IIB (com pacientes da Nefrologia, Urologia e Hemodiálise), foi o setor onde houve maior isolamento de cepas de pseudomonas, com 14,6%. Em seguida aparecem a Clínica Cirúrgica com 11,8%, a Maternidade Escola, Pediatria e Hematologia com 10,9%, Dermatologia com 10,0%, Clínica Médica II-A (Gastroenterologia, Neurologia, Cardiologia e Pneumologia) com 9,1%, Transplante Renal com 8,2%, UTI com 7,3%, e o Ambulatório de Pronto Atendimento com 0,9%. Em 6,4% as amostras não tinham procedência. Em relação aos antimicrobianos, observamos uma alta frequência de cepas resistentes aos diferentes antibióticos utilizados no teste de susceptibilidade para pseudomonas, isso por causa da sua capacidade de criar diversos mecanismos de resistência aos antibióticos (Barriere & Jacobs 1996).

Somente as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, têm ação contra as pseudomonas, porém sua utilização é sempre controlada, pois induzem resistências às β -lactamases muito rapidamente. A Cefotaxima foi utilizada em 86 cepas, sendo que 60 delas (69,8%) se mostraram resistentes. Sabe-se que a Cefotaxima possui pequena ação contra as pseudomonas. A Cefoperazona tem potente ação sobre as pseudomonas, porém é sensível a ação das β -lactamases, foi utilizado em 98 cepas, das quais 36 (36,7%) se mostraram resistentes. Isto é um fato preocupante, pois geralmente a maioria das cepas de pseudomonas são susceptíveis (Gilbert *et al.*, 2000). A Ceftazidima, a mais potente das cefalosporinas e a mais estável frente as β -lactamases, foi utilizada em 108 cepas, das quais 35 (32,4%) se mostraram resistentes. A Cefepima é a única cefalosporina de 4ª geração utilizada nesse teste de susceptibilidade e embora seja tão potente quanto a Ceftazidima, ela sofre ação das β -lactamases, o que explica a sua alta frequência em cepas resistentes. Das 55 cepas em que foram utilizada a Cefepima, 23 (41,8%) apresentaram-se resistentes.

O Aztreonam, que possui resistência excepcional frente as β -lactamases, apresentou alta frequência de cepas resistentes de pseudomonas. Das 102 cepas em que foram utilizados, 46 (45,1%) foram resistentes. Isso pode ser explicado pelo fato das pseudomonas criarem outros mecanismos de resistência.

O Imipenem e o Meropenem também são β -lactamases resistentes e apresentam boa ação contra as pseudomonas resistentes as cefalosporinas de 3ª geração (Troillet *et al.*, 1997). Observamos no nosso tra-

balho que esses antibióticos carbapenêmicos, apresentaram menor frequência em cepas resistentes de pseudomonas. O Imipenem foi utilizado em 72 cepas, sendo que 19 (26,4%) apresentaram resistentes, enquanto que o Meropenem, foi utilizado em 50 cepas, apresentando 17 (34,0%) resistentes.

Finalmente esperamos que com este trabalho consigamos sensibilizar os profissionais de saúde ao uso indevido e indiscriminado de antibióticos. Gostaríamos também de alertar a população de um maneira geral, quanto ao uso de antibióticos sem a realização de uma cultura.

CONCLUSÕES

1. De todas as culturas realizadas no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará, 10,15% foram de pseudomonas.

2. A *P. aeruginosa* foi a mais isolada dentro do gênero com 89,09%.

3. Foram isolados cepas de pseudomonas principalmente das amostras de urina e de sangue.

4. A Clínica II-B, com pacientes da Nefrologia, Urologia e Hemodiálise, foi o setor de maior procedência das amostras onde se isolaram as cepas de pseudomonas, seguido da clínica cirúrgica.

5. Os antimicrobianos mais potentes observados, foram o Imipenem, norfloxacin, Ceftazidima e o Meropenem.

6. Os antimicrobianos menos potentes, foram a nitrofurantoína, Sulbactam, Sulfametoprim, cloranfenicol e tetraciclinas.

REFERÊNCIAS

1. **Tavares, Wálter** Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2ª Edição, São Paulo-SP: Editora Atheneu Editora, 1996.
2. **Murray, P. R.; Drew, W. L.; Kobayashi, G. S.; Thompson Jr, J. H.** Microbiologia médica. Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000.
3. **Koneman, E. W.; Allen S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P.C.; Winn Jr, W. C.** Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th Edition, Philadelphia-New York: Lippincott, 1997.
4. **Trabulsi, L. R.; Aletterthum, F.; Gompertz, A. F.; Candeias, J. A. N.** Microbiologia. 3ª Edição, Rio de Janeiro-RJ: Livraria Atheneu Editora, 1999.
5. **Beltrame, R. E.; Silva, C. R.; Tanaka, I. I.; Sornas, A. M. F.** Pseudomonas aeruginosa - antibioticoterapia e perfil de resistência de cepas isoladas das UTIs dos hospitais da Faculdade de Medicina de Marília [on line]. Disponível na Internet via <http://www.google.com>. Arquivo capturado em 10 de Junho de 2000.
6. **Padoveze, M. C.; Oliveira, E. L.** Bactérias multi-resistentes [on line]. Disponível na Internet via <http://www.google.com>. Arquivo capturado em 10 de Junho de 2000.
7. **Barriere, S. L.; Jacobs, R. A.** Clinical use of antimicrobials. In: **Katzung, Bertram G.** Pharmacology basic & clinical. 6th Edition. New Jersey: Appleton & Lange, 1995. p.752-68.
8. **Gilbert, D. N.; Moellering, R. C.; Sande, M. A.** The Sanford guide to antimicrobial therapy. 30th Edition. Utah: 2000. p.53.
9. **Troillet, N.; Samore, M. H.; Carmeli, Y.** Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin. Infect. Dis.* v.25, n.1, p.1094-98. 1997.
10. **Nakae, T.; Nakajima, A.; Ono, T.; Saito, K.; Yoneyama, H.** Resistance to β -Lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* v. 43, n. 5, p. 1301-03, 1999.
11. **Masuda, N.; Sakagawa, E.; Okhya, S.** Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 39:645-649.

Endereço para correspondência:

Everardo Albuquerque Menezes

Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 - 60430-370 - Fortaleza - Ceará

Saiba o que é preciso para ter o seu

Título de Especialista em Análises Clínicas pela SBAC

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

O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina

IV - Avaliação da interação espermatozóide-muco cervical

Role of sperm examination in male infertility

IV - Interaction evaluation of spermatozoa-cervical mucus

Fernando Tadeu Andrade-Rocha*

RESUMO – Após o coito, os espermatozoides (EZ) têm de atravessar o muco cervical (MC), antes de atingir o sítio da fertilização. Este evento é uma etapa importante do processo de reprodução humana, pois o MC é uma espécie de “filtro” que seleciona os gametas mais viáveis para a fertilização. Distúrbios nesta interação EZ-MC reduzem as chances de concepção e sua investigação faz parte da avaliação básica de infertilidade conjugal. O objetivo do presente trabalho é revisar este tema. São abordados conhecimentos atuais sobre a micro-estrutura do MC (produção, composição química, propriedades reológicas e físicas), os mecanismos da interação EZ-MC e os testes laboratoriais usados nesta avaliação, com ênfase ao teste pós-coito (TPC).

PALAVRAS-CHAVE – Sêmen, espermatozóide, muco cervical, interação espermatozóide-muco cervical, teste pós-coito.

SUMMARY – After the coitus, the spermatozoa (EZ) have to pass through the cervical mucus (MC) to reach the site of fertilization. This event is an important step of the process of human reproduction, because MC is a type of “filter” that selects the viable gamete for the fertilization. Disturbances in this interaction EZ-MC reduces the conception chances and its investigation is part of the basic evaluation of married infertility. The objective of the present work is to review this theme. It is approached current knowledge on the microstructure of MC (production, chemical composition, rheological and physical properties), the mechanisms of the interaction EZ-MC and the laboratorial tests used in this evaluation, with emphasis to the postcoital test (TPC).

KEYWORDS – Semen, spermatozoa, cervical mucus, sperm-cervical mucus interaction, postcoital test.

INTRODUÇÃO

A dificuldade de concepção é um problema que leva muitos casais a procurar o laboratório, encaminhado por um especialista, para exames específicos de investigação da infertilidade.

No homem, um procedimento convencional é a realização de um espermograma, um exame que é útil para detectar distúrbios em quase todos os órgãos genitais masculinos. Sobre este exame, o autor fez várias considerações a respeito, em publicações prévias neste periódico científico^{1,2,3}.

Na mulher o problema é mais complexo, pois envolve vários procedimentos de investigação, que, individualmente, não têm a mesma abrangência do espermograma. O especialista então usa estes recursos na tentativa de diagnóstico, os quais incluem a realização de alguns exames laboratoriais, com ênfase para a determinação de níveis hormonais (estrogênios, FSH, LH, progesterona, etc.).

Em alguns casos, a investigação clínica e laboratorial do casal não esclarece a causa da infertilidade. Nestes casos, o especialista ainda tem a opção de usar outros recursos de diagnóstico, citando-se, entre eles,

a avaliação da interação espermatozóide (EZ) - muco cervical (MC). Como o sêmen é um material estranho ao organismo da mulher, reações hostis à sua presença na vagina e no cérvix podem ocorrer após o coito, reduzindo as chances de concepção.

O objetivo do presente trabalho é abordar este tema. O autor revisa aspectos estruturais do MC, os mecanismos da interação EZ-MC e os testes laboratoriais utilizados nesta avaliação.

Considerações preliminares

Após os coito, os milhões de espermatozoides que são depositados no fórnice posterior da vagina, rapidamente buscam a penetração no MC, para escapar da acidez vaginal, que é nociva à sua sobrevivência. Esta penetração inicia-se logo após a ejaculação,⁴ completando-se entre 30 e 240 minutos depois.⁵ Entretanto, ressalta-se que, somente atravessam o orifício externo do cérvix os EZ que apresentam motilidade e morfologia normais. EZ anormais e os demais elementos celulares presentes no ejaculado permanecem na vagina e são posteriormente fagocitados e destruídos.

Uma vez presente no MC, cujas condições somen-

Recebido em 21/8/2001

Aprovado em 10/2/2002

*Farmacêutico-bioquímico

Unidade de Pesquisa do Sêmen - Laboratório Dr. Homero Soares Ramos, Petrópolis, RJ - Laboratório Dr. Ivan Mostaro, Juiz de Fora, MG

te são favoráveis no período ovulatório, os EZ migram em direção às criptas cervicais, reservatórios naturais do cérvix que estocam e controlam o acesso dos gametas às partes superiores do trato genital feminino. O MC atua então como um "filtro", que seleciona os gametas mais viáveis para a fertilização.

Obviamente, quando há uma penetração espermática pobre, seja por deficiência dos gametas, ou no MC, reduz-se as chances de concepção na mesma proporção de sua intensidade. Em razão desta relação direta EZ-MC, o fator cervical, como é conhecida esta interação, não é um procedimento isolado de investigação de infertilidade feminina, tendo, portanto, uma relação direta com o exame do sêmen. Distúrbios no fator cervical são relevantes para a reprodução humana e é importante a participação do laboratório na sua investigação.

Aspectos estruturais do endocérvix

O endocérvix é a porção terminal do útero e liga a vagina à cavidade uterina. Anatomicamente este canal é cilíndrico e fusiforme, com 2,5 a 3mm de comprimento e ± 7 mm na sua parte mais larga. Possui um epitélio cilíndrico (colunar), que expande-se em várias direções, às vezes formando fendas, dando a falsa impressão de estrutura glandular, embora não exista qualquer glândula neste epitélio. Por apresentar estas características peculiares, o epitélio do endocérvix e suas fendas ficaram conhecidos como criptas cervicais⁶, que são de 4 tipos, G, L, S e P⁷, cada qual produzindo seu próprio muco, também denominados G, L, S, P. Pesquisadores divergem sobre o número de criptas presentes no endocérvix, variando de 100 (número mais aceito), como proposto por Odeblad⁸, a 28.000, segundo Inzler⁹.

A estrutura do endocérvix foi amplamente investigada em estudos feitos, principalmente, nas décadas de 60 e 70^{10,11,12,13,14,15}. Sua membrana mucosa basicamente compõe-se de 3 tipos de células:

• Células secretoras

Situam-se próximas à membrana basal e sua principal característica é a presença de numerosas vesículas contendo muco. São as células predominantes neste epitélio e secretam diferentes tipos de muco.

• Células ciliadas

Apresentam microvilos e cílios, que carregam o muco produzido pelas células secretoras, para o lúmen cervical. Estas células possuem batimento sincronizado que direciona o muco em direção à vagina.

• Células de reserva

São células que transformam-se em células secretoras quando necessário. Sua estrutura difere das células secretora e das células ciliadas. Possui poucas fibras musculares lisas e grande quantidade de tecido conjuntivo.

Ressalta-se que as células do epitélio cervical regeneram-se continuamente através de divisões mitóticas e podem, desta forma, apresentarem-se em diferentes estágios de desenvolvimento.

Aspectos estruturais do muco cervical

O MC é uma secreção heterogênea produzida continuamente pelo endocérvix e constituída ainda por pequenas frações do fluido endometrial, tubal e folicular. Sua produção é mediada por um mecanismo neuro-endócrino, que envolve a participação de estrogênios e progesterona⁷, de terminações nervosas, de corpúsculos sensoriais presentes no epitélio cervical e de contrações musculares da mucosa⁶. Mecanismos moleculares também estão envolvidos neste processo¹⁶. As células cervicais produzem de 20 a 60 miligramas de muco por dia, em mulheres com idade reprodutiva, quantidade que aumenta consideravelmente na ovulação, atingindo cerca de 700 mg/dia⁶.

Inúmeros pesquisadores estudaram a micro-estrutura do MC, mas os conhecimentos atuais sobre este fluido biológico baseiam-se, principalmente, nos estudos de Odeblad^{7,8}. Segundo aquele autor, o MC compõe-se de uma rede de micélios, cuja estrutura varia com a fase do ciclo menstrual. No período pré-ovulatório sua distribuição é irregular, com poucos espaços entre os interstícios, o que dificulta a penetração espermática (muco tipo G). Por outro lado, no período ovulatório há um considerável aumento de água no espaço intersticial, distendendo os micélios, que distribuem-se então em paralelo, facilitando a penetração espermática (muco tipo E). Este tipo de muco é hoje classificado como muco tipo S, que seleciona e transporta os melhores espermatozoides e em muco tipo P, que tem a função de potencializar o movimento espermático. Ainda formam a estrutura do MC o muco L, que elimina os EZ defeituosos e o muco F, que é produzido por células fetais remanescentes (células F), presentes na mucosa uterina (células de reserva)⁷.

Outras características do muco cervical

Além da distribuição miceliar, o MC ainda tem duas outras características importantes, que são suas propriedades bacteriostáticas e bactericidas. O MC é estéril em algumas mulheres, mas, na maioria, detecta-se uma flora bacteriana escassa, composta principalmente por bactérias aeróbicas e anaeróbicas^{17,18}, com predomínio de estafilococos coagulase negativa e de lactobacilos. Micoplasmas também podem ser detectados¹⁹. Em condições normais há uma resistência do MC à colonização bacteriana, principalmente na fase lútea, na gravidez e durante o uso de anticoncepcionais⁶. Porém, com a penetração espermática durante o período ovulatório, diferentes bactérias são carregadas para o cérvix. Desta forma são frequentes as cervicites causadas por bactérias residentes e por aquelas transmitidas sexualmente, as quais prejudicam a interação EZ-MC²⁰, principalmente, porque algumas bactérias possuem propriedades espermicidas¹⁹. Para evitar esta ação bacteriana, o MC possui mecanismos de defesa, dos quais participam leucócitos e várias substâncias^{6,21,22,23}. Este mecanismo evita a ação bacteriana e protege os EZ, durante sua passagem pelo endocérvix.

Composição química do muco cervical

Quatro componentes básicos formam a estrutura do MC^{24,25,26}:

Substâncias de baixo peso molecular solúveis no MC - Incluem eletrólitos (Na, Cl, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe), carboidratos, aminoácidos e lipídios. O cloreto de sódio é o principal componente e sua concentração regula diversas propriedades deste fluido biológico, tais como o pH, osmolaridade, elasticidade, viscosidade e a cristalização. O conteúdo destas substâncias varia com o ciclo menstrual e suas ações biológicas são mais evidentes na ovulação.

Macromoléculas solúveis no MC - São proteínas séricas (pré-albumina, albumina, α -1-globulina, beta-globulina, gamaglobulina, α -1-antitripsina e haptoglobulina), proteínas próprias do MC, enzimas (lisozima, proteinase, fosfatase alcalina e α -amilase), peptídios, polissacarídeos, ativadores, inibidores, aglutininas e complemento. Estas substâncias também têm função biológicas distintas, mas, coletivamente contribuem para manter o equilíbrio biológico do MC. Imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) também integram este grupo de substâncias e atuam na defesa imunológica local, principalmente, contra antígenos espermáticos e do plasma seminal²⁷ e contra agentes infecciosos²⁸, bem como a tripsina e a quimiotripsina, enzimas proteolíticas que atuam na fração mucóide, reduzindo a viscosidade do MC na ovulação.

Macromoléculas não solúveis no MC - Corresponde à fração mucóide, que é uma longa cadeia polipeptídica ramificada em várias partes, em cujas ramificações fixam-se galactose e n-acetilaminoglicosamina e na sua porção distal, ácido siálico e fucose²⁹. Esta composição glicoprotéica dá ao MC a característica de micélios em forma de rede. Segundo Moghissi³⁰, estas glicoproteínas contêm de 70 a 80% de carboidratos e de 20 a 25% de aminoácidos.

Água - Seu conteúdo é elevado, atingindo a 98% na ovulação e 90% nas outras fases do ciclo³¹. Esta distribuição aumenta ou diminui o espaço entre os micélios facilitando ou dificultando a migração espermática. Ressalta-se que a água é tão importante para a interação EZ-MC, que uma simples redução de 2 a 3% no seu conteúdo compromete consideravelmente a penetração espermática, principalmente, na fase ovulatória.

Propriedades reológicas do muco cervical

Por conter água e glicoproteínas em sua estrutura, o MC é um hidrogel e, como tal, apresenta características biofísicas próprias, que são classicamente denominadas de propriedades reológicas. Estas propriedades resultam da distribuição miceliar formada a partir do entrelaçamento das frações protéicas das glicoproteínas, induzido pelas cadeias de oligossacarídeos, mediante a ação hormonal.

Inúmeros trabalhos na literatura reportaram várias propriedades reológicas do MC^{15,32,33,34,35,36}, as quais são resumidas a seguir:

Fluxo-elasticidade - O fluxo varia com a fase do ciclo sendo mais intenso na ovulação. A elasticidade é

a propriedade do MC voltar à sua forma original, quando submetido a algum tipo de pressão externa.

Viscosidade - No início do ciclo é maior, devido ao menor conteúdo em água. Com a hidratação diminui progressivamente até a ovulação, para depois aumentar novamente até o fim do ciclo.

Plasticidade - É a capacidade do MC em deformar-se continuamente sem romper-se. Esta propriedade é melhor observada na gravidez.

Filância (*Spinbarkeit*) - É a capacidade do MC esticar-se formando um filamento único, que pode ser medido em centímetros. As ramificações das cadeias moleculares e forças intermoleculares entre elas são responsáveis por este fenômeno. Durante a ovulação, a filância do MC pode alcançar até 15 centímetros.

Arborização ou cristalização (*Ferning*) - É um fenômeno típico do MC. Quando espalhado em uma lâmina e secado a quente, o MC cristaliza-se formando ramificações em forma de árvore. Este fenômeno foi observado, inicialmente, por Papanicolaou³⁷ e, posteriormente, melhor estudado por Rydberg³⁸ e pelo brasileiro Campos da Paz, que desenvolveu um método para sua avaliação³⁹. Este fenômeno também é mais evidente no período ovulatório e, supõe-se ser resultante do acúmulo de cristais e de agregados policristalinos de sais duplos de sódio e potássio⁴⁰. Sua avaliação (*fern test*) foi muito usada em décadas passadas, para determinar o período ideal para a inseminação intra-uterina.

Tack - Refere-se ao fato do MC ser pegajoso. Qualquer amostra de MC apresenta "tack", mas este fenômeno é mais evidente na gravidez.

Além de suas propriedades reológicas, o MC também apresenta outras características físicas, que também influem na penetração e na migração espermática no endocérvix:

Transparência - O MC é transparente na ovulação e opaco nas demais fases do ciclo.

Densidade específica - Supõe-se que seja semelhante àquela de uma solução de salina a 0,8%¹⁰.

pH - Os valores reportados na literatura são conflitantes. Há relatos de pH > 9,0⁴¹, >8,5⁴², entre 7,0 e 7,5⁴³, e entre 6,5 e 7,5⁴⁴. Valores $\leq 6,0$ e $\geq 8,5$ são considerados críticos, pois comprometem a sobrevivência dos espermatozoides⁴⁵. Por outro lado, em um estudo mais recente, Eggert-Kruse *et al.*⁴⁶ examinaram uma longa série de pacientes e encontraram um pH médio de 7,0, com valores oscilando entre 5,4 e 8,2, abrangendo MC normal e patológico. Aqueles autores encontraram valores mais baixos em MC sem penetração espermática, com penetração espermática deficiente, ou com imobilização espermática, concluindo que, quanto mais baixo o pH (maior a acidez do MC), mais evidentes são os efeitos deletérios sobre os espermatozoides. Esta característica também foi observada em outros estudos^{44,47,48}. Com base nestas observações, praticamente chega-se a uma conclusão que o pH ideal do MC para a migração espermática varia entre 7,0 e 8,5.

Considerações gerais sobre a interação espermatozóide-muco cervical

Três fatores são básicos para a interação EZ-MC⁶:

- 1) A capacidade de migração dos espermatozoides usando suas próprias forças (motilidade espermática);
- 2) A distribuição dos micélios em paralelo durante a ovulação;
- 3) A configuração anatômica das criptas cervicais.

Esta interação praticamente inicia-se na vagina, logo após a deposição do sêmen, o qual constitui-se de 3 frações:

- 1) A fração fluida, que contém poucos espermatozoides, sendo composta predominantemente por secreção prostática;
- 2) A fração mista, que contém cerca de 3/4 dos gametas, sendo formada por secreções das vesículas seminais e das ampolas;
- 3) A fração gelatinosa, constituída por secreções das vesículas seminais, com poucos espermatozoides ativos. Nesta fração, os gametas ficam aprisionados nas malhas do coágulo seminal, mas sua liberação é rápida, mediante a ação de enzimas proteolíticas de origem prostática.

Antes do coito, o pH vaginal varia entre 4,0 e 4,5, mas, com mistura do sêmen com a secreção vaginal, há um aumento para $\pm 6,1$ ⁴⁹ amenizando a acidez, que, entretanto, ainda é nociva para os EZ. Os gametas então tentam sair rapidamente deste ambiente migrando em direção ao orifício externo do cérvix (os gametas são depositados próximos, no fórnice posterior da vagina), ajudados por nutriente do plasma seminal, que estimulam a motilidade espermática e por contrações da vagina e do útero, decorrentes do coito, que também potencializam o movimento espermático⁵⁰. Uma fração do MC que atravessa o orifício externo do cérvix e atinge a porção posterior da vagina, entrando em contato com o lago seminal, também ajuda na migração espermática, pois atrai os gametas para o canal cervical e impede seu retorno para a vagina⁶.

A penetração espermática no MC desenvolve-se a partir do 9º dia do ciclo menstrual atingindo o máximo na ovulação (± 14 º dia). Logo após, há uma reversão neste processo, com redução drástica e progressiva do número de gametas no endocérvix⁵¹. Resume-se então, que a presença de EZ no MC limita-se então a um breve período de 6 a 7 dias, durante o período ovulatório.

Dois aspectos são relevantes na interação EZ-MC. Primeiro, a cinética do processo, que envolve a penetração, distribuição e armazenamento dos gametas. Segundo, sua mecânica, ou seja, a geração de forças propulsoras que ajudam na migração espermática. Devido à heterogeneidade do MC, os EZ migram entre os interstícios, muito perto de suas macromoléculas, o que provoca uma interação física e hidrodinâmica entre ambos⁵². Há uma repulsão eletrostática entre cargas negativas da membrana espermática e das glicoproteínas do MC potencializando a migração espermática⁵³. Deformações na micro-estrutura do MC (propriedades macro-reológicas)

oriundas de pressões externas (coito) também ajudam neste processo (estímulo passivo), bem como a flexibilidade dos micélios (propriedades micro-reológicas). Há oscilações em forma de ondas, que empurram os gametas, os quais movem-se ao acaso, livremente, mas seguindo a distribuição em paralelo dos micélios, ainda assistidos por modulações das macromoléculas, cujos canais de baixa viscosidade e repletos de água contraem-se ritmicamente, controlando o movimento espermático.

Mecanismos bioquímicos também são importantes neste processo. Os EZ possuem reservas de glicogênio, que são usadas no seu metabolismo e motilidade. Entretanto, estas reservas são insuficientes e os gametas ainda usam carboidratos extra-celulares (glicose, frutose, manose) e glicogênio, presentes no MC⁶.

O espaço médio entre os micélios varia entre 0,5 e 2 micra até o 10º dia do ciclo. Progressivamente aumenta, chegando a 10 micra no 14º dia. Depois, este diâmetro reduz novamente, até chegar aos níveis do período pré-ovulatório. Dentro deste espaço, EZ com cabeça oval migram mais facilmente. O mesmo não ocorre com os EZ morfológicamente anormais (o menor batimento tridimensional do flagelo dificulta sua progressão⁵⁴). Por este motivo, o MC apresenta maior porcentagem de espermatozoides ovais do que aquela do "pool" vaginal.

Há muitas evidências na literatura, que o endocérvix é um sítio de estocagem de EZ, devido à configuração das criptas cervicais. Somente EZ com boa mobilidade e morfológicamente normais penetram nesta estrutura e sua concentração mantém-se constante por ± 48 horas⁵⁵. Este fenômeno enriquece a população espermática, apesar da drástica redução do número de gametas em relação ao ejaculado. Ao mesmo tempo os gametas são continuamente liberados para o útero, evitando, desta forma, a agregação espermática. Por causa destes mecanismos, EZ móveis são encontrados no MC de 2 a 8 dias após o coito⁶.

O MC também protege os gametas após sua entrada nos interstícios miceliares. Além de direcioná-los para as criptas evitando a ação de leucócitos presentes no lúmen cervical após o coito, o MC ainda controla o desenvolvimento da capacitação espermática, de modo a evitar a reação acrossômica precoce⁵⁶. Ressalta-se que a capacitação praticamente inicia-se durante a passagem dos EZ pelo cérvix, com a exclusão lenta e gradual das substâncias aderidas à membrana espermática, sobretudo, os fatores decapacitantes⁵⁷, mas este evento somente se completa quando os gametas alcançam o sítio de fertilização⁵⁸ (maiores detalhes a respeito podem ser consultados em artigos publicados anteriormente por este⁵⁹ e por outros autores)^{60,61,62}.

Quando os EZ penetram no MC há um aumento de leucócitos no endocérvix⁶³, que concentram-se principalmente na massa central (lúmen). Este evento tem uma função biológica bem definida, pois promove a remoção e destruição dos EZ que não alcançam as criptas cervicais, os quais são fagocitados e destruídos, além das bactérias que penetram no endocérvix após o coito. Não se trata, portanto, de uma resposta inflamatória. Leucócitos também aumentam no cérvix após a ovulação, mas, para impedir o acesso dos gametas às partes superiores do trato genital feminino.

Métodos laboratoriais para avaliar a interação muco cervical-sêmen

• Teste de penetração espermática de Kremer⁶⁴

Este teste usa um tubo capilar calibrado, que é preenchido com MC colhido durante a ovulação. Montase o tubo sobre uma escala graduada em centímetros e coloca-se uma de suas extremidades em um tubo de ensaio pequeno cortado, que serve de reservatório para o sêmen. Após adição do líquido seminal mantém-se este dispositivo na estufa a 37°C durante 5 minutos. Em contato com o MC, os EZ migram mais ou menos em linha reta, trajetória que é avaliada por observação microscópica. O teste avalia:

- 1) A distância percorrida pelos EZ;
- 2) A densidade espermática em vários pontos do capilar;
- 3) A velocidade de progressão;
- 4) A viabilidade espermática.

O teste é simples, rápido, mas pouco usado de rotina, mesmo em laboratórios especializados.

• Teste de penetração espermática de Mills & Katz (*Flat Capillary Tube Test*)⁶⁵

Este teste usa um dispositivo similar ao anterior e mede a velocidade de migração dos gametas. Pesquisadores do mesmo grupo desenvolveram uma versão computadorizada do teste, de melhor sensibilidade⁶⁶. Apesar da validade de ambos, praticamente não são usados de rotina.

• Teste de contato espermatozói-de-muco cervical⁶⁷

Este teste baseia-se no contato direto entre o sêmen e o MC, após uma seleção de EZ. Avalia-se então a mobilidade espermática, verificando se há uma troca de padrão, de progressivo para móveis sem progressão ("shaking phenomenon"). Quando positivo indica que há auto (EZ) ou iso-imunidade (MC), configurando uma infertilidade de origem imunológica. Geralmente usa-se este método quando o teste pós-coito (TPC) (veja adiante) é pobre ou negativo, ou quando há uma elevada incidência de aglutinação espermática no ejaculado.

• Teste para investigação de hostilidade cervical⁶⁸

Em alguns pacientes com TPC pobre ou negativo recomenda-se fazer um teste cruzado, para verificar se a falha na penetração espermática resulta de hostilidade cervical (uma resistência natural do MC à penetração espermática, mesmo no período ovulatório). O teste usa sêmen e MC de doadores e do casal sob investigação de infertilidade fazendo uma reação cruzada entre o sêmen do marido x MC da doadora e sêmen do doador x MC da esposa. Quando há hostilidade cervical diminui a penetração dos gametas do doador no MC da esposa.

• Teste de penetração espermática de Miller & Kuzrok⁴¹

Neste teste coloca-se uma gota de MC e uma gota de sêmen em lâmina e cobre-se cada gota com uma lamínula encostando uma na outra. As características do contato das amostras na interface determina os resultados do teste. Quando as condições do MC são fa-

voráveis, os EZ penetram com facilidade no MC, devido as diferenças de viscosidade e de tensão superficial entre os 2 fluidos. Caso contrário, a penetração espermática é pobre ou nula. O teste também pode ser efetuado de forma semi-quantitativa⁶⁹ contando os espermatozóides em campos microscópicos seqüenciais, em determinado período de tempo (entre 5 e 15 minutos), a partir da junção dos 2 fluidos. Existe uma boa correlação entre este teste e aqueles que usam tubo capilar, bem como com o TPC e com a qualidade do sêmen.

• Teste pós-coito (TPC)

Este teste foi desenvolvido por J. Marion Sims em 1868⁷⁰ a partir de suas avaliações clínicas em mulheres com problemas de esterilidade. Sims observou que os EZ são encontrados no MC logo após o coito e que mantém-se vivos e móveis por um longo período de tempo. Sims também observou que esta característica variava de paciente para paciente dependendo da penetração espermática e servia como referência para avaliar as chances de concepção. Aquele autor fez vários estudos a respeito, mas suas publicações passaram despercebidas até 1913, quando Max Hühner⁷¹ divulgou e popularizou o TPC. Até hoje, este teste é o principal recurso para avaliar a interação EZ-MC

Vários fatores são importantes para a realização do TPC e para a interpretação dos resultados, os quais são considerados a seguir:

Indicação clínica - O TPC avalia a interação EZ-MC em casais inférteis, para detectar distúrbios no endocérvix (hostilidade, cervicites, etc) e alterações seminais (oligo, terato, astenozoospermias), que reduzem as chances de concepção⁶.

Período para a realização do teste - Efetua-se o teste no período ovulatório entre o 13º e 14º dia do ciclo menstrual normal. Em ciclos irregulares este período deve ser previamente determinado usando testes específicos, tais como a curva de temperatura basal ("basal body temperature" ou "BBT"), ultrassonografia, mudanças nas características do MC e a citologia vaginal⁷². Estes testes geralmente são efetuados pelo especialista que encaminha a paciente ao laboratório.

Abstinência sexual - Não há um período bem definido, mas recomenda-se um intervalo de 2 a 4 dias.

Tempo entre o coito e a colheita de MC - Este é um dos motivos de discussão do TPC. Como foi dito anteriormente, EZ penetram no endocérvix um minuto após o coito e permanecem no MC por um período de até 8 dias. Com base nestas características, alguns especialistas recomendam um período de 6 a 12 horas após o coito para a realização do teste.

Horário do coito - O coito pode ser efetuado pela manhã, ou de véspera, à noite, dentro da rotina do casal. Ressalta-se que a relação programada deve ser evitada para não inibir os cônjuges, o que prejudica o exame.

Parâmetros avaliados no exame - A motilidade espermática é o principal parâmetro avaliado no exame. Recomenda-se ainda a determinação da percentagem de EZ ovais (morfologia), o exame físico (volume, filância, pH, consistência) e da celularidade do MC,

principalmente a incidência de leucócitos, além da flora bacteriana presente.

Interpretação do exame - A presença de 10 ou mais EZ móveis com progressão rápida, por campo microscópico de grande aumento (x400) é considerada normal e exclui o fator cervical como causa de infertilidade. Quando o TPC é pobre (<10 EZ móveis), recomenda-se novo exame no ciclo seguinte, inclusive, com avaliação do pool vaginal (a amostra deve ser colhida logo após o coito), para verificar se os espermatozoides estão presentes no lago seminal.

Principais causas de TPC anormal⁶ - As causas mais comuns são a hostilidade cervical (aumento de viscosidade, da acidez, a presença de infecções e de iso-anticorpos antiespermatozoides), anovulação, dispareunia, anomalias anatômicas uterinas, tumores (pólipo, leiomioma) e alterações seminais (oligo, terato e/ou astenozoospermias).

Principais conflitos na interpretação dos resultados - Alguns estudos mostraram que o TPC apresenta pobre reprodutibilidade^{73,74,75}, a metodologia não é padronizada⁷⁶, apesar das recomendações da OMS⁶⁹, a gravidez pode não ocorrer em pacientes com TPC normal⁷⁷ e, em alguns casos, EZ são recuperados na cavidade peritoneal de pacientes com TPC pobre⁷⁸. Recentes evidências também indicam que a inseminação intrauterina (uma das opções de tratamento para pacientes com infertilidade no fator cervical) combinada com o uso de gonadotrofinas (terapia usada a partir dos anos 90) independe do TPC, quanto aos resultados obtidos⁷⁹.

Outros testes

• Teste com muco cervical bovino

O MC bovino tem características bioquímicas, propriedades reológicas e aspectos funcionais similares ao MC humano. Por este motivo tem sido proposta a sua utilização para pesquisar infertilidade no fator cervical⁸⁰, pois é possível obter uma grande quantidade de amostra para os testes. Os resultados encontrados também são similares àqueles obtidos com o MC humano.

• Teste com gel de acrilamida

Este material sintético também pode ser usado em substituição ao MC humano, pois os resultados encontrados também são satisfatórios⁸¹. A grande vantagem deste material é a sua fácil estocagem.

• Teste misto

Este teste usa simultaneamente o MC bovino e humano e também dá bons resultados⁷³.

Outros testes também foram relatados na literatura, com resultados também considerados satisfatórios para investigar a interação EZ-MC^{82,83,84,85}, mas, praticamente não são usados de rotina, mesmo em laboratórios especializados.

CONCLUSÃO

A avaliação da interação EZ-MC é um procedimento pouco usado na investigação básica de infertilidade conjugal. Entretanto, dados da literatura mostram a

alta incidência de infertilidade no fator cervical. Pelo fato do MC desempenhar diversas funções biológicas importantes, a avaliação de suas características durante o período ovulatório e de sua interação com os EZ podem ajudar no diagnóstico etiológico de muitos casos de infertilidade. O laboratório exerce um importante papel nesta avaliação, pois há muitos testes disponíveis, como aqueles citados aqui, com especial referência para o TPC, um exame que pode ser efetuado na rotina de qualquer laboratório. Informações sobre as propriedades reológicas e a presença de cervicites, detectadas durante a realização da maioria dos testes também podem contribuir significativamente nesta avaliação e ajudar a muitos casais a realizar seu desejo de concepção.

REFERÊNCIAS

- 1 Andrade-Rocha F.T. & Carvalho P.P.N.G. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. I- Análise das características dos espermatozoides e de suas células precursoras. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 28:171-178, 1996.
- 2 Andrade-Rocha F.T.; Carvalho P.P.N.G. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. II- Avaliação da atividade secretora das glândulas acessórias genitais. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 29:75-80, 1997.
- 3 Andrade-Rocha F.T. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. III- Testes para função espermática. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 30:13-21, 1998.
- 4 Kunz, G.; Beil, D.; Deiniger, H.; Einspanier, A.; Mall, G.; Leyendecker, G. The uterine peristaltic pump. Normal and impeded sperm transport within the female genital tract. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424:267-277, 1997.
- 5 Tredway, D. R.; Fordney-Settlage, D. S.; Nakamura R. M.; Motoshima, M.; Umezaki, C. U.; Mishell, D. R. Jr. Significance of timing for the postcoital evaluation of cervical mucus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121:387-393, 1975.
- 6 Moghissi, K. S. The function of the cervix in human reproduction. *Curr. Prob. Obstet. Gynecol.* 7:1-58, 1984.
- 7 Odeblad, E. The ovulation method research and reference centre of Australia. *Bull. Nat. Fam. Plann. Counc.* Victoria 21:1-35, 1994.
- 8 Odeblad, E. Micro-NMR in high permanent magnetic fields. Theoretical and experimental investigations with an application to the secretions from single glandular units in human uterine cervix. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 45(suppl.2):1-188, 1966.
- 9 Inslar, V.; Glezerman, M.; Zeidel, L.; Bernstein, D.; Misgar, N. Sperm storage in the human cervix: a quantitative study. *Fertil Steril.* 33:288-293, 1980.
- 10 Odeblad, E. The physics of the cervical mucus. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 38(suppl.1):44-58, 1959.
- 11 Davies, J.; Kusuma, H. Developmental aspects of the human cervix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 97:534-550, 1962.
- 12 Hafez, E. S. Scanning electron microscopy of female reproductive tract. *J. Reprod. Med.* 9:119-134, 1972.
- 13 Chrétien, F. C.; Gernigon, C.; David, G.; Psychoyos, A. The ultrastructure of human cervical mucus under scanning electron microscopy. *Fertil. Steril.* 24:746-757, 1973.
- 14 Chrétien, F. C. La glaire cervicale. I- Mécanisme et déterminisme de la sécrétion. *J. Gyne. Obst. Biol. Reprod.* 3:115-135, 1974.
- 15 Fosberg, J. G. Morphogenesis and differentiation of the cervicovaginal epithelium. In: Jordan, A.; Singe, A. (eds.) *The cervix*. London, Saunders, pp.3-12, 1976.
- 16 Gorodeski, G. I. The cervical cycle. In: Adashi, E. Y.; Rock, J. A.; Rosenwaks, Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Lippincott-Haven, Philadelphia, pg.301-324, 1996.
- 17 Goplerud, P.; Ohm, M. J.; Galask, R. P. Aerobic and anaerobic flora of the cervix during pregnancy and puerperium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 126:858-868, 1976.
- 18 Moberg, P.; Eneroth, P.; Harlin, J.; Ljung-Wadstrom, A.; Nord, C. E. Cervical bacterial flora in infertile and pregnant women. *Med. Microbiol. Immunol.* 165:139-145, 1978.
- 19 Eggert-Kruse, W.; Pohl, S.; Naher, H.; Tilgen, W.; Runnebaum, B. Microbial colonization and sperm-mucus interaction: results in 1000 infertile couples. *Hum. Reprod.* 7:612-620, 1992.
- 20 Joyce, D.; Vassilopoulos, D. Sperm-mucus interaction and artificial insemination. *Clin. Obstet. Gynecol.* 8:587-610, 1981.
- 21 Huang, N.; Pan, X.; Wu, Q.; Wang, B. Isolation of antibacterial polypeptides of human cervical mucus. *Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao.* 29:25-28, 1998.
- 22 Franklin, R. D.; Kutteh, W. H. Characterization of immunoglobulins and cytokines in human cervical mucus: influence of exogenous and endogenous hormones. *J. Reprod. Immunol.* 42:93-106, 1999.

- 23 Eggert-Kruse, W.; Botz, I.; Pohl, S.; Rohr, G.; Strowitzki, T. Antimicrobial activity of human cervical mucus. *Hum. Reprod.* 15:778-784, 2000.
- 24 Schumacher, G. F. B. Biochemistry of cervical mucus. *Fertil. Steril.* 21:697-705, 1970.
- 25 Chrétién, F. C. La glaire cervicale. II- Propriétés chimiques et physiques - ultra structure. *J. Gyn. Obst. Biol. Reprod.* 3:711-744, 1974.
- 26 Fordney-Settlage, D. A review of cervical mucus and sperm interactions in humans. *Int. J. Fertil.* 26:161-169, 1981.
- 27 Domagala, A.; Kasprzak, M.; Kurpysz, M. Immunological characteristics of cervical mucus in infertile women. *Zentralbl. Gynakol.* 119:616-620, 1997.
- 28 Dolgushin I. I.; Telesheva, L. F.; Dolgushina, V. F. Local anti-infective protection of the reproductive tract of women of different ages. *Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* Mar-Apr (2):86-89, 2000.
- 29 Wolf, D. P.; Sokolowski, J. E.; Litt, M. Composition and function of human cervical mucus. *Biochem. Biophys. Acta* 630:545-558, 1980.
- 30 Moghissi, K. S.; Syner, F. N. Studies on human cervical mucus: mucoids and their relation to sperm penetration. *Fertil. Steril.* 21:234-239, 1970.
- 31 Katz, D. F.; Slade, D. A.; Nakajima, S. T. Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv. Contracep.* 13:143-151, 1997.
- 32 Davajan, V.; Nakamura, R.; Kharma, K. Spermatozoan transport in cervical mucus. *Obstet. Gynecol. Surv.* 25:1-43, 1970.
- 33 Chrétién, F. C. Cervical mucus. II- Chemical and physical properties - ultrastructure. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 3:711-744, 1974.
- 34 Wolf, D. P.; Litt, M. Physical and rheological aspects of cervical mucus. *Sem. Reprod. Endocrinol.* 4:323-332, 1986.
- 35 Moghissi, K. S. Sperm-cervical mucus interaction. In: Keel, B. A.; Webster, B. W. (eds.) *CRC Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Boston, CRC Press, pg.149-165, 1990.
- 36 Katz, D. F. Human cervical mucus: research update. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165:(suppl.2):1984-1986, 1991.
- 37 Papanicolaou, G. N. A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 51:316-328, 1946.
- 38 Rydberg, E. Observations on the crystallization of cervical mucus. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 38:172-187, 1948.
- 39 Campos da Paz, A. The crystallization test as a guide to treatment of cervical hostility. *Fertil. Steril.* 4:137-148, 1953.
- 40 Berthou, J.; Chrétién, F. C. Double sodium and potassium sulphates revealed by microprobe analysis in dried cervical mucus: a mid-cycle crystallographic index. *Hum. Reprod. Update.* 3:347-358, 1997.
- 41 Miller, E. G.; Kurzrok, R. Biochemical studies of human semen. III- Factors affecting migration of sperm through the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 24:19-26, 1932.
- 42 Meaker, S. R.; Glaser, W. The hydrogenion concentration of the endocervical secretions. *Surg. Gynecol. Obstet.* 24:73-76, 1929.
- 43 Breckenridge, M. A. B.; Pederson, A. B.; Pommerenke, W. T. A pH study of human cervical secretions. *Fertil. Steril.* 1:427-434, 1950.
- 44 MacDonald, R. R.; Lumley, I. B. Endocervical pH measured in vivo through the normal menstrual cycle. *Obstet. Gynecol.* 35:202-206, 1970.
- 45 Zavos, P. M.; Cohen, M. R. The pH of cervical mucus and the postcoital test. *Fertil. Steril.* 34:234-238, 1980.
- 46 Eggert-Kruse, W.; Köhler, A.; Rohr, G.; Runnebaum, B. The pH as an important determinant of sperm-cervical mucus interaction. *Fertil. Steril.* 59:617-628, 1993.
- 47 Baruffi, R. L. R.; Mauri, A. L.; Petersen, C. G.; Campos, M. S.; Franco Jr, J. G. Influência do pH do muco cervical no teste pós-coito. *J. Bras. Ginec.* 102:213-215, 1992.
- 48 Shulman, S.; Pitts, W.; Li, B.; Hu, C. Y. Role of pH on sperm-mucus interaction. *Fertil. Steril.* 60:588-590, 1993.
- 49 Tevi-Benissan, C.; Gresenguet, G.; Si Mohamed, A.; Belec, L. In vivo neutralization of physiological cervicovaginal acidity by sperm nitrogen bases. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 90:39-43, 1997.
- 50 Shafik, A. Study of the uterine response to vaginal distension: the 'vaginouterine reflex'. *Gynecol. Obstet. Invest.* 44:265-269, 1997.
- 51 Moghissi, K. S.; Syner, F. N.; Evans, T. N. A composite picture of the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 114:405-418, 1972.
- 52 Katz, D. F.; Berger, A. S. Flagellar propulsion of human sperm in cervical mucus. *Biorheology.* 17:169-175, 1980.
- 53 Katz, D. F.; Overstreet, J. W. The mechanisms and analysis of sperm migration through cervical mucus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 144:319-330, 1982.
- 54 Katz, D. F.; Morales, P.; Samuels, S. J.; Overstreet, J. W. Mechanism of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertil. Steril.* 54:513-516, 1990.
- 55 Hanson, F. W.; Overstreet, J. W. The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140:173-178, 1981.
- 56 Bielfeld, P.; Graf, M.; Jeyendran, R. S.; Zaneveld, L. J. No change in acrosome reaction of human spermatozoa during storage in cervical mucus. *Andrologia.* 24:83-86, 1992.
- 57 Rosseli, M.; Marchini, M.; Soldati, G.; Campana, A.; Balerna, M. Removal of sperm-coat from human spermatozoa by interaction with cervical mucus or a capacitating medium. *Andrologia.* 22:543-547, 1990.
- 58 Fraser, L. R. New insights into possible causes of male infertility. *Hum. Reprod.* 14:38-46, 1999.
- 59 Andrade-Rocha, F. T. A fertilização humana. Eventos biológicos e moleculares. *Femina.* 27:643-649, 1999.
- 60 Topfer-Petersen, E. Molecules on the sperm's route to fertilization. *J. Exp. Zool.* 285:259-266, 1999.
- 61 Baldi, E.; Luconi, M.; Bonaccorsi, L.; Muratori, M.; Forti, G. *Intracellular events signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction.* *Front Biosci* 5:E110-123, 2000. (texto completo disponível em <http://www.bioscience.org/2000/vs/e/baldi/fulltext.htm>)
- 62 Flesch, F. M.; Gadella, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochem. Biophys. Acta.* 1469:197-235, 2000.
- 63 Thompson, L. A.; Barratt, C. L.; Bolton, A. E.; Cooke, I. D. The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am. J. Reprod. Immunol.* 28:85-89, 1992.
- 64 Kremer, J. A simple sperm penetration test. *Int. J. Fertil.* 10:209-215, 1965.
- 65 Mills, R. N.; Katz, D. F. A flat capillary tube system for assessment of sperm movement in cervical mucus. *Fertil. Steril.* 29:43-47, 1978.
- 66 Katz, D. F.; Overstreet, J. W.; Hanson, F. W. A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. *Fertil. Steril.* 33:179-186, 1980.
- 67 Kremer, J.; Jager, S. The sperm-cervical mucus contact test: a preliminary report. *Fertil. Steril.* 27:335-340, 1976.
- 68 Farhi, J.; Valentine, A.; Bahadur, G.; Shenfield, F.; Steele, S. J.; Jacobs, H. S. In-vitro cervical mucus-sperm penetration tests and outcome of infertility treatments in couples with repeatedly negative post-coital tests. *Hum. Reprod.* 10:85-90, 1995.
- 69 World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University Press, pg.1-106, 1992.
- 70 Sims, J. M. Illustrations of the value of the microscope in treatment of the sterile condition. *Br. Med. Jr.* 2:465-466, 1868.
- 71 Hühner, M. *Sterility in the male and female and its treatment.* New York, Robman, 1913.
- 72 Guida, M.; Tommaselli, G. A.; Palomba, S.; Pellicano, M.; Moccia, G.; Di Carlo, C.; Nappi, C. Efficacy of methods for determining ovulation in a natural family planning program. *Fertil. Steril.* 72:900-904, 1999.
- 73 Niederberger, C. S.; Lamb, D. L.; Glinz, M.; Lipschultz, L. I.; Scully, N. F. Tests of sperm function for evaluation of the male: Penetrak and Tru-Trax. *Fertil. Steril.* 60:319-323, 1993.
- 74 Glatstein, I. Z.; Best, C. L.; Palumbo, A.; Sleeper, L. A.; Friedman, A. S.; Hornstein, M. D. The reproducibility of the postcoital test: a prospective study. *Obstet. Gynecol.* 85:396-400, 1995.
- 75 Glazener, C. M.; Ford, W. C.; Hull, M. G. The prognostic power of the postcoital test for natural conception depends on duration of infertility. *Hum. Reprod.* 15:1953-1957, 2000.
- 76 Griffith, C. S.; Grimes, D. A. The validity of the postcoital test. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162:615-620, 1990.
- 77 Harrison, R. F. The diagnostic and therapeutic potential of the postcoital test. *Fertil. Steril.* 36:71-75, 1981.
- 78 Asch, R. H. Sperm recovery in peritoneal aspirate after negative Sims-Hühner test. *Int. J. Fertil.* 23:57-60, 1978.
- 79 Balasch, J. Investigation of the infertile couple in the era of assisted reproductive technology: a time for reappraisal. *Hum. Reprod.* 15:2251-2257, 2000.
- 80 Keel, B. A.; Schalue, T. K. Correlation of the bovine cervical mucus penetration test with human sperm characteristics in 1,406 ejaculates. *Arch. Androl.* 44:109-115, 2000.
- 81 Anilkumar, R.; Devanathan, T. G.; Pattabiraman, S. R.; Edwin, M. J. Correlation between the spermatozoal characteristics and sperm penetration in polyacrilamide gel and bovine cervical mucus. *Theriogenology.* 15:685-691, 2001.
- 82 Eggert-Kruse, W.; Gerhard, I.; Tilgen, W.; Runnebaum, B. The use of hen's egg white as a substitute for human cervical mucus in assessing human infertility. *Int. J. Androl.* 13:258-266, 1990.
- 83 Clarcke, G. N. A simplified quantitative cervical mucus penetration test. *Hum. Reprod.* 12:1184, 1997.
- 84 Engel, S.; Petzoldt, R. Human sperm penetration in different media. *Andrologia.* 31:233-239, 1999.
- 85 Tang, S.; Garret, C.; Baker, H. W. Comparison of human cervical mucus and artificial sperm penetration media. *Hum. Reprod.* 14:2812-2817, 1999.

Endereço para correspondência:

Dr. Fernando Tadeu Andrade-Rocha

Rua Irmãos D'Ángelo, 48 - sala 101 - 25.685-330 - Petrópolis, RJ

Telefax (0xx24)3237-6173

E-mail: fernandoar@inforios.psi.br

Correlação dos anticorpos anti-endomísio e antitransglutaminase com a doença celíaca

Correlation of anti-endomysial and antitransglutaminase antibodies with celiac disease

Shirley Ramos da Rosa Utiyama¹, Lorete Maria da Silva Kotze², Renato Mitsunori Nishihara¹ & Vanessa Ferreira de Camargo¹

RESUMO – A Doença Celíaca (DC) consiste em uma enteropatia por sensibilidade ao glúten, resultante de uma complexa interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais, que conferem um amplo espectro de alterações clínicas, histológicas e sorológicas nos pacientes. Os anticorpos anti-endomísio (EmA-IgA) representam marcadores sensíveis e específicos para a DC, tendo-se identificado, recentemente, a transglutaminase tecidual (tTG) como o principal auto-antígeno endomysial. O presente estudo teve por objetivo realizar uma correlação sorológica entre o método de pesquisa dos anticorpos EmA-IgA (Imunofluorescência Indireta) e anti-tTG-IgA (ELISA) em 148 amostras de soros, constituídas por 55 pacientes celíacos (10 em dieta isenta de glúten) e 93 controles (53 sadios, 18 com doença de Crohn e 22 com retocolite ulcerativa). Os resultados evidenciaram que 18,2% das amostras de pacientes celíacos (n=10) foram negativas pelos 2 métodos, caracterizando 100% de concordância entre os mesmos. Nas demais amostras de pacientes celíacos, em uso de glúten (n=45), a concordância nos resultados foi de 84,4%. Enquanto todas as amostras (n=45) apresentaram o EmA positivo, com títulos entre 1:2,5 a 1:80, os anticorpos anti-tTG mostraram positividade em 38 amostras (84,4%), com resultados entre 20 e 640 unidades. As 7 amostras discordantes (falso negativas para o anti-tTG) apresentavam EmA com títulos 1:2,5 (n=5) e 1:5 (n=2). As amostras com títulos iguais ou superiores a 1:10 para o EmA também foram positivas para os anticorpos anti-tTG. A sensibilidade e especificidade para o EmA foi de 100%, enquanto para o anti-tTG foi de 84,4% e 96,7%, respectivamente. O coeficiente de relação entre os 2 métodos sorológicos foi de $r=0,8107$ (correlação de Pearson). Tais resultados mostraram uma significativa correlação entre os dois métodos, principalmente nos casos em que se verificam altos níveis de anticorpos. Nas situações passíveis de baixos níveis de anticorpos, como em crianças menores de 2 anos de idade, triagem de familiares ou populações e/ou monitoramento da dieta isenta de glúten, a pesquisa sorológica exclusiva de anticorpos anti-transglutaminase pode incorrer em resultados errôneos, levando a uma conduta clínica inadequada.

PALAVRAS-CHAVE – Doença celíaca, anticorpos anti-endomísio, anticorpos antitransglutaminase.

SUMMARY – Celiac Disease (CD) is a gluten-sensitive enteropathy, that results from a complex interplay of genetic, immunologic and environmental factors, which explains the wide spectrum of clinical, histological and serological alterations in the patients. The anti-endomysial antibodies (IgA EmA) are sensitive and specific markers for CD, and tissue transglutaminase (tTG) has been recently identified as the endomysial autoantigen. The aim of this study was to correlate the assays used to evaluate IgA EmA (Indirect immunofluorescence) and IgA tTG serum antibodies (ELISA) in 148 samples from 55 celiac patients (10 on gluten-free diet) and 93 controls (53 healthy individuals, 18 with Crohn's disease, and 22 ulcerative colitis patients). Ten (18.2%) CD patients were negative to both assays, showing 100% of agreement. In untreated CD patients (n=45), 84.4% agreement was found. All these samples (n=45) were positive to IgA EmA, with titers from 1:2.5 to 1:80, and 38 (84.4%) were positive to IgA tTG antibody, from 20 to 640 units. The seven false-negative anti-tTG samples had IgA EmA titers of 1:2.5 (n=5) or 1:5 (n=2). All samples with IgA EmA titers higher than 1:10 were also positive to IgA tTG. The sensitivity and specificity of the IgA tTG assay were 84.4% and 96.7%, respectively, in contrast to 100% found when IgA EmA was tested. The correlation found for both determination was highly significant ($r=0.8107$), particularly in high titers samples. On the other hand, our results have shown that in patients presenting low antibody titers, such as children aged up to two years old, patients' first-degree relatives, population screenings or even during free-diet monitoring, care should be taken when determining only IgA tTG antibody, as it may give false results, that could lead to an inadequate clinical management.

KEYWORDS – Celiac disease, anti-endomysial antibodies, antitransglutaminase antibodies.

INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) consiste em uma doença gastrointestinal caracterizada por reação inflamatória decorrente de uma intolerância permanente ao glúten contido no trigo, centeio, cevada e aveia.

Atualmente, esta é considerada como produto de uma complexa interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais, que explicam a heterogeneidade de manifestações clínicas presentes nos pacientes, variando desde formas assintomáticas até quadros de má absorção intestinal severa, caracterizada por diarreia

Recebido em 17/9/2001
Aprovado em 22/11/2001

¹Laboratório de Imunopatologia, Departamento de Patologia Médica - Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR
²Serviço de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva - Hospital Universitário Cajuuru - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR

crônica e deficiência do crescimento, principalmente na infância (Houlston, 1996; Schuppan, 1998; Schuppan, 2000).

A DC ocorre predominantemente em indivíduos brancos e raramente afeta nativos africanos, japoneses ou chineses. A prevalência estimada na Europa varia de 1:300 no oeste da Irlanda a 1:1000 e 1:2000 em outras regiões (Houston, 1996).

Crianças menores de dois anos de idade, com doença celíaca, apresentam também anorexia, vômito, distensão abdominal, perda muscular, hipotonia e irritabilidade recorrentes. Em crianças mais velhas e adolescentes os sintomas gastrointestinais podem ser menos freqüentes, porém apresentam falhas no crescimento, anemia por deficiência de ferro e puberdade tardia, além de apresentarem, ocasionalmente, *Diabetes mellitus*, artrite e úlceras aftosas (Ferguson, 1996; Ferguson, 1998). A mucosa intestinal em pacientes celíacos não tratados apresenta alterações funcionais e morfológicas, com cortes histológicos evidenciando mucosa lisa, sem vilosidades, com alongamento e hiperplasia de criptas [Arato, 1992; Marsh, 1992; Kotze, 2001(a)].

O tratamento sob dieta livre de glúten resulta em recuperação clínica e de mucosa, verificando-se recidiva das manifestações com o retorno do glúten na alimentação [Ferguson, 1998; Kotze, 2001(a)].

O glúten consiste em uma fração protéica presente em cereais como trigo, centeio, cevada e aveia, que pode ser fracionado em prolaminas (solúveis em etanol) e gluteninas (insolúveis em etanol). A porção tóxica para os pacientes celíacos é predominantemente a de prolaminas, também denominadas de gliadina (trigo), hordeína (cevada), secalina (centeio) e avenina (aveia). O alto conteúdo em glutamina (>30%) e prolina (15%) nestes cereais confere-lhes uma toxicidade que não se observa com as prolaminas do arroz e milho, nas quais predominam os amino ácidos alanina e leucina (Schuppan, 2000).

Estudos com familiares de primeiro grau de pacientes celíacos evidenciam a importante predisposição familiar e genética de susceptibilidade à doença. A prevalência de DC nestes familiares varia de 8 à 18%, atingindo até 70% de concordância entre gêmeos monozigóticos (Schuppan, 2000). Tal predisposição envolve tanto gens HLA como não-HLA. A associação HLA-primária é com a molécula HLA-DQ2 (alelos DQA1*0501 e DQB1*0201), presente em 95% dos pacientes, e com a molécula HLA-DQ8 (alelos DQA1*0301 e DQB*0302), frequente na maioria dos pacientes restantes (Houlston, 1996; Molberg, 2000).

Até a década de 80, o diagnóstico da DC baseava-se apenas em critérios clínicos e histológicos, dependendo, com freqüência, da realização de múltiplas biópsias da mucosa do intestino delgado: uma antes do tratamento, uma na fase da dieta isenta de glúten e outra após o teste com reintrodução do glúten (Meuwisse, 1970). Estas dificuldades estimularam as investigações com o objetivo de estabelecer métodos sorológicos que substituíssem tais biópsias ou pelo menos reduzissem seu número.

Desta forma, embora as biópsias intestinais ainda representem o "gold standard" para o diagnóstico de DC, os rígidos critérios de diagnóstico mudaram (Walker-Smith, 1990). Pacientes com sintomas leves ou atípicos, bem como os familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, indivíduos com deficiência seletiva de IgA, pacientes com diabetes mellitus insulino dependente, crianças com deficiência pondero-estatural e os casos de DC latente ou silenciosa, atualmente contam com testes sorológicos de triagem bem menos invasivos do que as biópsias intestinais (Vasquez, 1995; Challacombe, 1995; Troncone, 1996).

Os principais marcadores sorológicos descritos são os anticorpos anti-gliadina (AGA), anti-reticulina (ARA) e anti-endomísio (EmA). Os anticorpos anti-gliadina (AGA-IgA e AGA-IgG) são investigados usualmente pelo método imuno enzimático (ELISA). Os anticorpos anti-reticulina (ARA-IgA) são detectados através da reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando como substrato estômago, fígado e rim de rato (Seah, 1973). Os anticorpos anti-endomísio (EmA-IgA), caracterizados por Imunofluorescência Indireta, têm como antígeno alvo a substância intermolecular da musculatura lisa do esôfago de macaco, sendo que este substrato foi substituído por cordão umbilical humano, conforme descrito por Volta *et al.*, 1995. Os EmA têm mostrado alto grau de especificidade e sensibilidade nas várias fases da DC sendo considerado, atualmente, um dos melhores testes de triagem.

Recentemente foram descritos os anticorpos contra transglutaminase tecidual (tTG-IgA), detectados pelo método de ELISA, com sensibilidade e especificidade superponíveis às do EmA-IgA (Dieterich, 1997). De acordo com diferentes autores a transglutaminase pode ser o principal, se não o único autoantígeno endomissial alvo envolvido na fisiopatologia da DC, reconhecendo as gliadinas ricas em glutamina como um de seus poucos substratos (Schuppan, 1998; Dieterich, 1998; Miller, 1999; Schuppan, 2000; Molberg, 2000).

A tTG é uma enzima intracelular, localizada no citosol de diferentes tipos de células como fibroblastos, leucócitos (Koop, 2000), células endoteliais de vasos sanguíneos, células de músculo liso e de mucosas (Molberg, 2000), que catalisa a formação de pontes isopeptídicas entre resíduos de glutamina e lisina. É liberada das células durante "stress" mecânico ou injúria e promove a ligação cruzada de certas proteínas da matriz extracelular, estabilizando assim o tecido conjuntivo.

A transglutaminase tem sido associada a várias doenças, incluindo distúrbios neuronais, câncer, infecção por HIV, doenças inflamatórias intestinais, diabetes mellitus, cirrose hepática, catarata e várias doenças autoimunes (Molberg, 2000).

Enzimas do lúmen intestinal digerem o glúten em peptídeos que são expostos à transglutaminase da mucosa. Esta modifica especificamente os peptídeos do glúten através da desaminação de certos resíduos de glutamina. O primeiro passo da reação é a ligação de um resíduo específico de glutamina na porção ami-

no-terminal do substrato ao sítio catalítico da tTG, o qual é seguido por liberação de NH₃ e formação de um intermediário enzima-substrato. O segundo passo é a reação entre o substrato (contendo resíduos de lisina) e uma amina disponível (Molberg, 2000). A exposição do peptídeo gliadina 134-153 à tTG promove a formação de um peptídeo desaminado bem como de um complexo do peptídeo ligado cruzadamente à tTG (Schuppan, 2000). A tTG também pode cruzar resíduos de glutamina a resíduos de lisina de outras proteínas, incluindo ela própria, podendo resultar na formação de complexos glúten-tTG.

Os peptídeos modificados ligam-se eficientemente à molécula HLA-DQ2 expressas na membrana de células apresentadoras de antígenos intestinais. Os peptídeos derivados da gliadina, de variantes da gliadina desaminados pela tTG ou de complexos gliadina-tTG, são então exibidos por células apresentadoras de antígenos (HLA-DQ2) para induzir a síntese de anticorpos IgA anti tTG. A mucosa intestinal de pacientes com DC apresenta uma população de células T CD4⁺ que reconhecem complexos de peptídeos de glúten desaminados e HLA-DQ2, para tornarem-se ativadas. As células T CD4⁺ que reconhecem estes peptídeos através de seus receptores de célula T complementar (TCR) emitem resposta do tipo Th1 e/ou do tipo Th2 com secreção de citocinas. As citocinas da resposta Th1 (primariamente TNF α) induzem os fibroblastos intestinais à liberação das metaloproteinases MMP-1 e MMP-3 que degradam o colágeno fibrilar (MMP-1), glicoproteínas da matriz extracelular e proteoglicanos (MMP-3). Em adição, a MMP-3 pode superativar a MMP-1. A resposta do tipo Th2 promove maturação e expansão de plasmócitos que produzem anticorpos da classe IgA contra gliadina, transglutaminase tecidual e complexos gliadina-tTG, diretamente envolvidos na patogênese da atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas intestinais (Schuppan, 1998).

A transglutaminase tecidual é considerada, atualmente, o principal autoantígeno na DC, sendo os anticorpos anti-transglutaminase-IgA, quando em altos títulos, intimamente associados ao diagnóstico da mesma, embora baixos títulos não possam ser considerados doença específicos [Lock, 1999(b)].

De acordo com Dieterich *et al.* (1998), a pesquisa dos anti-tTG-IgA, por ELISA, tende a ser um importante recurso para "screening" populacional, por representar um ensaio quantitativo, independente da variação inter observador, além de ser de fácil execução.

Nos últimos anos inúmeros estudos têm sido realizados comparando a pesquisa dos anticorpos anti-endomísio (EmA-IgA), por Imunofluorescência Indireta, com os anticorpos anti-transglutaminase (anti-tTG-IgA), por ELISA [Lock, 1999(b); Sardy, 2000; Levine, 2000]. Tais estudos têm evidenciado uma excelente correlação entre os EmA-IgA e os anti-tTG-IgA nos aspectos de sensibilidade, com melhores resultados para os EmA-IgA em termos de especificidade, segundo relatos de diferentes autores (Miller, 1999; Koop, 2000; Reeves, 2000; Levine, 2000; Chan, 2001).

Considerando os aspectos acima expostos, aliados à experiência do nosso grupo nos últimos anos com a pesquisa do EmA-IgA [Utiyama, 1998; Kotze, 1999; Kotze, 2001(b)], o presente estudo teve por objetivo verificar, sorologicamente, a correlação entre os anticorpos anti-endomísio e anti-transglutaminase tecidual em pacientes celíacos, buscando um maior entendimento em termos de interpretação dos títulos do EmA-IgA e das unidades dos anticorpos anti-tTG frente a estes casos, assim como analisar a sensibilidade e especificidade dos dois métodos para as nossas condições laboratoriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas amostras de soro de 148 indivíduos (71,2% do sexo feminino e 28,8% do sexo masculino, média de idade de 32,6 anos), constituída por 55 pacientes celíacos, (10 em dieta isenta de glúten) e 93 amostras controle, incluindo 53 indivíduos saudáveis, 18 com doença de Crohn e 22 com retocolite ulcerativa. Foram coletados 10 ml de sangue de cada indivíduo e após separação por centrifugação, as alíquotas de soro foram preservadas em freezer -80°C até o momento de uso nas reações sorológicas.

METODOLOGIA

Pesquisa dos anticorpos anti-endomísio por Imunofluorescência Indireta

Os anticorpos anti-endomísio foram investigados por técnica de Imunofluorescência Indireta, utilizando como substrato cortes criostáticos de cordão umbilical humano, previamente fixados em acetona resfriada e clorofórmio, conforme descrito por Ladinser *et al.* (1994). As amostras foram submetidas a diluições iniciais de triagem em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 e após a interação com o substrato, em lâminas, foram lavadas e incubadas com conjugado fluorescente anti-IgA humano F(ab')₂ (Kallestad-França) previamente titulado. As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência Carl Zeiss, sendo consideradas positivas as amostras que caracterizaram fluorescência no tecido de endomísio (substância intermiofibrilar) que contorna as fibras de músculo liso nas paredes dos vasos e artérias do cordão umbilical. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada bateria dos testes.

Preparo do substrato para pesquisa dos anticorpos anti-endomísio

O cordão umbilical humano para pesquisa dos anticorpos anti-endomísio foi obtido no Centro Obstétrico do HC-UFPR, a partir de gestantes saudáveis e no momento do parto. Após a excisão do cordão, um pequeno fragmento deste foi mergulhado em soro fisiológico e transportado ao Laboratório de Imunopatologia, onde foi cortado transversalmente em pequenos blocos. Estes foram mergulhados em OCT-Tissue Tek

(Miles) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Os blocos com o cordão foram mantidos em freezer à temperatura de -80°C . Foram, então, realizados cortes de $3\ \mu\text{m}$ de espessura em criostato, colocados sob lâminas de vidro e mantidos em freezer à temperatura de -20°C até o momento de uso nas reações de Imunofluorescência Indireta.

Pesquisa do anticorpos antitransglutaminase tecidual (anti-tTG)

Foi realizada por método de ELISA, conforme descrito por Dieterich *et al.* (1997), utilizando Kit comercial (Inova, CA). A reação ocorre basicamente com o antígeno purificado de transglutaminase tecidual, extraído de fígado de cobaia e fixado às escavações em placa de poliestireno. Os soros controles (positivos e negativos) e os soros diluídos dos pacientes foram adicionados a cada escavação da placa, que após incubação (30 minutos à temperatura ambiente) possibilita que os anticorpos anti-transglutaminase tecidual presentes liguem-se ao antígeno imobilizado. Após a lavagem da placa e subsequente descarte do material não ligado, incubou-se as amostras em presença do conjugado de anticorpo anti-IgA ligado à peroxidase. As placas foram lavadas novamente e a atividade da enzima remanescente foi medida pela adição de um substrato cromogênico, que leva ao desenvolvimento de cor com intensidade diretamente proporcional à concentração de anticorpos anti-tTG presente nas amostras em análise. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada à $450\ \text{nm}$. O cálculo da concentração foi realizado conforme orientação do fornecedor. As amostras com resultados inferiores a 20 unidades foram consideradas negativas, conforme critérios do Kit utilizado.

Análise estatística

A correlação entre os títulos de EmA-IgA e as unidades de anti-tTG-IgA foi realizada utilizando o método de Pearson, do Programa "Statistica". Os cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo foram realizados de acordo com as fórmulas convencionais.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas determinações dos anticorpos EmA-IgA e anti-tTG-IgA podem ser observados na Tabela I. Esta evidencia a faixa de variação dos anticorpos anti-tTG-IgA, bem como a média destes, para cada título obtido para o anticorpo EmA-IgA. Verifica-se que 18,2% das amostras de pacientes celíacos ($n=10$) foram negativas para os dois métodos, caracterizando 100% de concordância entre os mesmos. Tais amostras compreendiam pacientes em dieta isenta de glúten.

Nas outras 45 amostras de soro de pacientes com DC, em uso de glúten, a concordância nos resultados foi em 84,4% das amostras ($n=38$, Tabela II). Enquan-

TABELA I
Resultados da Imunofluorescência Indireta para os anticorpos anti-antiendomíio (EmA-IgA) e do ELISA para os anticorpos anti-transglutaminase tecidual (anti-tTG-IgA)

EmA-IgA (títulos)*	Nº amostras (%)	anti-tTG-IgA** Média (variação)
Pacientes Celíacos ($n=55$)		
Negativo	10 (18,2%)	6,87 (2-15)
1:2,5	8 (14,5%)	15,5 (8-31)
1:5	5 (9,1%)	56,6 (6-117)
1:10	6 (11%)	145,3 (36-390)
1:20	8 (14,5%)	397 (106-640)
1:40	9 (16,3%)	281,44 (74-640)
1:80	9 (16,3%)	452,44 (102-640)
Grupos controles ($n=93$)		
Negativo	93 (100%)	6,5 (4-42)

* Foram consideradas positivas as amostras com títulos iguais ou superiores a 1:2,5.

** Foram consideradas positivas as amostras com resultados iguais ou superiores a 20 unidades.

TABELA II
Porcentagem de concordância na pesquisa dos anticorpos EmA-IgA e anti-tTG-IgA

Amostras ($n=148$)	% Positividade		% Concordância
	EmA-IgA	tTG-IgA	
Celíacos com glúten ($n=45$)	45 (100%)	38 (84,4%)	84,4%
Celíacos sem glúten ($n=10$)	0 (0%)	0 (0%)	100%
Controles sadios ($n=53$)	0 (0%)	3 (5,6%)	94,3%
Controles com doenças gastrointestinais ($n=40$)	0 (0%)	0 (0%)	100%

to todas as amostras apresentaram o EmA-IgA positivo ($n=45$), com títulos variando entre 1:2,5 a 1:80 (Tabela I), os anticorpos anti-tTG-IgA foram positivos em apenas 38 amostras (84,4%). Entre 15,6% (7/45) das amostras de pacientes com resultados discordantes, 5 daquelas com anticorpo anti-tTG-IgA negativo, apresentaram o anticorpo EmA-IgA com títulos 1:2,5 e 2 apresentaram o anticorpo EmA-IgA com título 1:5. Todas as amostras que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:10 para os anticorpos EmA-IgA também foram positivas para os anticorpos anti-tTG-IgA.

Nos soros do grupo controle sadio ($n=53$), três amostras foram positivas para o anti-tTG-IgA e todas foram negativas para o EmA-IgA, conferindo 94,3% de concordância entre os dois métodos, enquanto nos controles com doenças gastroenterológicas a concordância foi de 100%, com todas as amostras negativas pelos dois métodos.

Tais resultados conferiram sensibilidade e especificidade de 100% para o EmA-IgA, assim como para os valores preditivos positivo e negativo. Para o anti-tTG-IgA a sensibilidade foi 84,4%, a especificidade 96,7%, o valor preditivo positivo 92,7% e o valor preditivo negativo 92,8%.

A Figura 1 permite observar a variação dos resultados dos anti-tTG-IgA nos diferentes títulos do anticorpo EmA-IgA, nas amostras de pacientes celíacos, dei-

xando evidente a ampla faixa de resultados (unidades) possíveis de se obter para os anticorpos anti-tTG-IgA em cada título de EmA-IgA. O valor médio obtido está evidenciado na Tabela I.

A Figura 2 caracteriza, através da análise estatística pelo método de correlação de Pearson (Programa "Statistica"), o coeficiente de relação obtido entre os dois métodos empregados ($r=0,8107$).

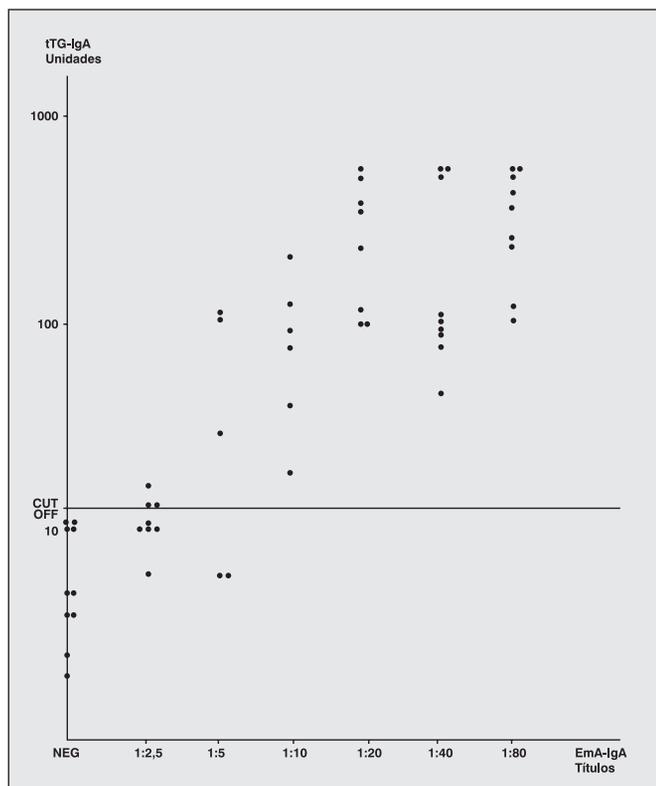


FIG. 1 - Títulos de anticorpos anti-endomísio × unidades de anticorpos antitransglutaminase tecidual.

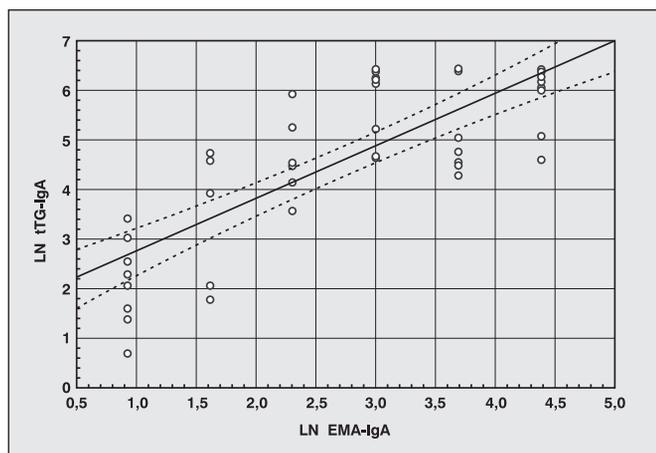


FIG. 2 - Anticorpos anti-endomísio × anticorpos antitransglutaminase. (Correlação: $r = ,81077$) Regression 95% confid.

DISCUSSÃO

Os avanços nos métodos sorológicos para diagnóstico da doença celíaca nas últimas duas décadas trouxeram benefícios e segurança tanto para os pacientes quanto para os médicos. Considerando-se que até en-

tão apenas critérios clínicos e histológicos eram disponíveis para o diagnóstico, a viabilização de métodos não invasivos veio favorecer o diagnóstico precoce dos pacientes, além de possibilitar amplos estudos de triagem em populações e em familiares de celíacos. Formas latentes ou atípicas da DC passaram a ser diagnosticadas mais facilmente, reduzindo o risco de linfomas intestinais naqueles indivíduos que adotam uma dieta isenta de glúten. Triagens de DC tornaram-se freqüentes em pacientes com *Diabetes mellitus* insulino dependente, doenças autoimunes da tireóide, deficiência pondero-estatural, diarreias crônicas e deficiência de IgA, entre outras patologias [Ferguson, 1996; Ferguson, 1998; Kotze, 2001(a)].

Apesar de ser considerada como "gold standard" no diagnóstico da DC, nem sempre a biópsia intestinal isoladamente consegue determinar com precisão este diagnóstico.

Embora os testes sorológicos iniciais, como o anti-reticulina e anti-gliadina, não apresentassem sensibilidade e especificidade ideais na DC, a padronização dos anticorpos anti-endomísio, em 1983 (Chorzelski, 1983), veio trazer confiabilidade ao diagnóstico sorológico, atingindo até 100% de especificidade e sensibilidade, conforme relatos de diferentes autores (Volta, 1995; Lock, 1999(a); Miller, 1999; Gillett, 2000). A descoberta em 1997, por Dieterich e colaboradores, de que a tTG tecidual é o principal antígeno do processo autoimune na DC permitiu esclarecer os principais aspectos da fisiopatogenia da doença, além de transformar a pesquisa dos anticorpos anti-tTG em um grande avanço diagnóstico. O uso do método de ELISA na investigação destes anticorpos tornou-o acessível aos diversos laboratórios, possibilitando estudos em larga escala e isentos das dificuldades de estrutura laboratorial e de variações de leitura inter-observadores, frequentes no método de Imunofluorescência Indireta (Palacios, 2000; Gillett, 2000).

Atualmente, diversos centros têm se voltado para estudos comparativos entre a pesquisa dos anticorpos EmA-IgA e anti-tTG-IgA, por Imunofluorescência Indireta e ELISA, respectivamente, visando determinar a relação entre os mesmos e, conseqüentemente, a confiabilidade para diagnóstico e monitoramento da doença (Levine, 2000; Palacios, 2000; Chan, 2001).

Os principais resultados obtidos no presente estudo estão representados nas Tabelas I e II. Verifica-se, no grupo de amostras de pacientes em dieta isenta de glúten, resultados negativos pelos dois métodos, caracterizando 100 % de concordância entre ambos. Dados semelhantes foram observados nos estudos de diversos autores (Dieterich, 1998; Palacios, 2000; Gillett, 2000), que confirmam a tendência do anti-tTG-IgA a desaparecer com a retirada do glúten alimentar, embora alguns estudos ainda caracterizem positividade para estes anticorpos, em baixos níveis e por um período de tempo mais prolongado, nas amostras de pacientes em dieta isenta de glúten (Miller, 1999; Sardy, 2000).

Nas amostras de pacientes celíacos em uso de glúten ($n=45$) a concordância dos resultados para o EmA-

IgA e anti-tTG-IgA foi de 84,4% (n=38). Sete pacientes (15,6%) com manifestações clínicas compatíveis com DC foram negativos para o anti-tTG-IgA e positivos para o EmA-IgA, com títulos de reação de 1:2,5 (n=5) e 1:5 (n=2). Embora alguns estudos revelem 100% de concordância nas determinações pelos dois métodos (Miller, 1999; Reeves, 2000), resultados similares ao nosso têm sido observados por outros autores, tais como Palacios *et al.* (2000) e Sugai *et al.* (2000), que obtiveram 84% e 87% de concordância, respectivamente, ao testarem o anti-tTG-IgA e EmA-IgA em soros de pacientes em uso de glúten.

No presente estudo, a sensibilidade e especificidade para os anticorpos EmA-IgA nos pacientes com consumo de glúten foi de 100%, enquanto para o anti-tTG-IgA foi de 84,4% e 96,7% respectivamente. Verifica-se que tais valores variam de um centro para outro, prevalecendo para o EmA-IgA uma sensibilidade na faixa de 89-100% e especificidade de 94-100%, enquanto para o anti-tTG-IgA observa-se a variação de 83-100% e 90-100%, respectivamente (Miller, 1999; Gillett, 2000; Levine, 2000; Palacios, 2000; Chan, 2001).

Os estudos de Koop *et al.* (2000) caracterizaram 76% de especificidade para o anti-tTG-IgA decorrente da positividade, em baixos níveis, observada nos grupos controles com doença inflamatória intestinal (15%), doença crônica do fígado (36%) e *Diabetes mellitus* (22%). Tais resultados não foram detectados no EmA-IgA. De forma similar, Reeves *et al.* (2000) obtiveram resultado falso-positivo para DC pela pesquisa do anti-tTG-IgA em pacientes com doença auto-imune sistêmica (25%), conferindo 61% de especificidade para o método, apesar de obter 100% de concordância entre o EmA-IgA e tTG-IgA nos pacientes com dieta contendo glúten. Tais dados evidenciam que, embora o anti-tTG-IgA em altos títulos só seja observado na DC e apresente uma excelente correlação com o EmA-IgA, os títulos baixos não podem ser considerados doença específica.

A Figura 1 é de grande aplicabilidade clínica e laboratorial. A padronização de novos métodos e os diversos estudos comparativos dificilmente evidenciam a correspondência entre os títulos de um método (EmA) com as unidades do outro (tTG). Na Figura 1 fica bem evidente a concordância entre as amostras negativas (100%), assim como destacam-se as 7 amostras positivas para Imunofluorescência Indireta (1:2,5 e 1:5) e negativas para o ELISA (tTG). No entanto, é possível também observar a amplitude de resultados do anti-tTG-IgA para cada título de EmA-IgA, principalmente a partir do título 1:10. Embora na Tabela I ressalte-se o valor médio obtido, é importante tanto a nível de laboratório quanto para o clínico estarem cientes da grande faixa de resultados de tTG-IgA (Unidades) possíveis de se obter diante de um mesmo título de EmA-IgA. Assim como pode-se obter valores próximos ou inferiores a 100 Unidades desde o título 1:10 até 1:80, é possível chegar a valores superiores a 600 Unidades. Verifica-se, ainda, mais especificamente nos títulos 1:40 e 1:80 do EmA-IgA, que não há uma correspondência na elevação de unidades de anti-tTG-IgA de forma totalmente linear.

Todos os aspectos anteriormente expostos são bastante compatíveis com o valor do coeficiente de relação obtido na análise dos dados deste estudo (Fig. 2; $r: 0,8107$). Outros autores, como Dieterich *et al.*, 1998 e Sugai *et al.*, 2000, também evidenciam uma correlação positiva do anticorpo anti-tTG-IgA com os títulos de EmA-IgA ($r=0,862$ e $r=0,902$ respectivamente). Sugai *et al.* ressalta que apesar de haver uma correlação altamente significativa entre os títulos, ainda ocorre uma superposição incompleta com os EmA-IgA, atingindo 13% de discordância nos casos de DC. Verificou-se tanto casos com anti-tTG-IgA negativos e EmA-IgA positivos (n=2), como o inverso (n=8). Nos controles isto não ocorreu. Estes também observam uma larga variabilidade de resultados inter laboratórios, possivelmente relacionado a fatores técnicos, e esperam que os kits comerciais ainda tenham como meta o firme propósito de eliminá-la, minimizando as discrepâncias e aumentando a acurácia dos testes.

Concluindo, é possível afirmar que a pesquisa dos anticorpos anti-tTG-IgA certamente consiste em um valioso avanço nos estudos de DC. Ao tornar o diagnóstico sorológico mais acessível a inúmeros laboratórios, além de favorecer os estudos populacionais e de familiares, passou a representar um importante recurso na seleção de candidatos à biópsias intestinais. Cabe a cada serviço, no entanto, adotar rígidos critérios em termos de correlação clínico-laboratorial. Os resultados do presente estudo evidenciaram que em pacientes celíacos com altos níveis de anticorpos há uma excelente correlação da pesquisa dos anticorpos anti-tTG-IgA com o EmA-IgA, não se incorrendo em risco de resultados falso-negativos. Entretanto, como evidenciado por alguns autores, baixos níveis de anti-tTG-IgA fazem superposição com outras doenças, especialmente as hepáticas (Koop, 2000; Reeves, 2000). Torna-se, assim, inquestionável a maior confiabilidade do EmA-IgA nas situações passíveis de baixos níveis de anticorpos, como no diagnóstico de crianças menores de 2 anos de idade, triagem de familiares e/ou monitoramento da dieta isenta de glúten.

No aspecto de custo do exame, a estrutura do laboratório é que vai representar o diferencial e mostrar a melhor opção metodológica. Para serviços que rotineiramente realizam técnicas de ELISA e já dispõem dos equipamentos necessários, certamente a pesquisa dos anticorpos anti-tTG-IgA vai se adequar melhor. Para laboratórios que dispõem de microscópio de fluorescência e criostato, sem dúvida a pesquisa do EmA-IgA por Imunofluorescência Indireta representará a melhor opção, com um custo bastante reduzido por exame, principalmente se o laboratório não depender da aquisição de lâminas de esôfago de macaco e tiver condições de preparar o próprio substrato da reação, com cortes criostáticos de cordão umbilical humano.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos de forma especial à Dr^a Margareth Gomes de Sena, pela gentileza de ceder-nos os soros de pacientes com doença de Crohn e com retocolite ulcerosa.

tiva, e à Srt^a Ivanilda Queiroz de Oliveira, pela realização dos cortes criostáticos de cordão umbilical humano.

REFERÊNCIAS

1. Arato, A.; Savilahti, E. Incidence of intestinal gamma/delta T cells in children with celiac disease and ulcerative colitis. *Orv. Hetil.*, 133(23):1425-32, 1992.
2. Challacombe, D. N. Screening tests for celiac disease. *Arch. Dis. Child.*, 73:3-7, 1995.
3. Chan, A. W.; Butzer, J. D.; McKenna, R. Tissue transglutaminase enzyme-linked immunosorbent assay as a screening test for celiac disease in pediatric patients. *Pediatrics*, 107(2):E8, 2001.
4. Chorzelski, T. P.; Sulej, J.; Tchorzewska, H.; Jablonska, S.; Beutner, E. H.; Kumar, V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 420:325-334, 1983.
5. Dieterich, W.; Ehnis, T.; Bauer, M.; Donner, P.; Volta, U.; Riecken, E. O.; Schuppan, D. Identification of the tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 3(7):797-801, 1997.
6. Dieterich, W.; Laag, E.; Schopper, H. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, 115(6):1317-21, 1998.
7. Ferguson, A. New perspectives of the pathogenesis of coeliac disease: evolution of a working clinical definition. *J. Int. Med.*, 240:315-318, 1996.
8. Ferguson, A.; Gillett, H.; Humphreys, K.; Kingstone, K. Heterogeneity of coeliac disease: clinical, pathological, immunological, and genetic. *Ann. NY Acad. Sci.*, 895:112-20, 1998.
9. Gillett, H. R.; Freeman, H. J. Comparison of IgA endomysium antibody and IgA tissue transglutaminase antibody in celiac disease. *Can. J. Gastroenterol.*, 14(8):665-6, 2000.
10. Houlston, R. S.; Ford, D. Genetics of celiac disease. *Q. J. Med.*, 89:737-43, 1996.
11. Koop, I.; Ilchmann, R.; Izzl, L. Detection of autoantibodies against tissue transglutaminase in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(8):2009-14, 2000.
12. Kotze, L. M. S. *Padrões histológicos e linfócitos intra-epiteliais da mucosa do intestino delgado nas diarreias crônicas*. Curitiba, 1988. [Tese Mestrado, Mestrado de Medicina Interna, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Paraná].
13. Kotze, L. M. S.; Utiyama, S. R. R.; Nisihara, M. R.; Mocelim, V.; Carvalho, R. F. A.; Zeni, M. P. B.; Amarante, H. M. S. Comparação dos anticorpos anti-reticulina e anti-endomísio classe IgA para diagnóstico e controle da dieta na doença celíaca. *Arq. Gastroenterol.*, 36(4):177-184, 1999.
14. Kotze, L. M. S. Distúrbios entéricos da absorção. In: Dani R. *Gastroenterologia Essencial*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001(a). pp.237-61.
15. Kotze, L. M. S.; Utiyama, S. R. R.; Nisihara, M. R.; Zeni, M. P. B.; Sena, M. G.; Amarante, H. M. S. Antiendomysium antibodies in Brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. *Arq. Gastroenterol.*, 38(2), 2001(b) (no prelo).
16. Ladinsker, B.; Rossipal, E.; Pittscheier, K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut*, 35:776-78, 1994.
17. Levine, A.; Bujanover, Y.; Reif, S. Comparison of assays for anti-endomysial and anti-transglutaminase antibodies for diagnosis of pediatric celiac disease. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2(2): 122-5, 2000.
18. Lock, R. J.; Gilmour, J. E.; Unsworth, D. J. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulín autoantibodies: the antibody trinity of coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 116(2):258-62, 1999(a).
19. Lock, R. J.; Pitcher, M. C.; Unsworth, D. J. IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy. *J. Clin. Pathol.*, 52(4):274-7, 1999(b).
20. Marsh, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. *Gastroenterology*, 102: 330-354, 1992.
21. Meuwisse, G. W. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr. Scand.*, 59:461-63, 1970.
22. Miller, A.; Paspaliaris, W.; Elliott, P. R. Anti-transglutaminase antibodies and coeliac disease. *Aust. N. Z. J. Med.*, 29(2): 239-42, 1999.
23. Molberg, O.; Mcadam, S.; Korner, R. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cell in celiac disease. *Nature Medicine*, 4(6): 713-17, 1998.
24. Molberg, O.; Mcadam, S. N.; Sollid, L. M. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(3):232-40, 2000.
25. Palacios, S. M.; Rivero, M. A.; Sanchez, V. V. F. The tissue transglutaminase antibody: usefulness in the diagnosis of celiac disease objective. *An. Esp. Pediatr.*, 53(6):542-546, 2000.
26. Reeves, G. E.; Burns, C.; Hall, S. T. The measurement of IgA and IgG transglutaminase antibodies in celiac disease: a comparison with current diagnostic methods. *Pathology*, 32(3):181-5, 2000.
27. Sardy, M.; Karpati, S.; Peterfy, F. Comparison of a tissue transglutaminase ELISA with the endomysium antibody test in the diagnosis of gluten-sensitivity enteropathy. *Z. Gastroenterol.*, 38(5):357-64, 2000.
28. Schuppan, D.; Dieterich, W.; Riecken, E. O. Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes. *Nature Medicine*, 4(6):666-667, 1998.
29. Schuppan, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 119:234-42, 2000.
30. Seah, P. P.; Fry, L.; Holborow, E. J. *et al.* Antireticulin antibody: incidence and diagnostic significance. *Gut*, 14:311-15, 1973.
31. Sugay, E.; Selvaggio, G.; Vazquez, H.; Viola, M.; Mazure, R.; Pizarro, B.; Smecuol, E.; Flores, D.; Pedreira, S.; Maurino, E.; Gomes, J. C.; Bai, J. C. Tissue transglutaminase antibodies in celiac disease: assessment of a commercial kit. *Am. J. Gastroenterol.*, 95(9): 2318-22, 2000.
32. Sulkanen, S.; Halttunen, T.; Laurila, K. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*, 115:1322-25, 1998.
33. Troncone, R.; Greco, L.; Mayer, M.; Paparo, F.; Caputo, N.; Micilli, M. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr. Suppl.*, 412:10-14, 1996.
34. Utiyama, S. R. R.; Ioshii, S. Doença celíaca: uma visão atual. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 30(3):151-54, 1998.
35. Vasquez, H.; Sugai, E.; Pedreira, S.; Katz, S.; Litwin, N.; de Rosa, S.; Ruiz, J. Screening for asymptomatic celiac sprue in families. *J. Clin. Gastroenterol.*, 21(2):130-3, 1995.
36. Volta, U.; Molinaro, N.; Franceschi, L.; Fratangelo, D.; Bianchi, F. B. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. *Dig. Dis. Sci.*, 40:1902-905, 1995.
37. Walker-Smith, J. A.; Guandalini, S.; Schimtz, J.; Schmerling, D. H.; Visconti, J. K. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch. Dis. Child.*, 65:909-11, 1990.

Endereço para correspondência:

Prof. Shirley Ramos da Rosa Utiyama

Laboratório de Imunopatologia - Departamento de Patologia Médica

Setor de Ciências da Saúde

Rua Padre Camargo, 280 - 80069-900 - Curitiba - Paraná - Fax: 264-4191

XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS

II CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA

CENTRO DE CONVENÇÕES EDSON QUEIROZ

FORTALEZA - CEARÁ

26 a 30 maio de 2002

Naja Turismo Ltda.

Agência oficial do evento, credenciada para reservas de hotéis e passagens aéreas

Rua Carolina Sucupira, 480 - Aldeota - Fortaleza - Ceará

Tel.: (0xx85) 244-6985 - Fax: (0xx85) 261-7830

E-mail: eventos@najatour.com.br

http://www.najatour.com.br

Freqüência de candidíase na mucosa bucal de pacientes portadores de SIDA na cidade de Fortaleza, Ceará*

Candidiasis frequency in the oral mucous membrane from AIDS patients in Fortaleza, Ceará

Everardo Albuquerque Menezes¹, Shirleyde Alves dos Santos², Maria Neuman Ricarte Monteiro¹, Ticiane Mont'alverne Lopes Parente³, Caio César Furtado Freire³ & Maria Rosimeire Vieira Florêncio³

RESUMO – A candidíase oral pode ser considerada a micose oportunista mais comum em pacientes portadores do vírus HIV. A espécie de *Candida* encontrada com maior freqüência é a *Candida albicans*, mas outras espécies como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, também têm sido isoladas. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de *Candida* isoladas da mucosa oral de pacientes portadores de SIDA, internados em um hospital na cidade de Fortaleza, Ceará. Das amostras coletadas de 200 pacientes, 100 (50%) foram positivas para *Candida* spp e destas, 52 (52%) para *Candida albicans*.

PALAVRAS-CHAVE – *Candida albicans*, micoses, SIDA

SUMMARY – Oral candidiasis can be related as the more common opportunistic mycosis described in Human immunodeficiency virus positive patients. The specie that appears in major cases is *Candida albicans*, although some other species are also documented, like: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. The aim of this work was to identify *Candida* spp in the oral mucous membrane of AIDS patients at the hospital in Fortaleza, Ceará. From the samples collected out of 200 patients, 100 (50%) were positive to *Candida* spp and within them, 52 (52%) were *Candida albicans*.

KEYWORDS – *Candida albicans*, mycosis, AIDS.

INTRODUÇÃO

A candidíase constitui qualquer infecção causada por fungos do gênero *Candida* e pode ser classificada como doença superficial ou profunda. O habitat desses fungos é muito amplo: a *Candida albicans*, por exemplo, pode ser isolada da boca, tubo digestivo, intestino, orofaringe, vagina e pele de indivíduos saudáveis, causando infecções, principalmente, de origem endógena. Aproximadamente 25% a 30% dos indivíduos são portadores de *C. albicans* na cavidade oral, 50% no trato gastrointestinal e cerca de 30% das mulheres tem colonização vaginal em algum momento. Além da *C. albicans*, também têm sido identificadas, nessas infecções, as espécies: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e outras^{2,5,9}.

Com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que tem como agente etiológico o vírus HIV, observou-se a elevada incidência de infecções causadas por patógenos oportunistas, microorganismos que causam doenças apenas quando um ou mais dos sistemas de defesa do organismo es-

tão alterados. Na micologia, a ocorrência de micoses oportunistas causadas tanto por fungos oportunistas como por fungos naturalmente patogênicos tem aumentado significativamente, e a candidíase apresenta-se como a micose oportunista mais comum em pacientes imunodeprimidos⁵.

As formas clínicas da candidíase podem ser: mucocutânea, cutânea e sistêmica. Na candidíase mucocutânea os tecidos mais atingidos são os da mucosa oral e vaginal; na cutânea as áreas intertriginosas úmidas são envolvidas, como os espaços interdigitais das mãos e dos pés, sulco submamário na mulher, axilas e pregas inguinais; e na sistêmica, as *Candida* spp podem atingir diversos órgãos, causando candidíase pulmonar, endocardite, fungemia e nefrite^{2,3}.

A candidíase oral pode se manifestar de quatro formas: na forma pseudomembranosa, é caracterizada por placas esbranquiçadas superficiais elevadas, semelhantes a coágulos de leite, facilmente removíveis e revelando uma base eritematosa; na forma eritematosa (ou atrófica), caracteriza-se por placas atróficas, vermelhas e planas; na forma hipertrófica, a superfí-

Recebido em 19/9/2001

Aprovado em 10/1/2002

*Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LPM) do Grupo de Estudos em Microbiologia Médica (GEMM) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Faculdade de Farmácia (FFOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC)

¹Prof. de Microbiologia do DACT/FFOE/UFC; ²Aluna de Mestrado em Saúde Pública da UFC; ³Bolsistas do PIBIC/CNPq - LPM/GEMM/DACT/FFOE/UFC

cie inferior da língua ou do palato pode estar envolvida e a mucosa bucal é caracterizada por uma placa elevada não removível; a forma de queilite angular é associada com lesões crostosas, fissuradas, vermelhas (que podem ser ulceradas) no canto da boca. Esta infecção pode propagar-se à faringe, à laringe, ao esôfago e disseminar-se por via hematogênica^{5,10}.

Frete ao que foi relatado, o objetivo desse estudo foi identificar as *Candida* spp na mucosa oral de pacientes HIV+ na cidade de Fortaleza/CE fornecendo, assim, importantes dados epidemiológicos da infecção por *Candida* nesse grupo de pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de Janeiro a Dezembro de 2000, foram coletadas amostras de secreção da cavidade bucal de 200 pacientes com SIDA, internados no Hospital São José, na cidade de Fortaleza, Ceará para a identificação de *Candida* spp.

Coleta e processamento das amostras

As amostras de secreção da cavidade bucal dos pacientes foram coletadas com swab estéril, semeadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C por 48 horas.

Identificação das culturas positivas

As culturas positivas para *Candida* spp foram identificadas pelas suas características macroscópicas, prova do Tubo Germinativo, Zimograma e Auxanograma³.

RESULTADOS

Foram positivas para *Candida* spp 100 (50%) amostras das 200 amostras coletadas (Figura 1). Das 100 amostras negativas, 80 (80%) foram coletadas de pacientes que estavam em tratamento com antifúngicos (Figura 2). Das 100 amostras positivas, 52 (52%) eram *C. albicans*, 30 (30%) *C. tropicalis*, 6 (6%) *C. stellatoidea*, 6 (6%) *C. krusei* e 6 (6%) *C. guilliermondii* (Figura 3).

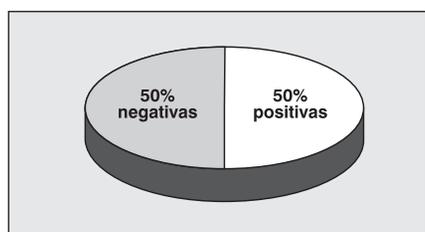


FIG. 1 - Frequência de amostras positivas e negativas.

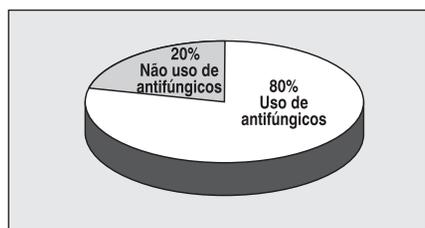


FIG. 2 - Frequência de pacientes em uso de antifúngicos nas amostras negativas.

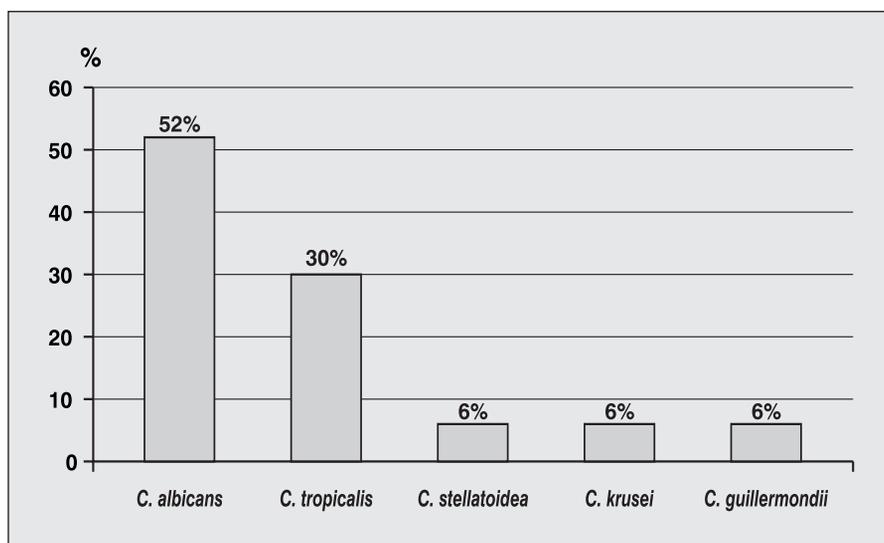


FIG. 3 - Distribuição das espécies de candida encontradas

DISCUSSÃO

A presença de afecções bucais em pacientes HIV positivos deve ser considerado como um sinal de alerta de progressão da imunodeficiência, por isso o exame da cavidade oral de todo paciente infectado pelo HIV é de suma importância⁷.

A candidíase destaca-se como sendo frequentemente a primeira infecção oportunista que surge nesses pacientes e, apesar da *Candida albicans* ser a principal espécie envolvida nessas infecções, outras espécies de *Candida* estão se destacando cada vez mais como agentes etiológicos^{1,7}. A importância das candidíases de mucosa em pacientes com SIDA está na recorrência, o que caracteriza uma morbidade significativa. O estado imunológico desses pacientes pode ainda ser piorado devido à má nutrição, decorrente da dificuldade de alimentação provocada por uma candidíase orofaríngea⁸.

No nosso trabalho, o resultado positivo para candidíase foi encontrado em 50% das amostras pesquisadas, sendo que 80 (80%) dos 100 pacientes com amostras negativas estavam em uso de antifúngicos, fator importante na inibição do crescimento dessas leveduras. A *Candida albicans* foi a principal espécie encontrada, identificada em 52% das amostras positivas, dado este que condiz com os estudos realizados em pacientes com SIDA no Brasil. Segundo Oliveira (1993), a frequência de *Candida albicans* isoladas de pacientes imunocomprometidos foi de 66,6%, na cidade de Natal - RN, o nosso resultado foi parecido com os pacientes de Natal.

O estudo epidemiológico da candidíase oral realizado por Maffei (1996) em São Paulo, mostra uma frequência de 48% em indivíduos portadores do vírus HIV e 93% em indivíduos com imunodeficiência progressiva e SIDA, no nosso trabalho verificamos a frequência de 52% em indivíduos portadores e em indivíduos com os sintomas da síndrome, os resultados estão compatíveis, já que nós não dividimos como Maffei (1996).

Silva (1999) na cidade de Goiânia observou uma frequência de 52 cepas de *Candida albicans* em 59 leveduras isoladas da mucosa bucal de 86 pacientes com AIDS. Neste mesmo trabalho, apenas 7 (11,9%) leveduras pertenciam a outras espécies não *albicans*, destas, 4 eram *Candida tropicalis* e 3 *Candida krusei*. No nosso trabalho, observamos que 52 eram *C. albicans*, 30 *Candida tropicalis*, 6 *Candida stellatoidea*, 6 *Candida krusei* e 6 *Candida guilliermondii*. Os dados foram compatíveis, levando em consideração que estudamos 200 amostras e Silva (1999) 86.

Pesquisas desta natureza estão sendo realizadas em todo o mundo, podendo trazer diagnóstico benéfico aos pacientes imunocomprometidos, com o isolamento de fungos que podem causar infecções no futuro.

CONCLUSÕES

- A ocorrência de espécies de *Candida* na mucosa oral de pacientes portadores de SIDA internados no Hospital São José, Fortaleza/CE foi de 50%.
- 80% dos pacientes com amostras negativas para *Candida* spp estavam em tratamento com antifúngicos.
- A ocorrência de *Candida albicans* foi predominante, representando 52% (52/100) das amostras positivas.
- A ocorrência de outras espécies de *Candida* foi: 30% (30/100) *Candida tropicalis*, 6% (6/100) *Candida stellatoidea*, 6% (6/100) *Candida krusei* e 6% (6/100) *Candida guilliermondii*.

REFERÊNCIAS

1. Kern, M. E.; Blevins, K. S. *Micologia Médica: Texto & Atlas*. 2ª ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999. pp.162-6.
2. Koneman, E. W.; Allen S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr, W. C. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth Edition, Philadelphia-NewYork: Lippincott, 2001.
3. Lacaz, C. S.; Porto, E.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. *Guia para identificação de interesse Médico-Fungos, Actinomicetos, Algas*. São Paulo; Editora Sarvier, 1998.
4. Maffei, C. M. L. *Amostras de Candida albicans isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica*. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Microbiologia; 1996.
5. Marques, A. R.; Masur, H. Infecções oportunistas: clínica, diagnóstico e tratamento. In. Veronesi, R. *Retrovírus Humanos - HIV/AIDS - Etiologia, patogênese, patologia clínica, tratamento e prevenção*. São Paulo; Editora Atheneu; 1999. pp.129-173.
6. Oliveira, M. T. B. *Estudo da mucosa bucal de pacientes imunocomprometidos no Estado do Rio Grande do Norte*. Dissertação apresentada no departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP, para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia; 1993.
7. Rachid, M.; Schechter, M. *Manual de HIV/AIDS*. 6ª ed. Rio de Janeiro; Revinter, 2001. pp.65-5.
8. Silva, M. R. R. *Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de Candida albicans isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS*. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Microbiologia; 1999.
9. Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F.; Candeias, J. A. N. *Microbiologia*. 3ª ed. São Paulo; Editora Atheneu, 1999.
10. Zaitz, C.; Campbell, I.; Marques, S. A.; Ruiz, L. R. B.; Souza, M. S. *Compendio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro; MEDSI Editora Médica e Científica Ltda; 1998. p.325-338.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes
Laboratório de Pesquisa em Microbiologia/GEMM/DACT/FFOE/UFC
Rua Cap. Francisco Pedro, 1210 - Rodolfo Teófilo - 60430-370 - Fortaleza - CE
E-mail: menezes@ufc.br

Próximo concurso do TEAC

O próximo concurso para a outorga do Título de Especialista em Análises Clínicas será realizado durante o XXIX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e está previsto para os dias 25/05 e 26/05/2002, em Fortaleza - CE.

A taxa de inscrição para o TEAC será de R\$ 170,00, devendo ser feita através de cheque nominal à SBAC. Para os inscritos no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, haverá um desconto de 50% na inscrição para o concurso do TEAC, devendo ser formalizada até 30 dias antes do início do evento.

***E no caso de dúvida, entre em contato
através dos tel/fax (21) 2264-4449 e 2204-0245
ou através do e-mail: teac@sbac.org.br***

Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em pacientes atendidos no Laboratório Celso Matos - Santarém, PA

Ocurrence of antitoxoplasma antibodies in patients attended in the Celso Matos Laboratory - Santarém, Pará

Adjanny Estela Santos de Souza^{1,2}; Domingos Conceição de Sousa¹; Janusa Guimarães Gomez² & Celso de Souza Matos²

RESUMO – A Toxoplasmose, zoonose de felídeos, causada pelo *Toxoplasma gondii* é uma infecção de alta prevalência sorológica que atinge grande parte da população de nossa cidade. No período de agosto de 1997 a junho de 1999, foi realizada análise do perfil sorológico de 601 pacientes, incluindo crianças, jovens e adultos, dispensando atenção especial às pacientes grávidas. Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório Celso Matos. A metodologia utilizada para detecção de anticorpos foi o ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados mostram índice crescente de positividade de acordo com a idade, sendo mais evidente em indivíduos adultos. 68,3% das pacientes grávidas apresentaram IgG antitoxoplasma. O índice de anticorpos na população santarena pode estar relacionada à localização geográfica, níveis de higiene e hábitos alimentares que têm claramente um papel importante na prevalência da doença.

PALAVRAS-CHAVE – Toxoplasmose, imunodiagnóstico, anticorpos.

SUMMARY – The toxoplasmosis, a zoonose of felines, the group of cats, caused by *Toxoplasma gondii* is an infection with great serological prevalence, which infect part of the population in our city. In the period from August/97 to June/99 were attended 601 patients, including children, youngs and adults, specially the pregnant. The serological tests were done at the Celso Matos Laboratory. The enzymeimmunoassay (ELISA) was the method used to detect the antibodies. The index of positive cases varied according to the age. The positive cases were more evidents in adult people. In the group of pregnant, 68.3% were immune, because they demonstrate to have IgG antitoxoplasma. The index of prevalence in the santarena population could be the according with the citation, attended the geographical localization, alimentation habits, mainly meals and hygiene levels.

KEYWORDS – Toxoplasmosis, immunodiagnosis, antibodies.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, zoonose de felídeos causada pelo *Toxoplasma gondii*, está universalmente disseminada, infectando aves e mamíferos e, notadamente o ser humano, com níveis de prevalência revelada por anticorpos séricos. Esta prevalência é crescente com os grupos etários, atingindo valores variáveis para diferentes populações, de 30, 50 ou mesmo 90% em indivíduos adultos. (Camargo, 1996).

O contágio se dá, predominantemente, pela ingestão de oocistos eliminados pelas fezes de gatos ou de outros felídeos, que podem permanecer viáveis no solo por longo período e ocorre ainda pelo consumo de alimentos de origem animal, especialmente de carnes mal cozidas contendo cistos (bradizoítos) do parasito.

Apesar do índice de infecção ser bastante alto no homem, a doença causada pelo parasito é relativa-

mente rara. Sua importância médica deve-se, entretanto, a dois fatores: a infecção congênita e a infecção em pacientes imunodeprimidos. (Lainson, 1997).

Este trabalho tem como objetivo investigar a prevalência de toxoplasmose em pacientes atendidos pelo Serviço de Imunologia do Laboratório Celso Matos, verificando a incidência de diferentes Classes de anticorpos (IgG e IgM), estabelecendo o grau de evolução da infecção em relação à presença destes anticorpos.

MATERIAL E MÉTODOS

O município de Santarém, onde o estudo foi realizado, situa-se no Oeste do Estado do Pará, ocupando uma área de 24.154 km², com uma população estimada de 242.165 habitantes. (IBGE, 1996)

O estudo é referente ao período de agosto de 1997 a junho de 1999, no qual foi realizada análise do perfil sorológico de 601 pacientes atendidos no Laboratório

Recebido em 22/1/2001

Aprovado em 9/8/2001

¹Coordenação de Biologia - Faculdades Integradas do Tapajós - FIT - Santarém-Pará;

²Laboratório Celso Matos - Santarém-Pará.

Celso Matos para toxoplasmose. O método utilizado para determinação do perfil sorológico dos pacientes através da detecção de anticorpos das classes IgG e IgM foi o ensaio imunoenzimático (ELISA) e, para verificar possíveis relações com a presença de anticorpos antitoxoplasma, coletou-se informações de idade, sexo, gravidez dos pacientes atendidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aparecimento de anticorpos para toxoplasmose, assinalando a soroconversão dos testes sorológicos de negatividade para positividade, traduz a resposta imunológica humoral à infecção recém adquirida (Camargo, 1996). As curvas de ascensão e queda de títulos dos diferentes anticorpos na toxoplasmose obedecem, a ritmos diversos. Assim, a presença de IgM é interpretada como sinal de infecção aguda ou marca de contágio recente e, quando anticorpos da classe IgG encontram-se em níveis elevados ou decrescentes com a IgM não reagente, indica final de fase aguda, e níveis estáveis de IgG são assumidos como infecção passada, conferindo imunidade (Tedesco, 1999).

Em Santarém, os resultados mostram que de um total de 601 pacientes, 434 (72,2%) apresentam anticorpos antitoxoplasma, sendo 366 (60,9%) da classe IgG, 35 (5,8%) da classe IgM e 33 (5,5%) IgG e IgM simultaneamente (Figura 1).

Estes resultados mostram concordância com a revisão na literatura escrita no período de 1962 a 1977, por Fraiha (1983), sobre vários levantamentos sorológicos na Região Amazônica. Em geral, a prevalência de anticorpos contra o *Toxoplasma* é semelhante àquela encontrada em outras partes do mundo, com índice de positividade variando entre 20 e 83%, e com a maioria dos autores registrando percentuais acima de 55%, segundo Laison, 1997.

Em relação à faixa etária, a maior prevalência ocorreu em pacientes com idade acima de 18 anos (65,6%). (Tabela I). Entre as 41 pacientes grávidas atendidas pelo Serviço 34 (82,9%) apresentaram-se positivas, sendo 28 (68,3%) com anticorpos da classe IgG, 3 (7,3%) IgM e também 3 (7,3%) com IgG e IgM simultaneamente. (Tabela II).

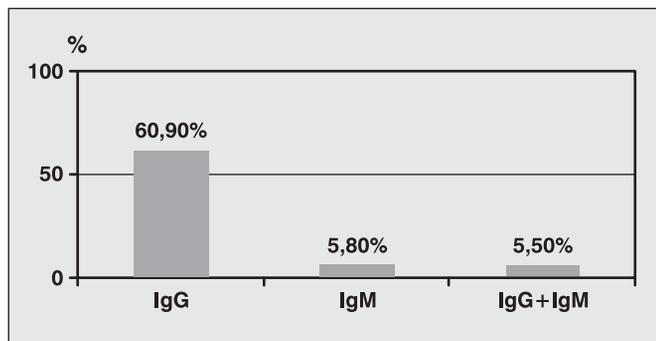


FIG. 1 - Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em 601 pacientes atendidos no Laboratório Celso Matos, Santarém-PA, 1997-1999.

Fonte: Serviço de Imunologia - Laboratório Celso Matos

TABELA I
Índice de positividade de toxoplasmose por faixa etária em 601 pacientes atendidos no Laboratório Celso Matos - Santarém-Pará, 1997-1999.

Índice (%)	Faixa etária			
	0 a 9 anos	10 a 18 anos	acima de 18 anos	Total
Positivo	37,4	65,3	65,6	62,2
Negativo	62,9	34,7	34,3	37,8

Fonte: Serviço de Imunologia - Laboratório Celso Matos.

TABELA II
Perfil sorológico de 317 mulheres em idade fértil atendidas no Laboratório Celso Matos - Santarém-Pará, 1997-1999.

Mulheres	Anticorpos antitoxoplasma				
	IgG	IgM	IgG + IgM	Total	(%)
Grávidas (41)	28	03	03	34	82,9
Não Grávidas (276)	167	19	13	205	74,2

Fonte: Serviço de Imunologia - Laboratório Celso Matos.

CONCLUSÃO

Foi constatado índice crescente de positividade com o aumento da idade e alto índice de prevalência de anticorpos séricos para toxoplasmose (72,2%). Entre as grávidas esse índice chega a 82,9%; esta incidência pode estar relacionada à localização geográfica pois, segundo Laison, a infecção por *Toxoplasma* tem uma prevalência mais alta nas regiões tropicais ou subtropicais de clima úmido, que favorece a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente. Os vários níveis de higiene e os hábitos alimentares tem claramente um papel importante na prevalência da toxoplasmose. As medidas preventivas devem concentrar-se visando controlar os mecanismos de transmissão.

REFERÊNCIAS

1. Camargo, M. E. Toxoplasmose. In: Ferreira, A. W.; Ávila, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.165-173. 1996.
2. Instituto de Desenvolvimento Econômico Social do Pará. *Boletim Estatístico*. Belém, v.2, n.1, 208p. 1996.
3. Laison, R.; Leão, R. N. Q.; Crescente, J. A. B. Toxoplasmose. In: Leão, R. N. Q. *Doenças infecciosas e parasitárias. Enfoque amazônico*. Belém: Cejup, 1997. p.671-683.
4. Tedesco, D.; Biachon, C.; Cardoso, N.T.; Ricachenesky, C. Comparação entre duas metodologias no diagnóstico da toxoplasmose. *Revista News-Lab*. 32:116-122, 1999.

Endereço para correspondência:

Profª Adjanny Estela

Faculdades Integradas do Tapajós - Coordenação de Biologia

Rua Rosa Vermelha, 335 - Aeroporto Velho - 68010-200

E-mail: fit@fit.br

Identificação de anemia ferropriva e parasitoses intestinais em um povoado de Feira de Santana – Bahia (Matinha dos Pretos), maio/1999 – outubro/2000

Identification of ferroprivas anaemia and intestinals parasitosis in “Matinha dos Pretos”, Feira de Santana – BA, Brazil (May/1999 to October/2000)

Dr^a Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira¹; Prof. João Francisco dos Santos²; Jéssua Maria Leite Bringel³; Joelande Esquivel Correia⁴; Luciara Alves da Cruz Luz⁴; Patrícia Carneiro da Silva⁵ & Alany Santos Oliveira⁵

RESUMO – No presente trabalho foi avaliada a ocorrência de anemia ferropriva e parasitoses intestinais, em 987 indivíduos do povoado de Matinha dos Pretos – Feira de Santana – Bahia, no período de maio/99 a outubro/00, com o objetivo de tratar pessoas infestadas e/ou anêmicas e introduzir, na população, medidas profiláticas no combate às infestações parasitárias. Foram examinadas 987 amostras de sangue e 937 amostras de fezes pelos Laboratórios de Análises Clínicas e Parasitologia Humana da UEFS, respectivamente. A análise dos dados obtidos foi feita usando-se como parâmetros idade, sexo e percentual de positividade parasitária e sua relação com a presença de anemia. Foram identificados 129 indivíduos com níveis de hemoglobina abaixo do normal e 642 indivíduos infestados por parasitas intestinais. Os parasitos mais freqüentemente observados foram Ancylostomatidae (39,3%), *Entamoeba histolytica* (17%) e *Ascaris lumbricoides* (16,2%). As mulheres com mais de 12 anos apresentaram índices de anemia mais elevados do que os homens. O trabalho desenvolvido possibilitou a detecção e o tratamento de diversas parasitoses associadas, ou não, à anemia e a orientação profilática oferecida contribuiu para a melhoria da qualidade de vida do povoado estudado.

PALAVRAS-CHAVE – Parasitoses intestinais; anemia ferropriva.

SUMMARY – The occurrence of Ferropriva Anaemia and intestinal parasitosis in 987 people from Matinha dos Pretos, Feira de Santana, Bahia, Brazil was evaluated during May/1999 to October/2000. This work aimed at treating infested and/or anaemic people and introducing, prophylactic measures to fight by parasitary infestations. 987 blood samples and 937 fecal samples were examined by the Human Parasitology and Clinical Analysis Laboratories at UEFS, respectively. Age, gender and parasitary percentage, as well as their relation to the presence of anaemia were used as standards for analysis. 129 people were identified as having levels of hemoglobin lower than normal and 642 people were found by intestinal parasites. The kind of parasites most commonly found were Ancylostomatidae (39.3%), *Entamoeba histolytica* (17%) and *Ascaris lumbricoides* (16.2%). Women over 12 years old showed levels of anaemia higher than men. This work enabled to find the treatment of many parasitosis associated or not to anaemia and the development of measures to improve the quality of living to these people.

KEYWORDS – Intestinal parasitosis, ferroprive anaemia.

INTRODUÇÃO

Parasitismo é a associação entre seres vivos em que existe unilateralidade de benefícios, sendo um dos associados prejudicados pela associação (Neves, 1998). Nas parasitoses intestinais humanas, um dos prejuízos decorrentes desta associação é a anemia.

A presença dos parasitos no hospedeiro desencadeia ações: espoliativa, tóxica, mecânica, traumática, irritatória, enzimática e anóxica. No caso da ação espoliativa, o parasito absorve nutrientes ou até mesmo o sangue da

mucosa intestinal do hospedeiro (para obtenção de Ferro e O²), levando o indivíduo a um quadro anêmico.

Anemia é caracterizada, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, como uma diminuição nos níveis de hemoglobina, abaixo do nível mínimo estipulado por este órgão.

A distribuição das parasitoses está estreitamente relacionada às condições ambientais favoráveis à sua disseminação, tais como: ausência de saneamento básico, deficiência de hábitos de higiene pessoal e alimentar, entre outros.

Recebido em 16/8/2001

Aprovado em 28/11/2001

¹Professora Doutora Titular da disciplina Genética e Evolução e Diretora do Depto. de Ciências Biológicas da Univ. Estadual de Feira de Santana - UEFS

²Professor Adjunto da disciplina Parasitologia Humana do Depto. de Ciências Biológicas da UEFS; ³Bolsista do Laboratório de Análises Clínicas da UEFS

⁴Biólogos do Laboratório de Análises Clínicas da UEFS; ⁵Biólogas do Laboratório de Parasitologia Humana da UEFS

O presente trabalho teve como objetivo verificar a incidência de anemia e parasitoses intestinais na população da Matinha dos Pretos – Feira de Santana/Bahia. Os habitantes deste povoado vivem em condições extremamente precárias, onde a falta de saneamento básico, de condições mínimas de moradia e higiene propiciam o aparecimento de doenças parasitárias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espaço geográfico

Matinha dos Pretos é um povoado do Município de Feira de Santana, distando deste 14km, localizado no Distrito de Maria Quitéria (São José), formado por 1303 indivíduos (Lopes, 2000, comunicação pessoal). Sua população vive em condições extremamente precárias, constituindo-se a agricultura de pequeno porte em sua principal fonte de renda.

A origem do povoado, segundo moradores antigos, remonta ao século XIX e foi estabelecida a partir de escravos fugitivos da Fazenda Candeal que lá encontraram refúgio na mata cerrada, o que deu origem ao nome Matinha dos Pretos.

Método de análise

O trabalho foi conduzido no período de maio/1999 a outubro/2000 atendendo 987 cidadãos do povoado de Matinha dos Pretos.

As coletas foram realizadas com consentimento informado da população; as amostras de sangue foram

coletadas em tubos contendo EDTA, devidamente acondicionadas e transportadas para o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foi realizado o Eritrograma para pesquisa de anemia.

O material fecal foi coletado por cada indivíduo em recipientes apropriados, sem uso de conservantes; acondicionado e transportado para o Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram realizados os exames parasitológicos, com o emprego do método de Hoffman, Pons & Janer (Sedimentação espontânea).

RESULTADOS

Os 987 indivíduos foram atendidos na Associação Comunitária de Matinha dos Pretos (ACOMA) para a coleta de sangue e/ou fezes.

Das 937 amostras de fezes examinadas, 642 (68,5%) apresentaram parasitoses intestinais (Tabela I), e das 987 amostras de sangue, 129 (13,07%) apresentaram anemia (Figura 1).

Os parasitas mais observados foram: *Ancylostomatidae* (47,04%), *Entamoeba histolytica* (16,9%) e *Ascaris lumbricoides* (18,06%), (Tabela II).

Em 58,9% dos indivíduos anêmicos foi detectada a presença de helmintos e/ou protozoários associados (Figura 2).

As mulheres com mais de 12 anos apresentaram índices de anemias mais elevados que os homens (Tabela III).

TABELA I
Percentual de positividade para parasitas intestinais em 937 indivíduos do povoado de Matinha dos Pretos – Feira de Santana - BA

Analisados	Total de indivíduos			
	Infetados		Negativos	
	Nº	%	N	%
937	642	68,5	295	31,5

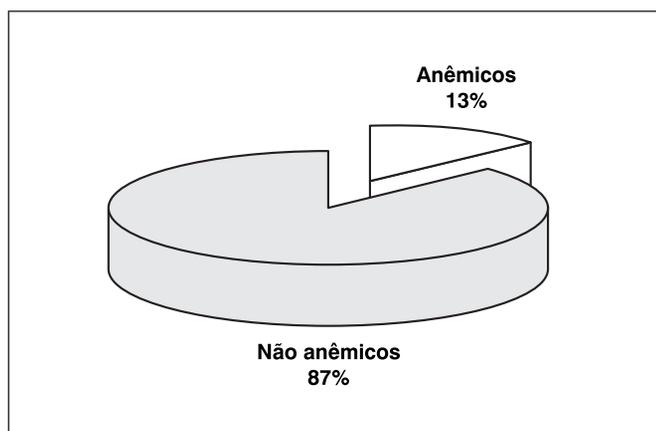


FIG. 1 - Percentual de anêmicos em 987 indivíduos do Povoado de Matinha dos Pretos - Feira de Santana - BA

TABELA II
Incidência de helmintos e protozoários em 642 indivíduos do povoado da Matinha dos Pretos – Feira de Santana - BA

Helmintos e protozoários	Incidência	
	Nº	%
<i>Entamoeba coli</i>	358	55,76
<i>Ancylostomatidae</i>	302	47,04
<i>Entamoeba histolytica</i>	109	16,9
<i>Ascaris lumbricoides</i>	116	18,06
<i>Trichuris trichiura</i>	78	12,15
<i>Endolimax nana</i>	47	7,32
<i>Giardia lamblia</i>	40	6,23
<i>Iodoamoeba butschilii</i>	51	7,94
<i>Schistosoma mansoni</i>	21	3,27
<i>Enterobius vermicularis</i>	21	3,27
<i>Hymenolepis nana</i>	03	0,47
<i>Hymenolepis diminuta</i>	01	0,15

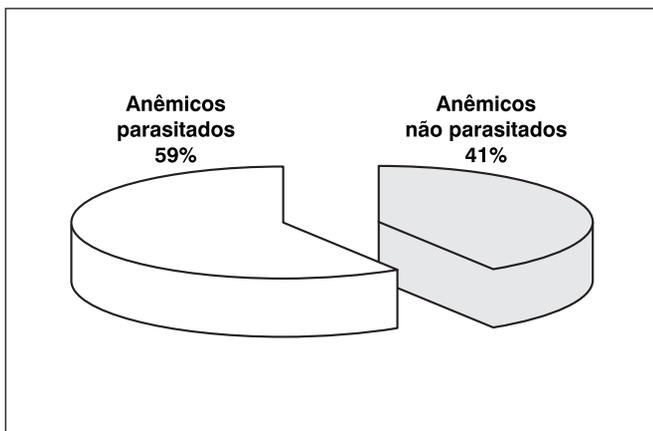


FIG. 2 - Percentual de indivíduos anêmicos e parasitados no povoado de Matinha dos Pretos – Feira de Santana – BA

TABELA III
Distribuição de casos de anemias por sexo e idade em indivíduos do povoado da Matinha dos Pretos – Feira de Santana - BA

Sexo/Idade	Nº	%
Masculino até 6 anos	26	20,1
Masculino de 6 a 12 anos	16	12,4
Masculino acima de 12 anos	23	17,8
Feminino até 6 anos	12	9,3
Feminino de 6 a 12 anos	04	3,1
Feminino acima de 12 anos	48	37,2
Total	129	100

DISCUSSÃO

Os resultados dos exames parasitológicos revelaram um alto índice de parasitoses, decorrentes das precárias condições de saneamento básico e educação sanitária vigente no povoado estudado.

O índice de indivíduos anêmicos que não apresentaram parasitoses procede, uma vez que a anemia pode ser causada por outros fatores como as condições nutricionais do hospedeiro ou outras doenças de base.

O índice mais elevado para *Ancylostomatidae* deve-se à sua forma de transmissão, uma vez que a maioria dos indivíduos trabalha na lavoura; além da falta de cuidados higiênicos.

A presença de anemia associada a parasitas, supostamente, deve-se à ação espoliativa do parasita, levando o indivíduo à subnutrição e depauperamento físico (*A. lumbricoides*), ação hematofágica (*Ancylostomatidae*), ou à ulceração de mucosas (*E. histolytica*), podendo originar pequenas, mas constantes, perdas sangüíneas.

A diferença de percentual observada entre os sexos em relação à ocorrência de anemia pode ser decorrente de diversas causas ainda não avaliadas, entre elas uma maior susceptibilidade aos parasitas e/ou maior exposição, ou ainda ao fluxo sangüíneo perdido mensalmente pela menstruação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Extensão/UEFS pelo apoio e concessão de bolsas e aos funcionários e estagiários dos Laboratórios de Parasitologia Humana e Análises Clínicas da UEFS, pelo apoio na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. **Failace, R.** *Hemograma: manual de interpretação*. 3ª ed, Porto Alegre - RS, Editora Artes Médicas, p.198. 1995.
2. **Leavell, B. S.** *Hematologia clínica*. 4ª ed, Rio de Janeiro - RJ, Editora Intermérica, p.496; il. 1979.
3. **Lorenzi, T. F.** *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. 2ª ed, Rio de Janeiro - RJ, Editora Medsi, p.641. 1999.
4. **Neves, D. P. et al.** *Parasitologia humana*. 10ª ed, São Paulo - SP, Editora Atheneu, p. 428, 2000.
5. **Pessoa, S. B.; Martins, A. V.** *Parasitologia médica*. 11ª ed, Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara Koogan, p. 872. 1988.
6. **Rapaport, S.** *Hematologia: introdução*. 2ª ed, São Paulo - SP, p.50; il. 1990.
7. **Rey, L.** *Bases da parasitologia médica*. 3ª ed, Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara Koogan, p.349. 1992.
8. **Sitientibus.** *Estudos das parasitoses intestinais na comunidade carente dos bairros periféricos do município de Feira de Santana (BA), 1993-1997*. Feira de Santana - BA, n.20, p.55-67, jan./jul. 1999.
9. **Veronessi, R. D.** *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8ª ed; Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara Koogan, 1096. p. il. 1991.

Endereço para correspondência:

Jésua Maria Leite Bringel

Rua Edmundo Pereira Leite, 267 - Centro - 44380-000 - Cruz das Almas - BA

XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS
II CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA
CENTRO DE CONVENÇÕES EDSON QUEIROZ
FORTALEZA - CEARÁ
26 a 30 maio de 2002