ISSN 0370-369x

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

Atividade funcional das vias clássica e alternativa do complemento em recém-nascidos: relação com a idade gestacional e crescimento intra-uterino 63
Iara J. Messias-Reason; Valmir Mocelin; Tâmara Borgonovo; Tânia Resener & Nelson Rosário
Functional activity of classical and alternative pathways in newborn infants: association with gestacional age and intrauterine growth

Estudo das diferenças nutricionais do leite humano maduro no início e final da mamada 67
Nylane Maria Nunes de Alencar; Nádia Accioly Pinto Nogueira; Maria Goretti Rodrigues de Queiroz; Maria Marly Lopes Vieira Peixoto & Sandra Mara Brasileiro Lima
Nutrition differences' study from mature human milk in the beginning and final of the suckle

Estudo imunocitoquímico de proliferação celular (MIB-1) em sedimento de fluido peritoneal na endometriose pélvica 71
José Eleutério Junior; Diane Isabelle Magno Cavalcante; Francisco das Chagas Medeiros & Francisco Valdeci de Almeida Ferreira
Immunocytochemical study of cellular proliferation (MIB-1) on peritoneal fluid sedment in pelvic endometriosis

Diagnóstico coproparasitológico: estudo comparativo entre os métodos de Faust & cols., Lutz, Baermann & Moraes e Coprotest® 75
Flavia Mattos de Carvalho; Ágatha Orlandi Falcão; Maira Cavalcanti de Albuquerque; Pedrina da Silva; Otílio Machado Pereira Bastos & Cláudia Maria Antunes Uchôa
Coproparasitological diagnosis: comparative study between Faust *et al.*, Lutz, Baermann & Moraes and Coprotest® methods

Exame do líquido ascítico nos laboratórios do estado de Santa Catarina 79
Patrícia Haas; Kenya Thiesen & Cidônia L. Vituri
Ascites liquid examination in the state of Santa Catarina

Incidência de parasitoses intestinais em escolares do município de Novo Hamburgo-RS 85
Alexandre A. Becker; Rafael Ioschpe; Daniela Delwing; Débora Delwing & Juliana Canali
Incidence of intestinal parasitosis in students from public school in Novo Hamburgo-RS

Padronização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em amostras endocervicais de pacientes portadoras de lesões pré-cancerosas ou cancerosas atendidas no LEPAC/UEM de Maringá-PR 89
Daniela Haponiuk Gomes; Carlos Cristiano de Godoi Bidoia; Mary Mayumi Taguti Irie; Linda Emiko Suzuki; Marcia Edilaine Lopes Consolaro & Edilson Nobuyoshi Kaneshima
Technique standardization of Polymerase Chain Reaction (PCR) to the diagnosis for infection by Human Papillomavirus (HPV) in endocervical samples from patients with cancerous or pre-cancerous lesions assisted in LEPAC/UEM Maringá-PR

Estudo comparativo entre duas técnicas de contagem de subpopulação de células T em indivíduos infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência humana 95
Caio Augusto Santos Rodrigues; Maria Gorete Lins de Queiroz; Valéria Soraya de Farias Sales; Tereza Neuma de Souza Brito; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca; Aldair de Souza Paiva; Maria Zélia Fernandes; Maria Cleide de Araújo Lopes; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior
Comparative study between two technical counts of T cell subpopulations from individuals infected and no infected with the humam immunodeficiency virus

Avaliação da velocidade de hemossedimentação (VHS) utilizando o método de Westergren (original e modificado) e os sistemas Vacuette e Sedivette 103
Luci Maria Sant'Ana Dusse; Ana Paula Mendonça Ribeiro; Geralda de Fátima Guerra Lages; Lara Carvalho Godoi; Anna Letícia Soares; Lauro Mello Vieira & Maria das Graças Carvalho
Erythrocyte sedimentation rate evaluation by Westergren (original and modified) and Vacuette and Sedivette systems

Avaliação entre métodos, baseados na sedimentação por centrifugação em formol-éter, utilizados para diagnóstico das enteroparasitoses 107
Elúzio José Lima Cerqueira; Fernando Luiz Trindade Rego; Rejane Cardoso Rodrigues; Lêda Maria Alcântara & Neci Matos Soares
A comparative study based on formol-ether concentration technique used in parasitological diagnostic

E mais...

Temas Livres do XXIX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas • 2002 e do II Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

2

VOLUME 34

2002

Atividade funcional das vias clássica e alternativa do complemento em recém-nascidos: relação com a idade gestacional e crescimento intra-uterino

Functional activity of classical and alternative pathways in newborn infants: association with gestacional age and intrauterine growth

Iara J. Messias-Reason[1]; Valmir Mocelin[1]; Tâmara Borgonovo[1]; Tânia Resener[1] & Nelson Rosário[2]

RESUMO – O presente estudo avalia os níveis hemolíticos totais das vias clássica (VC) e alternativa (VA) do complemento no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos (RN) e a sua associação com o grau de maturidade e crescimento intra-uterino. CH50 e AP50 foram determinadas em 18 RN pré-termos (PT), 34 RN de termo pequenos para idade gestacional (PIG) e 47 RN de termo adequados para idade gestacional (AIG). Como grupo controle foram estudados 38 adultos saudáveis. A determinação das unidades CH50 e AP50 foi realizada através de teste hemolítico, utilizando-se hemácias de carneiro sensibilizadas e eritrócitos de coelho, respectivamente. Os valores médios de CH50 nos RN a termo AIG e PIG corresponderam a 57,4% e 58,4% dos valores dos adultos, respectivamente. Para a VA, os valores obtidos para os RN-AIG e PIG corresponderam a 44,8% e 46,2% do valor médio dos adultos respectivamente; enquanto que, para os RN-PT os valores médios da VC e VA corresponderam a 38,7% e 40,9% dos valores dos adultos normais. Não foi observada relação entre a atividade hemolítica total da VA do sistema complemento com relação às variáveis idade gestacional e crescimento intra-uterino. Na avaliação da atividade hemolítica total da VC do sistema complemento, observou-se relação significativa apenas com a idade gestacional (AIG x PT p=0.00006 e PIG x PT p=0.00008). Os resultados indicam que a idade gestacional, ao contrário do crescimento intra-uterino, está relacionada com a atividade hemolítica da VC nos RN. Considerando-se o importante papel do complemento na resposta imune, o estado de hipoatividade do complemento nos RN quando comparados com os adultos, poderia ser um fator adicional para uma maior suscetibilidade às infecções observadas nos RN.

PALAVRAS-CHAVE – Complemento, via alternativa, via clássica, recém-nascidos

SUMMARY *– The total haemolytic activity of the classic (CP) and alternative (AP) pathways of the complement was evaluated in the cord blood of new-born infants (NB) and its association with the gestational age and intrauterine growth was determined. Eighteen premature NB (P-NB), 34 small for gestational age (S-NB) and 47 appropriated for gestacional age (A-NB) were studied As control, 38 healthy adults were included. The determination of CP50 and AP50 were carried out by haemolytic test, using sheep and rabbit erythrocytes, respectively. The values for the CP in the S-NB and A-NB were 57.4% and 58.4% of the adult values, respectively. The infants A-NB and S-NB presented 44,8% and 46.2% of the adult value of the AP respectively. The average values of CP and AP in the P-NB were 38.7% and 40.9% of the adults. While the total haemolytic activity of the AP was not associated with the gestacional age nor with the intrauterine growth, a significant association of the CP with the gestacional age was observed (A-NB x P-NB p=0.00006 and S-NB x P-NB p=0.00008). These results indicate that the gestacional age was related to the haemolytic activity of the CP in NB infants. Considering the important role of complement in the defense against infection, the complement hypoactivity observed in NB may be an additional factor for the elevated infection susceptibility in these infants.*

KEYWORDS *– Complement activity, alternative pathway, classical pathway, newborn infants.*

INTRODUÇÃO

O sistema complemento representa um dos principais mecanismos efetores da resposta imunológica e inflamatória, constituído de aproximadamente 35 proteínas plasmáticas ou associadas às membranas celulares que, uma vez ativadas, modulam reações humorais e celulares. Dentre as proteínas plasmáticas, encontram-se as que participam da reação seqüencial das vias de ativação do complemento (C1 a C9, B, D, MBL e MASP) e as proteínas reguladoras da ativação na fase fluída como o inibidor de C1(C1-INH) e de C3a e C5a (C3a/C5aINA) e a proteína S. As proteínas associadas às membranas celulares têm a função tan-

Recebido em 14/02/2002
Aprovado em 25/02/2002
[1]Laboratório de Imunopatologia, Hospital de Clínicas – UFPR; [2]Departamento de Pediatria -UFPR

to de regular ou inibir a ativação do complemento a nível de membrana como de receptores para proteínas e fragmentos do complemento gerados durante a sua ativação, sendo fundamentais para a opsonização de microrganismos e de complexos imunes. A ativação do complemento pode ocorrer através de três vias distintas: a via clássica, a via alternativa e, a recentemente descrita, via das lectinas[1]. Esta ativação é necessária para que a expressão biológica do complemento se efetive e, constitui-se num importante mecanismo de manutenção da homeostase do organismo, conferindo proteção contra bactérias, parasitas e vírus, além de promover a solubilização e eliminação de complexos imunes circulantes[2].

O fígado é a fonte primária de produção da maioria dos componentes do complemento e de suas proteínas reguladoras. A expressão de C3 no fígado fetal pode ser detectada aproximadamente nas quatro semanas de gestação, no entanto, a síntese de C4 muda drasticamente durante a vida fetal, mas é relativamente constante após o nascimento. Outros tipos de células, incluindo monócitos, sintetizam e secretam componentes específicos e provavelmente controlam suas concentrações nos locais de inflamação tecidual[2-5]. A deficiência hereditária ou adquirida de certos componentes do complemento pode levar a falhas na resposta imunológica, influenciando tanto a opsonizacão e fagocitose de microrganismos como a solubilização de complexos imunes circulantes[2]. Portanto, a avaliação de componentes do complemento constitui-se num importante parâmetro de competência imunológica e pode ser determinada através de testes funcionais da atividade hemolítica do complemento total.

Nos recém-nascidos, os mecanismos de defesa específicos e inespecíficos não são bem conhecidos. A resposta celular e humoral, bem como os níveis dos componentes do complemento são significativamente menores do que no adulto[6]. A deficiência de alguns componentes do complemento nos recém-nascidos está relacionada à ocorrência de defeitos na resposta de células fagocíticas a estímulos quimiotáticos e na sua capacidade de fagocitose, de opsonização e poder bactericida[6,8].

A integridade da cascata do complemento tem um importante papel na defesa dos recém-nascidos contra agressões causadas por microrganismos, pelo fato do complemento ser um dos principais mecanismos de defesa natural dos recém-nascidos. Assim sendo, a determinação funcional da atividade hemolítica total das diferentes vias do complemento em recém-nascidos pode fornecer informações importantes na avaliação de sua competência imunológica.

Uma vez que os dados referentes ao complemento em recém-nascidos são escassos para a nossa população, no presente trabalho determinou-se a atividade hemolítica total das vias clássica e alternativa do complemento em três grupos de recém-nascidos: adequados para a Idade Gestacional (AIG), Pequenos para a Idade Gestacional (PIG) e Pré-termos (PT), com o objetivo de se obter dados referenciais para populações com as mesmas características e tentar estabelecer possível correlação com a idade gestacional e o grau de crescimento uterino.

Foi também propósito do presente estudo, comparar a acurácia dos valores obtidos na dosagem da atividade funcional da via clássica, através de teste hemolítico radial em gel de agarose, com os valores obtidos por técnica padrão de sistema hemolítico em tubo.

PACIENTES E MÉTODOS

Amostra: Constituiu-se de 98 recém-nascidos, os quais foram divididos em três grupos: 45 recém-nascidos a termo, com peso adequado para a idade gestacional (AIG), sendo 36 do sexo masculino e 9 do sexo feminino; 35 recém-nascidos a termo pequenos para idade gestacional (PIG), sendo 19 do sexo masculino e 16 do sexo feminino e 18 recém nascidos pré-termo (PT), sendo 11 do sexo masculino e 7 do sexo feminino.

Como grupo controle adulto foram estudados 38 voluntários saudáveis (26 homens e 12 mulheres), com idade entre 20 e 58 anos (29,2 ± 10,92).

Soro dos RN: Após consentimento materno, sangue do cordão umbilical foi coletado por venopunção dos vasos placentários, sem anticoagulante, até dez minutos após a dequitação da placenta.

Soro dos adultos: Após consentimento, 10 ml de sangue foram coletados por punção venosa, sem anticoagulante.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 4°C, aliquotadas e armazenadas a -70°C até o momento de sua utilização.

Determinação da atividade hemolítica total do complemento

Via clássica (VC)

A atividade funcional da VC foi avaliada através da determinação das unidades CH50 utilizando-se duas técnicas: hemólise em tubo de acordo com Mayer e Kabatt, 1961[9] e hemólise radial em gel de agarose de acordo com Hiramoto *et al.* 1971[10]. O gel utilizado na técnica de hemólise radial foi preparado com uma solução de agarose (Sigma, USA) a 1% em NaCl 0,15M contendo 0,15 mM de $CaCl_2$. Após aplicação das amostras, as placas foram incubadas em câmara úmida durante uma noite a 4°C e por uma hora a 37°C. O diâmetro dos halos de hemólise foi comparado com os diâmetros de diversas diluições de um "pool" de soros frescos com unidades CH50 conhecidas. O sistema hemolítico (EA) foi preparado utilizando-se hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina obtida através da inoculação de estroma de hemácias de carneiro em coelhos, com a diluição determinada por titulação[9]. Todos os soros dos adultos e dos recém-nascidos foram testados por ambas as técnicas (em tubo e em placa) para comparação das unidades CH50 obtidas entre as duas técnicas.

Via alternativa (VA)

A atividade hemolítica da VA foi determinada conforme a técnica modificada de Platts-Mills TAE e Ishi-

zaka K. 1974[11]. Hemácias de coelho em solução de Alsever foram lavadas em tampão EGTA/GVB (tampão salina veronal com gelatina, contendo 0.002M Mg e 0.008M EGTA) e ajustadas para $1,5x10^8$ cel/ml. Os soros a serem testados, foram diluídos no tampão EGTA/GVB, 5 minutos antes de serem adicionados às hemácias (0,4ml de cada diluição de soro para 0,2ml de hemácias a 0°C), e então incubados a 37°C por 30 minutos. Após centrifugação a 600g por 10 minutos, foi feita a leitura da densidade ótica do sobrenadante a 412nm.

Análise estatística

Foi calculado a média aritmética e o desvio padrão para todas as variáveis. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. Para a significância da diferença de duas médias foi aplicado o teste *t de Student.* O teste de correlação de Spearman foi utilizado para se determinar a significância de associação entre variáveis. O nível de significância adotado foi de $p<0.05$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos para a atividade funcional das VC e VA nos diferentes grupos de RN e adultos estão demonstrados na Tabela I. Na avaliação da atividade hemolítica da VC entre os RN, observou-se uma correlação apenas com a idade gestacional (Tabela II). Também a atividade hemolítica da VA correlacionou-se com a idade gestacional, somente quando considerados os RN com peso adequado para idade gestacional. Os valores obtidos para atividade funcional da VC e da VA não se correlacionaram entre si (p=ns) nos grupos estudados.

Os valores médios da atividade hemolítica total da VC nos RN a termo AIG e PIG corresponderam a 57,4% e 58,4% dos valores dos adultos, respectivamente. Para a VA, os valores obtidos para os RN-AIG e PIG corresponderam a 44,8% e 46,2% do valor médio dos adultos respectivamente. Enquanto que, para os RN-PT os valores médios da VC e VA corresponderam a 38,7% e 40,95% dos valores dos adultos normais. Entre os grupos PIG e AIG não observou-se diferença estatisticamente significante quando comparados os resultados obtidos para ambas as vias. Três RNs apresentaram atividade hemolítica não detectável, tanto para a VC quanto para a VA e portanto não foram incluídos nos cálculos estatísticos.

Com relação aos valores de CH50-VC obtidos pela técnica de hemólise em tubo e hemólise radial em gel de agarose, observou-se uma correlação direta entre estes nos adultos ($R = 0.54$ e $p = 0.0004$), porém não demonstraram correlação entre os RN ($R = 0.07$ e $p = 0.643$). Os testes realizados demonstraram que as placas de gel uma vez preparadas podem ser utilizadas pelo período de uma semana, e que não houve diferença estatisticamente significante entre os resultados dos mesmos soros tanto dos RN como dos adultos testados em placas distintas ou em duplicata na mesma placa; não ocorrendo assim uma variação significativa inter e intra-placa.

DISCUSSÃO

No presente trabalho observamos que os valores da atividade hemolítica dos soros dos RN AIG correspondem a 57,4% para a VC e 44.9% para a VA dos valores dos adultos. Estes achados confirmaram observações prévias e sugerem uma menor atividade do complemento nos RN para ambas as vias, quando comparados com os adultos, o que provavelmente está relacionado aos níveis ainda baixos das proteínas circulantes nos neonatos[12,13]. A diferença na expressão genética de alótipos de C3 observados entre mães e RN, indicam que a síntese do complemento ocorra no feto e não haja transferência transplacentária[1,12]. Sabe-se que durante a progressão da gestação, ocorre aumento da produção das proteínas do complemento[12].

Alguns autores demonstram que os niveis séricos do componente C7 do complemento, em alguns RN PT estão nos limites normais estabelecidos para adultos[15]. Após o nascimento entretanto, tem-se observado que os níveis de proteínas do complemento e de CH50 são significantemente mais baixos nas crianças desnutridas, sendo que estes níveis se normalizavam após

TABELA I
Valores médios da atividade hemolítica total da via clássica (CH50) e da via alternativa (AP50) em recém nascidos e adultos (± desvio padrão)

	AIG (n=45)	PIG (n=35)	PT (n=18)	ADULTOS (n=38)	*p** (AIG x PT)	*p** (PIG x PT)
Via clássica (em tubo)	62.6 ±18.2	63.7 ± 15.1	41.8 ± 15.4	108.7 ± 21.9	0.0000066	0.000008
(Valores limites)	(23.8 – 111.0)	(20.8 – 93.4)	(12.5 – 59.5)	(74.1 – 153.0)		
% adultos	57.4 %	58.4%	38.7 %	100%		
Via alternativa	16.2 ± 4.4	16.5 ± 5.8	14.7 ± 2.9	35.9 ± 8.5	p<0.00001	ns
(Valores limites)	(8.2 – 24.0)	(5-25)	(7.7 – 22.8)	(19.5 – 67.5)		
% adultos	44.8 %	46.2%	40.9%	100 %		

*AIG – Adequados para idade gestacional; PIG – Pequenos para a idade gestacional; PT- Pré-termo; *teste "t" de* Student; *ns: não significante*
Todas as comparações AIG x PIG não foram estatisticamente significantes

TABELA II
Comparação dos valores médios da atividade funcional da via clássica (CH50) e alternativa (AP 50) entre recém-nascidos em diferentes estágios de maturidade.

	AIG (n=45)	PIG (n=35)	PT (n=18)	*p** (AIG x PT)	*p** (PIG x PT)
Via clássica (em tubo)	62.6 ± 18.2	63.7 ± 15.1	41.8 ± 15.4	0.000066	0.000008
(Valores limites)	(23.8–111.0)	(20.8 – 93.4)	(12.5 –59.5)	(74.1 – 153.0)	
Via alternativa	16.2 ± 4.4	16.5 ± 5.8	14.7 ± 2.9	p<0.00001	ns
(Valores limites)	(8.2 – 24.0)	(5.0 – 25.0)	(7.7 – 22.8)		

AIG = Adequado para a idade gestacional; PIG = Pequeno para a idade gestacional; ns = não significante; ( ) = Valores limites
Todas as comparações AIG x PIG não foram estatisticamente significantes

dieta adequada e recuperação nutricional[12]. Estudos prévios demonstraram que, no desenvolvimento pós-natal, existe uma diferença quanto ao tempo de maturação das vias clássica e alternativa do complemento. Enquanto que os níveis normais da VC do adulto são alcançados entre o primeiro e o terceiro mês de vida, os níveis da VA são alcançados somente entre o décimo terceiro e décimo oitavo mês[14]. Além disso, observou-se que a atividade lítica da VC em crianças entre 7 e 24 meses de idade foi maior do que em adultos normais[14].

No presente estudo, os níveis da atividade hemolítica das VC e VA foram similares entre o grupo de RN AIG e PIG, demonstrando não haver correlação entre os níveis funcionais tanto da VC como da VA com o crescimento intra-uterino. Por outro lado, os RN PT apresentaram uma diminuição estatisticamente significante dos níveis funcionais de ambas as vias clássica e alternativa, quando comparadas aos RN com idade gestacional adequada ($p<0.005$). Também os RN PT demonstraram níveis significativamente diminuídos para a VC, quando comparados com os RN PIG. Já tem sido descrito que os níveis de C3, C4, BF e de Properdina no cordão umbilical estão relacionados com a idade gestacional e que os níveis de complemento não são afetados com o retardo de crescimento intra-uterino[8,12,13]. Embora níveis proteicos de alguns componentes do complemento possam não estar diretamente relacionados com a atividade hemolítica total, têm-se demonstrado que a atividade hemolítica total reflete a integridade funcional da cascata[18]. A baixa concentração de Properdina em RN tem sido sugerida como responsável pelo alto índice de infecções durante o primeiro mês de vida[8], o que corrobora a importância da via alternativa como um dos primeiros mecanismos de defesa natural do indivíduo. Wolach *et al.*[15] também demonstraram que a atividade bactericida de neutrófilos em neonatos fica comprometida em função dos baixos níveis do complemento, devido a deficiência na capacidade de opsonização.

Embora a atividade hemolítica total *in vitro* possa não refletir outras funções biológicas importantes do complemento, como a capacidade de opsonização, fagocitose e destruição de agentes infecciosos; a determinação da mesma representa um parâmetro muito útil na avaliação da integridade e de estados de deficiência do complemento.

Considerando-se o importante papel do complemento na defesa do organismo contra agentes infecciosos, o estado de hipoatividade do complemento em RNs quando comparados com adultos poderia constituir-se de um fator adicional para o aumento da susceptibilidade às infecções observadas nos RN, principalmente nos RN PT[14]. Além disso, os resultados aqui apresentados corroboram o fato de que a idade gestacional, ao contrário do crescimento intra-uterino, está relacionada com a atividade hemolítica total do complemento em RN.

A técnica de hemólise radial em gel de agarose demonstrou ter muitas vantagens em relação à técnica em tubo, entre elas: ser mais rápida, mais simples, de menor custo e mais acessível a laboratórios de pequena infra-estrutura. No entanto, a subjetividade da leitura pode inferir erros consideráveis quando comparada com a técnica em tubo, que apresenta maior precisão, embora ambas as técnicas tenham dado boa correlação na dosagem dos soros dos adultos. A correlação entre as técnicas em tubo e em placa só ocorreu com as amostras de adultos provavelmente em função da baixa sensibilidade da técnica em gel de agarose e às baixas concentrações de proteínas do complemento nos neonatos. Portanto, estes resultados demonstraram que a hemólise radial em gel não se mostrou adequada para a análise de amostras cujas concentrações protéicas do complemento sejam muito baixas, como no caso dos recém-nascidos. Atualmente, novas técnicas como ELISA (ensaio imunoenzimático), têm sido desenvolvidas e utilizadas por alguns serviços na triagem de rotina, conferindo alta sensibilidade e especificidade para a avaliação do sistema complemento[16,17].

REFERÊNCIAS

1 **Paul, W.** Complement. *In: Fundamental immunology.* 4th Ed., Philadelfia, Editora Lippincott-Raven, 1999.
2 **Colten, H. R.** Biosynthesis of the MHC-linked complement proteins (C2, C4 and factor B) by mononuclear phagocytes. *N. Engl. J. Med.*, 19: 1279-85. 1982.
3 **Colten, H. R.; Alper, C. A.; Rosen, F. S.** Genetics and biosynthesis of complement proteins. *N. Engl. J. Med.* 304:653-56. 1981.
4 **Volanaski, J. E.; Frank, M. M.** The human complement system in health and disease. Marcel Dekker, New York, 1998.
5 **Fey, G.; Colten, R.** Biosynthesis of complement components. *Fed. Proc.* 40:2099-2104. 1981.
6 **Wolach, B.; Dolfin, T.; Regev, R.; Gilboa, S.; Schelesinger, M.** The development of the complement system after 28 weeks gestation. *Acta Paediatr.* 86:523-7. 1997.
7 **Miller, E.** Chemostactic function in the human neonate: humoral and celular aspects. *Pediatr. Res.* 5:487. 1971.
8 **Gottof, S.** Neonatal Immunity. *J. Pediatr.* 85:149. 1974.
9 **Kabat, E. A.; Mayer M. M.** Complement Fixation. *In: Experimental immunochemistry.* E. A. Kabat and M. M. Mayer, eds, Charles C. Thomas. Springfield II. p.133. 1961.
10 **Hiramoto, R. N; Mcghee, J. R.; Hurst, D. C.; Hámilin, N. M.** A Study of the single hemolysis in gel system. I. Factors affecting the model. *Immunochemistry.* 8: 355-65. 1971.
11 **Platts-Mills, T. A. E.; Ishizaka, K.** Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* 113:348-58. 1974.
12 **Resener, T. D.; Rosário, N. A.; Messias, I. J. T.; Cat, R.** Avaliação do sistema complemento e da imunoglobulina G no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos. Relação com aidade gestacional e adequação do crescimento intra-uterino. *Jornal de Pediatria*, 73:88-94.1997.
13 **Notarangelo, L. D.; Chirico, G.; Chiara, A.; Colombo, A.; Rondini, G.; Plebani, A.; Martini, A.; Ugazio, A. G.** Activity of classical and alternative pathways of complement in preterm and small for gestation age infants. *Pediatric Research.* 18(3):281-85. 1984.
14 **Virginia, P. L.; Ferrarini, J.; Barbosa, M.; Carvalho, I. F.** Serum haemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy: age-related changes. *Acta Paediatr. Scand.* 79:322-27. 1990.
15 **Wolach, B.; Carmi, D.; Gilboa, S.; Satar, M.; Segal, S.; Dolfin, T.; Schlesinger, M.** Some aspects of the humoral immunity and the phagocytic function in newborn infants. *Israel J. Med. Sci.* 30:331-5. 1994.
16 **Zwirner, J.; Wittig, A.; Kremmer, E.; Gotze, O.** A novel ELISA for the evaluation of the classical pathway of complement. *J. Immunol. Methods.* 211:183-90. 1998.
17 **Jaskowski, T. D.; Marins, T. B.; Litwin, C. M.; Hill, H. R.** Comparison of three different methods for measuring classical pathway complement activity. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6:137-9.1999.
18 **Takada, A; Imamura, Y; Takada, Y.** Relationship between the haemolitic activities of the human complement system and complement components. *Clin. Exp. Immunol.* 35:324-8. 1979.

Endereço para correspondência:
Profª Iara J. Messias-Reason
Rua Padre Camargo, 280 - Curitiba, Paraná - Setor de Ciências da Saúde
Departamento de Patologia Médica Hospital de Clínicas - UFPR
E-mail: imunopat@hc.ufpr.br

Estudo das diferenças nutricionais do leite humano maduro no início e final da mamada

Nutrition differences' study from mature human milk in the beginning and final of the suckle

Nylane Maria Nunes de Alencar[1]; Nádia Accioly Pinto Nogueira[1]; Maria Goretti Rodrigues de Queiroz[1]; Maria Marly Lopes Vieira Peixoto[2] & Sandra Mara Brasileiro Lima[2]

RESUMO – A lactação, do ponto de vista energético, é a maneira mais eficiente de atender as necessidades alimentares dos mamíferos jovens, sendo o leite materno protetor, imunomodulador e ideal para suas necessidades. Este nutriente apresenta modificações importantes e normais em suas diferentes fases. Com base neste aspecto este trabalho teve como principal objetivo investigar possíveis diferenças nutricionais no leite humano maduro no início e no final da mamada. Foram analisadas amostras de 25 mulheres. As alíquotas foram obtidas no início e final das mamadas, onde foram calculados os teores de gordura, energia e proteína. Como resultados encontramos que as concentrações dos três componentes estudados encontram-se superiores no leite de final de peito quando comparado com o leite inicial. Dados que devem ser esclarecidos pois a interrupção da mamada pode fazer com que o lactente receba quantidades de nutrientes insuficientes para o seu crescimento e desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE – Técnicas parasitológicas, diagnóstico laboratorial.

SUMMARY *– Based on the energetic point of view, the lactation is the most effective way to supply the nutritional needs of young mammals. The most important and normal alterations observed in the maternal milk composition depending by the lactation stage. Thus, it was evaluated the nutritional differences in the mature milk from the beginning and to the end of each suckle. 25 women's samples were analysed. The aliquots were obtained in the beginning and final of those sucked, the lipid, energy and protein contents were calculated. As result found that the concentrations of the three parameters studied are superiors in the milk of chest end when compared with the initial milk. Data that should be close to in general illustrious because the interruption of the sucked can do with that the infant receives amounts of nutritious insufficient for your growth and development.*

KEYWORDS *– Human milk; differences nutrictional,; composition; suckle.*

INTRODUÇÃO

O leite materno é inquestionavelmente o alimento de escolha para o recém-nascido. Sua composição é designada para fornecer energia e nutrientes necessários em quantidades apropriadas, além de permitir a adaptação do recém nascido e sua transição bem sucedida para a vida pós-natal independente (Rogan & Gladen, 1993).

A formação do leite humano consiste de três etapas: colostro, fluído amarelado e espesso produzido nos quatro primeiros dias após o parto**;** leite de transição**,** produzido entre o quarto e o décimo quinto dia pós-parto e leite maduro**,** produzido com a continuação do leite de transição. Em cada uma destas etapas, as amostras de leite apresentam características bioquímicas adequadas para um determinado período da vida do lactente. O colostro é mais rico em proteínas e mais pobre em carboidratos e gordura do que o leite maduro (Lawrence, 1989).

O leite humano é muito mais do que uma simples coleção de nutrientes, é uma substância viva de grande complexidade biológica, com capacidade não só nutritiva como também protetora e imunomoduladora (Ducan *et al*., 1993; Tozzi *et al*., 1993). O leite maduro e o colostro contêm anticorpos e fatores antiinfecciosos que não estão presentes no leite de vaca (Howie *et al*., 1990). A gordura é o nutriente de concentração mais variável no leite humano, esta pode passar de aproximadamente 2 g/dL no colostro para 4,5 g/dL no leite maduro. Os lipídios fornecem 50% das calorias no leite materno, sendo que em algumas mulheres a concentração deste nutriente no leite de final da mamada pode ser cinco vezes maior do que no início (Fomon *et al*., 1984).

A composição do leite materno é singularmente diferente daquela do leite de vaca. Apesar de ambos fornecerem o mesmo valor calórico, as fontes de nutrientes das calorias são diferentes. As proteínas fornecem 6 a 7% das calorias no leite materno e 20% no leite de vaca. Além disso, o leite materno é rico em nucleotídeos, principalmente quando se trata de colostro. Outro fato que ressalta a importância da amamentação é a alta concentração de cistina e taurina no leite humano, aminoácidos considerados essenciais para os recém-nascidos A lactalbumina, uma proteína de fácil digestão, corresponde a 60% da proteína do leite materno, enquanto no leite de vaca, 80% da pro-

Recebido em 10/12/2001
Aprovado em 17/1/2002
[1]Professoras do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Ceará (UFC);
[2]Farmacêuticas do Banco de Leite Humano da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) UFC

teína total está representada pela caseína, que forma coágulos espessos difíceis de serem digeridos pelo bebê (Fomon *et al*., 1984).

No primeiro ano de vida a necessidade protéica da criança por unidade de peso corporal é maior do que em qualquer outro período. Nutrientes e energia são necessários não só para manter as funções e atividades do organismo, mas principalmente para deposição tissular. Questões importantes como o tempo de duração de cada mamada e o intervalo entre estas, devem ser bem definidas e aceitas.

Apesar do crescente interesse pelo leite humano, principalmente nos países subdesenvolvidos, poucos estudos têm sido realizados na tentativa de comparar o conteúdo do leite humano anterior e posterior. As pesquisas se concentram no que diz respeito as diversas fases de maturação do leite. Desta forma, na tentativa de enfatizar a importância nutricional da duração das mamadas para o recém-nascido, resolvemos investigar neste trabalho as possíveis diferenças nutricionais entre o leite humano obtido no início e no final de cada mamada.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra biológica

Foram utilizadas amostras de leite humano maduro de 25 doadoras do Banco de Leite Humano da Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará (MEAC/UFC). As alíquotas foram coletadas no início e no final das mamadas, sendo então distribuídas em dois grupos, os quais foram denominados como leite anterior e leite posterior respectivamente.

Determinação do teor de gorduras

O teor de gorduras foi determinado pelo método do crematócrito, anteriormente descrito por Lucas *et al*., (1978).

As amostras de leite foram colocadas em tubos capilares (75 x 1,5 mm) e submetidas a centrifugação em 12.000 g por 15 minutos. Nesse intervalo ocorreu a separação entre o creme e soro do leite. Sendo então aferido o comprimento da coluna de creme e da coluna total de produto (coluna de creme + coluna de soro, expressos em mm). O teor de gordura foi obtido usando as seguintes fórmulas:

$$\%\ \text{Teor de Creme} = \frac{\text{Coluna de creme (em mm)}}{\text{Coluna total de produto (em mm)}} \times 100$$

$$\%\ \text{Teor de Gordura} = \frac{\text{Teor de Creme(\%)} - 0.59}{1{,}46}$$

Determinação de energia

A determinação do valor energético da gordura das amostras de leite foi feita usando-se a fórmula de conversão de energia descrita por Southgate and Durbin (1970)

$$\text{Energia (Kcal/L)} = 66.8 \times \text{Teor de Creme (\%)} + 290$$

Determinação da concentração protéica

A concentração protéica das amostras de leite foi determinada seguindo-se a metodologia descrita por Bradford (1976).

Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas através de análise de variância (Anova) e teste de Ducan para múltiplas comparações. O $p<0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação do valor percentual de gordura das amostras de leite analisadas neste estudo demonstra uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de gordura entre o leite colhido no início das mamadas (leite anterior) em relação àquele obtido no final destas (leite posterior), sendo o conteúdo lipídico deste último superior em todas as amostras. No leite colhido no início da mamada a percentagem de gordura variava de 0,5 a 4,0 % e naquele obtido no final este percentual era de 1,8 a 9,7 % (Fig. 1A e 1B). De acordo com Drewett *et al.* (1982), em algumas mulheres a concentração de gordura no leite posterior é 4 a 5 vezes maior do que no leite anterior. Acredita-se que este alto teor de gordura nas amostras de leite obtidas no final das mamadas, possivelmente tenha uma participação na regulação do apetite do lactente, embora, isto não tenha sido demonstrado em bebês alimentados com mamadeiras e com conteúdos de gordura variáveis.

Em relação ao aporte energético, as amostras de leite posterior também mostraram-se mais ricas do que aquelas obtidas no início da mamada, nas quais 40 % apresentou perfil energético em torno de 350 a 400 Kcal/L, sendo que as mais altas densidades (700 a 750 Kcal/L) foram atingidas somente por 8% destas. Porém, em se tratando do leite posterior observou-se um aumento médio de 36,3% do conteúdo energético, quando comparado ao leite anterior, os valores ener-

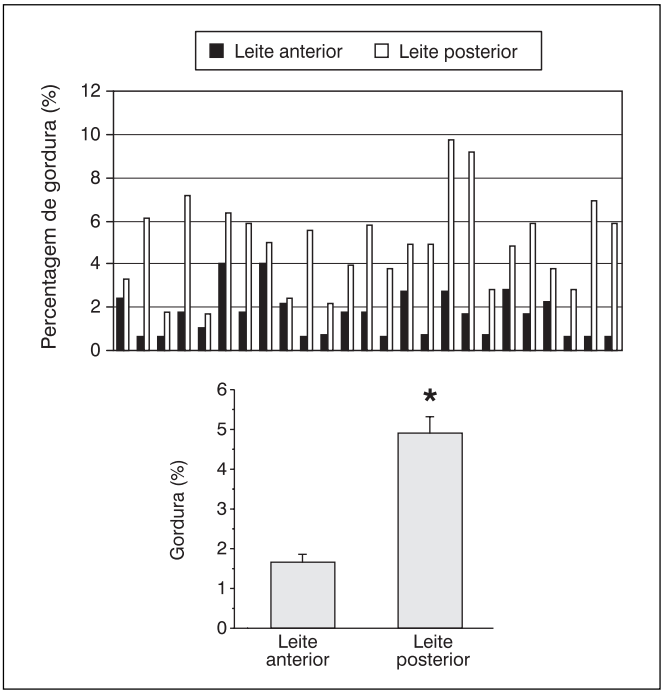


FIG. 1 - Percentual de Gordura determinado em 25 amostras de leite no início da mamada (leite anterior) e no final (leite posterior). No painel A as barras representam o valor de gordura de cada amostra de leite analisada, no painel B a média destes E.P.M. O asterísco indica significância estatística (p <0,05) da diferença entre os dois grupos (Anova - teste de Ducan)

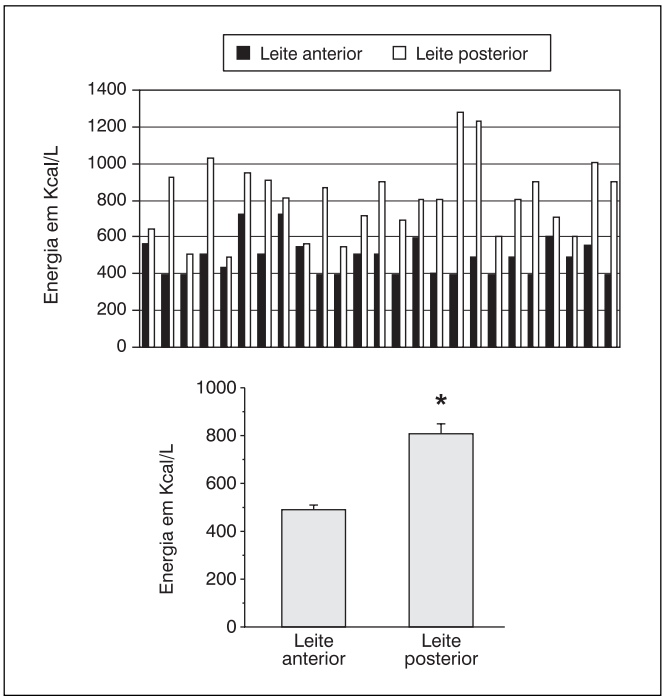


FIG. 2 - Valor energético demonstrado em 25 amostras de leites no início da mamada (leite anterior) e no final (leite posterior). No painel A as barras representam o aporte energético em Kcal/L de cada amostra analisada, e no painel B a média destes E.P.M. O asterísco indica significância estatística (p <0,05) da diferença entre os dois grupos (Anova - teste de Ducan)

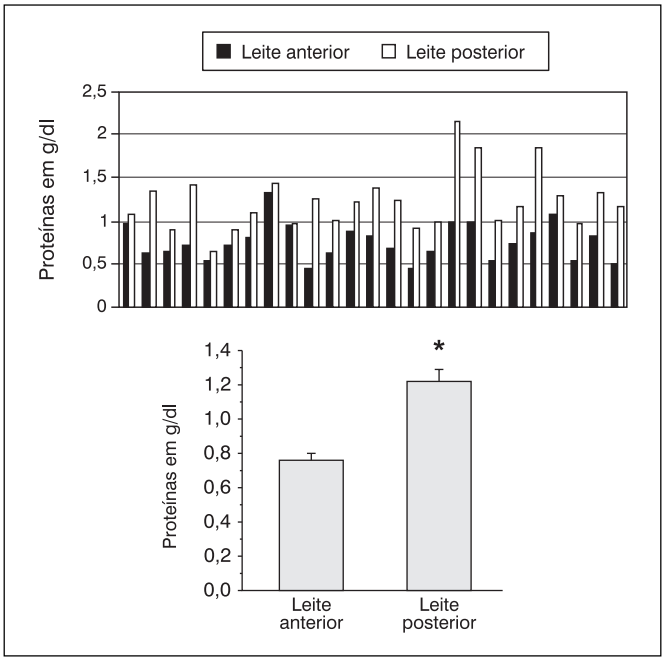


FIG. 3 - Conteúdo protéico demonstrado em 25 amostras de leites no início da mamada (leite anterior) e no final (leite posterior). No painel A as barras representam os valores de proteína em g/dl de cada amostra analisada, e no painel B a média destes E.P.M. O asterísco indica significância estatística (p <0,05) da diferença entre os dois grupos (Anova - teste de Ducan)

géticos predominaram entre 800 a 950 Kcal/L (Fig. 2A e 2B) o que já era de se esperar, uma vez que houve um aumento no conteúdo de gorduras no leite posterior. Este valor é considerado significante no que diz respeito a nutrição de bebês. As gorduras poupam as proteínas para a síntese de tecidos, ao invés destas serem utilizadas para a produção de energia (Karlson *et al*., 1978). Desta forma, como o leite final proporciona maior ingestão de calorias é importante que não se interrompa a mamada ou que a ordenha manual não se limite apenas ao leite inicial, pois seu conteúdo calórico é insuficiente.

De acordo com os nossos resultados a concentração de proteínas no leite de final de peito na maioria das amostras, mostrou-se quase o dobro daquela encontrada no leite do início (Fig. 3). As proteínas estão presentes em todas as fases de maturação do leite. Nas amostras obtidas no início da mamada predominam as proteínas hidrossolúveis (albuminas e globulinas) as quais não têm função nutricional e sim de defesa. Por outro lado, no leite de final de peito a fração protéica é predominantemente formada pela caseína, uma proteína que tem função plástica. A caseína carreia a matéria nitrogenada sustentando o aporte protéico e energético do lactente (Block *et al.*, 1985).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho enfatizam o valor nutricional do leite de final de peito, ressaltando assim a importância de não se limitar arbitrariamente a duração da mamada, para que o infante possa ingerir um alimento em quantidades apropriadas de nutrientes necessários para o seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, o contato da mãe com o filho durante a amamentação facilita a aproximação. Portanto, torna-se imprescindível uma prévia orientação das mães em relação a importância da amamentação para o filho bem como a maneira adequada de amamentá-lo.

REFERÊNCIAS

1. **Block, G.** Nutrient sources in the american diet: quantitative data from the NHANES II survey: macronutrients and fets. *American Journal Epidemiological*, p.122-127, 1985.
2. **Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitaties of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* v.72; p.248-254, 1976.
3. **Drewett, R. T.** Returning to the suckled: a further test of Hall's hypothesis. *Early humam,* v.6, p.161-163, 1982.
4. **Ducan, B. E. Y.; J., Holber, C. J.; Wright, A. L.; Martinez, F. D.; Taussing, L. M.** Exclusive breastfeeding for lest 4 months protects against ottitis media. *Pediatrics*, 91(5), p.867-872, 1993.
5. **Fomon, F. J.** Indices of fatness and colesterol in relation to feeding and growth during early infancy. *Pediatric Research*, v.18, p.1233, 1984.
6. **Howie, P. W.; Forayth, J. S.; Ogston, S. A.; Clack, A.; Florey, D. D.** Protective effect of breast feeding against infection. *Brasilian Medical Journal*, p.300-311, 1990.
7. **Karlson, P.; Gerok, W.; Gross, W.** *Patobioquímica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.321. 1978.
8. **Lawrence, R. A.** *Breastfeeding: a guide to the medical profession.* 3rd ed. Saint Louis. The CV Mosby Company, 1989.
9. **Lucas, A.; Gibbs, J. A. H.; Lyster, R. L. J.; Baum, J. D.** Crematocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *British Medical Journal*, v.1, p.1018-1020; 1978.
10. **Rogan, W. J.; Gladen, B. C.** Breastfeeding and cognitive development. *Early Human Development*, v.31, p.181-193, 1993.
11. **Southgate, D. A T.; Durnin, J. V. G. A.** Calorie conversion factors. An experimental reassessment of the factors used in the calculation of the energy value of human diets. *British Journal of Nutrition*, v.24, p.517, 1970.
12. **Tozzi, A. E.; Perzzotti, P.; Greco, D.** Does breastfeeding delay progression to AIDS in HIV-infected children? *AIDS*, v.4, p.1293-1294, 1993.

Endereço para correspondência:
Nylane Maria Nunes de Alencar
Rua Bento Albuquerque 685, apto. 1601 - Cocó - 60190-080 - Fortaleza - CE
Tels. (0xx85)262-0420 / 9992-4835
E-mail: cami@ufc.br

Diagnóstico coproparasitológico: estudo comparativo entre os métodos de Faust & cols., Lutz, Baermann & Moraes e Coprotest®*

Coproparasitological diagnosis: comparative study between Faust *et al*., Lutz, Baermann & Moraes and Coprotest® methods

Flavia Mattos de Carvalho[1]; Ágatha Orlandi Falcão[1]; Maíra Cavalcanti de Albuquerque[2]; Pedrina da Silva[4]; Otílio Machado Pereira Bastos[3] & Cláudia Maria Antunes Uchôa[3]

RESUMO – Foram avaliadas parasitologicamente amostras fecais provenientes de 145 indivíduos pelos métodos de Faust & cols, Lutz e Coprotest®, das quais 73 foram positivas por pelo menos um dos métodos. 116 amostras foram analisadas pelo Baermann & Moraes sendo todas negativas. O Coprotest® apresentou maior eficiência para evidenciação de *Blastocystis hominis* e o Faust & cols. para *Trichuris trichiura*. Todos os métodos apresentaram boa sensibilidade diagnóstica, sendo que a associação destes demonstrou melhor eficácia diagnóstica.

PALAVRAS-CHAVE – Diagnóstico, parasitas intestinais, comparação de métodos.

SUMMARY *– Fecal samples of 145 individuals were studied by Faust* et al.*, Lutz and Coprotest® methods. 73 of them were positive by one of the methods. All the 116 samples examined by Baermann & Moraes were negative. Coprotest® showed efficacy to detect* Blastocystis hominis *and Faust* et al. *to* Trichuris trichiura*. All methods were able to detect parasites, although the association of them showed best results.*

KEYWORDS *– Diagnosis, intestinal parasites, methods'comparison.*

INTRODUÇÃO

As enteropasitoses continuam sendo uma importante causa de morbidade humana, principalmente em regiões onde existem baixas condições de saneamento básico e educação sanitária[11,12]. Apesar de serem encontradas infecções parasitárias intestinais em hospedeiros de diversas faixas etárias, os pré-escolares e escolares apresentam maior índice parasitário, não só quanto a maioria das espécies como na carga parasitária, onde pode ocorre redução do desenvolvimento físico-mental[5,11].

No coprodiagnóstico parasitológico utilizam-se diversas metodologias, com fundamentos distintos. A utilização simultânea de técnicas com diferentes fundamentos, com o objetivo de aumentar a acurácia diagnóstica e, conseqüentemente, diminuir os resultados falso-negativos, bem como a comparação de diversas técnicas tem sido estudadas por diversos autores[2,4,6,7,9,11]. Está estabelecido que a coleta múltipla de amostras, em diferentes dias aumenta eficácia do diagnóstico[1,6].

O presente estudo teve como objetivo comparar a eficiência dos métodos de Faust & cols., Lutz, Baermann & Moraes e Coprotest® no diagnóstico coproparasitológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram pesquisadas amostras fecais de 145 indivíduos de comunidades populares de Niterói, sendo 73 do bairro de Jurujuba; 54 de São Francisco (Morro do Cavalão) e 18 de Icaraí (Morro da Cotia).

Foram coletadas quatro amostras fecais de cada indivíduo, armazenadas em frascos plásticos não estéreis e limpos. Duas com conservante de Raillet & Henry, em dias diferentes, sendo homogeneizadas e processadas pelas técnicas de Lutz[10] e Faust & cols.[3], e sendo uma amostra, contendo fezes frescas, submetida à técnica de Baermann & Moraes[10]. A última foi coletada no Kit Coprotest®, sendo processada segundo instruções do fabricante, tendo como fundamento a centrifugo-sedimentação pelo formol-acetato de etila[13]. Para facilitar a visualização de estruturas parasitárias,

Recebido em 9/4/2002
Aprovado em 15/4/2002
*Trabalho desenvolvido na Disciplina de Parasitologia do Depto. de Microbiologia e Parasitologia - Inst. Biomédico - Univ. Federal Fluminense – Niterói, RJ
[1]Discente do Curso de Enfermagem/UFF; [2]Discente do Curso de Ciências Biológicas/UFF;
[3]Docente da Disciplina de Parasitologia; [4]Técnica da Disciplina de Parasitologia

na leitura do material, acrescentou-se 1 gota de solução salina (NaCl 0,89%) diretamente na lâmina, diluindo-o.

RESULTADOS

Foram processadas 406 amostras, sendo 145 pelas técnicas de Faust & cols.[3] e Lutz[10], 145 pelo Coprotest® e 116 pela técnica de Baermann & Moraes[10]. Em relação as 116 amostras frescas, todas foram negativas para essas técnicas (Tabela I). Das amostras dos 145 indivíduos estudadas pelos outros três métodos 73/145 (50,3%) foram positivas por pelo menos uma das técnicas e 72/145 (49,7%) negativas pelas três metodologias. O Coprotest® apresentou positividade em 59/145 amostras (40,7%), o Faust & cols. em 57/145 (39,3%) e o Lutz em 53/145 (36,5%) quando usados isoladamente. Na evidenciação da maioria das espécies parasitárias não foram observadas grandes diferenças na positividade, quando utilizados os métodos isoladamente, exceto na detecção de *Blastocystis hominis* pelo Coprotest® o qual apresentou positividade em 13 amostras e para *Trichuris trichiura* pelo método de Faust & cols. com detecção em 7 amostras (Tabela II). Em 17 amostras, positivas avaliadas pelos três métodos, foram evidenciadas diferentes espécies parasitárias.

TABELA I
Resultados encontrados através da análise de amostras de 145 indivíduos residentes em comunidades carentes de Niterói, RJ, Brasil em 2001

	Métodos							Total
	Faust	Lutz	Coprotest®	Faust/Lutz /Coprotest®	Faust/ Lutz	Faust/ Coprotest®	Lutz/ Coprotest®	
Positivo	03	02	12	40	09	05	02	73
Negativo	02	05	09	72	12	02	03	105

TABELA II
Espécies parasitárias evidenciadas pelos métodos de Faust & colaboradores, Lutz e Coprotest®, em amostras fecais de 145 indivíduos, provenientes de comunidades carentes de Niterói, Rio de Janeiro, RJ em 2001

Espécies	Métodos						
	Faust	Lutz	Coprotest®	Faust/Lutz /Coprotest®	Faust/ Lutz	Faust/ Coprotest®	Lutz Coprotest®
Giardia lamblia	2	3	6	23	5	3	2
Entamoeba histolytica	0	0	1	1	0	0	0
Entamoeba coli	0	2	1	7	2	3	2
Endolimax nana	0	2	1	0	2	0	1
Blastocystis hominis	1	2	9	2	1	2	0
Ascaris lumbricoides	0	0	0	6	0	0	3
Trichuris trichiura	4	0	0	2	0	1	0
Iodamoeba butschilii	0	0	0	1	0	0	0
Enterobius vermicularis	0	0	1	1	0	0	0
Total	7	9	19	43	10	9	8

DISCUSSÃO

No presente estudo não foi observada positividade pela técnica de Baermann & Moraes nas 116 amostras. Nunes e cols.[9], estudando 400 amostras fecais, observaram positividade em 57. Já, Mello, Rocha & Moreira[6], em um estudo com 182 amostras, obtiveram positividade em 9. A ausência de positividade para larvas de nematóides, no presente estudo, sugere a inexistência ou baixa circulação de *Strongyloides stercoralis* nas áreas estudadas, estando associado à condições ambientais desfavoráveis ao parasita, uma vez que, apesar de se ter deficiência no saneamento e condições higiênicas precárias favorecendo a contaminação fecal do solo, a compactação do mesmo e a insolação direta provavelmente inviabilizam a sobrevivência de larvas neste ecossistema. A não recuperação de ovos ou larvas de ancilostomídeos na amostra, também demonstra a possível baixa circulação ou inexistência de infecções parasitarias ativas cutâneas.

Os dados deste trabalho sugerem que as três técnicas avaliadas apresentaram eficiência diagnóstica similares (Coprotest® -40,7%; Faust & cols. -39,3% e Lutz -36,5%). Tal fato, também, foi observado por Mello e cols.[7] num estudo comparativo entre Coprotest® e sedimentação espontânea, com 76 amostras, no qual os autores propõem o uso de ambas indistintamente na rotina laboratorial.

Nunes e cols.[9] avaliando os métodos de Faust & cols e Hoffman, Pons & Janer na rotina sistemática para diagnóstico das enteroparasitoses, verificaram eficácia semelhante para os dois métodos, observando maior sensibilidade para detecção de cistos de protozoários e ovos leves por Faust & cols e melhor desempenho da técnica de Hoffman, Pons & Janer na detecção de ovos pesados de helmintos.

Cerqueira & Barreto[2], num estudo comparativo entre sedimentação espontânea Ritchie e sedimentação por centrifugação, sugerem que a técnica de sedimentação espontânea continua sendo a melhor técnica para pesquisa de ovos de helmintos, perdendo eficiência na detecção das formas de enteroprotozoários sem, contudo, deixar de ser considerada uma excelente técnica (mesmo para estes).

Neste estudo, foram observadas pequenas diferenças na capacidade de detecção, para a maioria das estruturas parasitárias, pelos três métodos. O Coprotest® mostrou-se mais eficiente na detecção de *Blastocystis hominis* quando comparado aos demais. Já o Faust & cols mostrou-se mais eficiente para diagnóstico de *Trichuris trichiura*. Fioriti e cols.[4] também observaram tal discordância entre Lutz e Coprotest® na detecção de *Blastocystis hominis*, embora ambas concordem na evidenciação de helmintos. O uso dos três métodos associados demonstrou aumento da eficiência diagnóstica.

O encontro de diferentes espécies parasitárias em 17 das amostras positivas pode ter sido oriunda de erros do operador no procedimento técnico, variação na sensibilidade do método em relação à estrutura parasitária ou diferenças de carga parasitaria nas amostras coletadas em dias diferentes. Segundo Mello, Rocha & Moreira[6] a possibilidade da coleta de múltiplas amostras fecais, aumenta a sensibilidade de detecção parasitária, especialmente naquelas que apresentam perío-

do negativo como na giardíase. Cartwright[1] verificou que o uso de apenas uma amostra gera uma sensibilidade de 75,9%, sendo aumentada para 92% com a coleta em dois dias diferentes. Uma terceira coleta gera informações adicionais em apenas 8% das amostras.

O Coprotest® apresentou fácil exeqüibilidade, reduzindo o mau cheiro, vidraria, e reduzindo o tempo de execução, demonstrando-se bastante eficiente no coprodiagnóstico, em especial na detecção de *Blastocystis hominis*. Tais fatos também foram observados por Fioriti e cols.[4], Mello, Rocha & Moreira[6], os quais relatam que o Coprotest® foi implementado visando aumento da sensibilidade associado a redução do contato com as fezes, tornando o processo mais biosseguro, pois elimina o contato do técnico com fezes frescas.

Segundo Young e cols.[13] o uso do acetato de etila substituindo o éter no processamento de amostras fecais parece aumentar a eficiência na detecção do número global de formas parasitarias de organismos e variedade de espécies, sem distorcer ou alterar sua morfologia. O acetato de etila é menos inflamável que o éter, além de não ter limitações para uso, sendo mais eficiente na detecção de cistos de *Giardia lamblia* e ovos de *Hymenolepis nana*. Tal fato também foi observado no presente trabalho.

Foi verificado, neste estudo, que pelo Coprotest®, o material para leitura mantém muitos resíduos, dificultando a visualização das estruturas. Objetivando reduzir este problema, a técnica foi modificada, sendo o material diluído posteriormente sobre a lâmina com uma gota de solução salina (NaCl 0,89%), o que resultou em campos de leitura mais limpos.

A associação de métodos no estudo das amostras dos 145 indivíduos aumentou a eficiência no diagnóstico, havendo concordância de positividade em 27,6% destas. Santos e cols.[11] relatam que a realização de exames coproscópicos por dois métodos (Faust & cols. e Hoffman, Pons & Janer) visa aumentar a probabilidade de diagnóstico, tendo em vista a maior eficiência de cada um dos métodos.

Mesquita e cols.[8] sugerem que para obtenção de maior eficiência, em qualquer diagnóstico parasitológico por contaminação fecal, torna-se ideal o uso de pelo menos duas técnicas com fundamentos diferentes.

Uma vez que foi observado similariedade nos resultados obtidos pelos diferentes métodos, pode-se concluir que todos apresentaram significativa eficiência no coprodiagnóstico. Deve-se ressaltar, contudo, que a associação de métodos aumenta a acurácia diagnóstica, bem como quando é utilizada a coleta de amostras múltiplas no mesmo frasco ou não.

AGRADECIMENTOS

À Fases Rio Produtos Laboratoriais, na pessoa do Sr. Sérgio Rodrigues e à NL Comércio Exterior, pela doação dos *kits* Coprotest®, para a realização deste trabalho. Ao PROEX da UFF, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. **Cartwright, C. P.** Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8): 2408-2411,1999.
2. **Cerqueira, E.T. L.; Barreto, R. O.** Avaliação da eficácia de três métodos no diagnóstico de parasitoses intestinais. *Revista Brasileira de Análises Clinicas*, 25(3): 85-86,1993.
3. **Faust, E. C.; D'Antoni, J. S.; Odon, V.; Miller, M. J.; Perez, C.; Sawitz, W.; Thomen, L. F.; Tobie, J.; Walker, J. H.** A critical study of clinical laboratory technics of the diagnosis of protozoan cysts and helminths eggs in feces. I – Preliminary communication. *American Journal of Tropical Medicine*, 18:169, 1938.
4. **Fioriti, L. S.; Salvarani, J. J.; Mendes, C. R.; Teixeira, A. T. L. S.; Dias, L. C. S.** Avaliação de técnicas parasitológicas no diagnóstico laboratorial de parasitoses intestinais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(SI):293, 2001.
5. **Hlaing, T.** Ascariasis and childhood malnutrition. *Parasitology.* 107:S125-S136, 1993.
6. **Mello, R. T.; Rocha, M. O.; Moreira, M. C. C. G.** Exame parasitológico de fezes: estudo comparativo entre os métodos Coprotest, MIFC, Baermann e Kato. *Revista Brasileira de Análises Clinicas*, 32(4):289-291, 2000.
7. **Mello, R. T.; Rocha, M. O.; Costa, C. A.; Giovannini, H. R.; Moreira, M. C. C. G.** Estudo comparativo entre os métodos Coprotest e de Hoffman, Pons e Janer no diagnóstico de parasitoses intestinais. *Revista de Farmácia e Bioquímica da UFMG*, 10:9-15, 1989.
8. **Mesquita, V. C. L; Serra, C. M. B; Bastos, O. M. P.; Uchôa, C. M. A.** Contaminação por enteroparasitoses em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(4):363-366, 1999.
9. **Nunes, M. P. O.; Costa, M. S. G.; Nunes, J. F. L.; Silva, E. M. A.; Dantas, M. F. A.** Avaliação dos métodos de Faust & cols.; de Hoffman & cols.; de Baermann modificado, utilizados na rotina sistemática, para o diagnóstico das enteroparasitoses. *Revista Brasileira de Análises Clinicas*, 25(1):25-26,1993.
10. **Rey, L.** Métodos e técnicas usuais em parasitologia. *In:* **Rey L.** *Parasitologia*, 2ª Edição, Editora Guanabara Koogan, 681-693, 1991.
11. **Santos, C. S.; Carnaval, E. B.; Leal, A. C. P.; Silva, F. C.; Sato, H. I.; Hansen, M. G.** Inquérito parasitológico pelo exame de fezes em crianças pertencentes a creches no Rio de Janeiro. *Jornal de Pediatria*, 56(3):97-100, 1984.
12. **Tavares-Dias, M.; Grandini, A. A.** Prevalências e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José de Bela Vista, São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:63-65, 1999.
13. **Young, K. H.; Bullock, S. L.; Melvin, D. M.; Spruill, C. L.** Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether the formalin-ether sedimentation tecnique. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(6):852-853, 1979.

Endereço para correspondência:
Profª Claudia Maria Antunes Uchoa Souto Maior
Instituto Biomédico – Disciplina de Parasitologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Univ. Federal Fluminense
Rua Prof. Hernani de Melo, 101 - 2º and. - Valonguinho - Niterói, RJ - 24210-130
Telefax: (0xx21)2620-623 / 2620-5266
E-mail: uchoa@radnet.com.br

Seminário de Atualização Científica promovido pela SBAC
Discussão de casos clínicos
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

Estudo imunocitoquímico de proliferação celular (MIB-1) em sedimento de fluido peritoneal na endometriose pélvica

Immunocytochemical study of cellular proliferation (MIB-1) on peritoneal fluid sedment in pelvic endometriosis

José Eleutério Junior[1]; Diane Isabelle Magno Cavalcante[2]; Francisco das Chagas Medeiros[3] & Francisco Valdeci de Almeida Ferreira[4]

RESUMO – Foi objetivo do presente estudo avaliar a atividade proliferativa (MIB-1) de célula endometriais e macrófagos peritoneais em esfregaços de sedimento de fluido peritoneal de pacientes com endometriose em relação a um grupo de referência. Estudou-se a atividade proliferativa (MIB-1) de células endometriais e de macrófagos peritoneais, em esfregaços do sedimento de fluido peritoneal de 20 casos de endometriose pélvica e 20 de um grupo de referência. Os dados foram submetidos ao teste t de Student para significância estatística. A expressão de MIB-1 (atividade proliferativa) em célula endometriais teve uma média de 3,73%. O grupo de referência teve uma expressão média de 2,99%. Não houve diferença significante entre os grupos ($p = 0,5316$). Em macrófagos peritoneais a atividade proliferativa, estudando todos os casos foi maior no grupo com endometriose pélvica ($p < 0,0001$). Desta forma, não houve diferença da expressão de MIB-1 em células endometriais entre casos do grupo de endometriose e do grupo de referência, em contraste com o comportamento em tecidos. Mas, a atividade proliferativa de macrófagos foi significativamente maior no grupo de endometriose pélvica, indicando um importante papel na sua patogênese. Um maior número de casos deve ser estudado para melhor avaliar os achados.

PALAVRAS-CHAVE – Endometriose, atividade proliferativa, MIB-1(Ki67).

SUMMARY *– The purpose of this study was to evaluate the proliferative activity (MIB-1) in endometrial-like cells and peritoneal macrophages on smears of peritoneal fluid sediment from patients with endometriosis and a control group. Proliferative activity (MIB-1) was studied in smears of endometrial-like cells and peritoneal macrophages, on peritoneal fluid sediment, in 20 cases with pelvic endometriosis and 20 of control group. The data were submitted to t Student test to evaluate statistical significance. MIB-1 expression (proliferative activity) in endomerial-like cells was demonstrated in 12 cases, in endometriosis group, with a mean of 3.73%. The control group had a mean expression of 2.99%. There was no statistical significance ($p = 0.5316$). In peritoneal macrophages the proliferative activity (MIB-1), studying all cases, was higher in endometriosis group (9.38%) than in control group (2.03%) ($p < 0.0001$). There was no difference of MIB-1 in endometrial-like cells between cases with endometriosis and control group, in contrast with tissue behavior. But the macrophages proliferative activity was significantly different between the groups, indicating an important role in pathogenesis of endometriosis. More cases must be studied to better evaluation of these findings.*

KEYWORDS *– Endometriosis, peritoneal fluid, proliferative activity, MIB-1 (Ki67).*

INTRODUÇÃO

O anticorpo monoclonal Ki-67 (MIB-1), reconhece um antígeno nuclear que é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto G0[1]. Em 1984, Gerdes e cols.[2], reportaram uma correlação entre a fração de células proliferativas, medida por autorradiografia após incorporação de timidina, e o número de células coradas pelo anticorpo Ki-67 (MIB-1). Atualmente, o uso de anticorpo monoclonal Ki-67 (MIB-1) apresenta-se como uma técnica simples, rápida e sensível para detectar atividade proliferativa celular[3] . Em uma revisão da literatura Brown e Gatter (1990)[3] concluem que este anticorpo pode ser amplamente utilizado para medir estado proliferativo de populações celulares em uma variedade de lesões neoplásicas, condições não neoplásicas e tecido normal.

Considerando-se ser a endometriose peritoneal e ovariana um estado de maior proliferação epitelial onde a regulação hormonal é diferente da do endométrio, observou-se em estudos de biópsia, uma mais alta atividade proliferativa de lesões endometrióticas, basicamente as vermelhas, nas fases menstrual e secretória explicada pela falha de expressão de receptores de progesterona em suprimir a atividade proliferativa na fase secretória[1].

Levando-se em conta que os esfregaços de sedimento de fluido peritoneal de pacientes com endometriose pélvica contém numerosas células mesoteliais, podendo apresentar também grupos de células uniformes com grande núcleo vesicular, cromatina grosseira e escasso citoplasma, sugerindo tratar-se de células de características endometriais[4,5], além de macrófagos de forma

Recebido em 27/2/2002
Aprovado em 6/3/2002
[1]Professor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; [2]Residente do Departamento de Patologia e Medicina Legal; [3]Professor do Departamento Materno-infantil; [4]Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará.

quase constante[4], é possível imaginar a possibilidade de estudar o estado proliferativo (MIB-1) de elementos glandulares e de macrófagos nestes esfregaços. Assim, é objetivo deste estudo fazer esta abordagem e identificar possíveis diferenças de atividade proliferativa epitelial e/ou macrofágica em elementos de fluido peritoneal de pacientes com endometriose pélvica em relação a uma população sem a doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta esfregaços confeccionados (20 à partir de um grupo de mulheres com endometriose pélvica e 20 de mulheres submetidas a laparoscopia com outros diagnósticos, considerado grupo de referência) foram processados por imunocitoquímica para identificação de atividade proliferativa (MIB-1) de células epiteliais e macrófagos. A idade média das pacientes do grupo endometriose foi de 31,5 anos e do grupo controle foi de 32,2 anos. As laparoscopias de forma rotineira eram realizadas na primeira fase do ciclo menstrual.

Os esfregaços fixados em álcool a 95% foram submetidos a recuperação antigênica em microondas (15min, 650W em tampão citrato), em seguida, incubados com anticorpo monoclonal MIB-1 (clone KiS5 Dako) por 14 horas em câmara úmida. A revelação foi feita com complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP).

Nos esfegaços, através de análise em microscopia óptica, utilizando videomicroscópio com câmera de marca Samsung acoplada a microscópio Nikon triocular, com placa de captura de imagem e vídeo, em computador com placa Intel tipo KII 66, foram observados os percentuais de núcleos marcados em células com características citomorfológicas de origem endometrial e em macrófagos, na tentativa de quantificar e relacionar sua atividade proliferativa. Todas as análises foram realizadas utilizando-se aumentos de 400 e 1000 vezes, contando-se um mínimo de 200 células por esfregaço para cada grupo estudado. Foi utilizado o teste t de Student para significância estatística.

O projeto de pesquisa foi apreciado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição.

RESULTADOS

A expressão de MIB-1 em células epiteliais foi possível em apenas 12 casos do grupo de endometrióticas, pois não haviam grupamentos com características que permitissem afirmar serem células com provável origem endometrial nos demais casos. Dentre aqueles com grupamentos epiteliais tipo glandular, apenas um foi negativo para MIB-1 (8,33%). Dos positivos a proporção média de expressão entre as células de aparência epitelial foi de 3,73% (desvio padrão [dp]=1,63%) . No grupo de referência a positividade ocorreu em 3 de 6 casos (50%) em que se identificaram tais células epiteliais, tendo uma proporção média de 2,99% (dp=1,58%). (p = 0,5316) (Figura 1).

O MIB-1 em macrófagos mostrou-se positivo em todos os casos de endometriose pélvica (expressão média de 9,38% e dp de 2,62%) e em 55% nos casos de referência (expressão média de 2,79% e dp 1,84%). (p<0,0001). Ressalte-se que a expressão de MIB-1 entre as endometrióticas nunca foi inferior a 5% e entre os casos controle nunca foi superior ou igual a 5% (Figura 2).

Fazendo-se uma incursão apenas nos casos de endometriose em que lesões vermelhas foram identificadas durante a laparoscopia, observou-se expressão média de MIB-1 em células epiteliais (presente em 85% dos casos estudados) de 3,5% (dp=1,77%) (Figura 3) e em macrófagos (presente em 100% dos casos estudados) expressou-se numa média de 9,22% (dp=2,7%) (Figura 4).

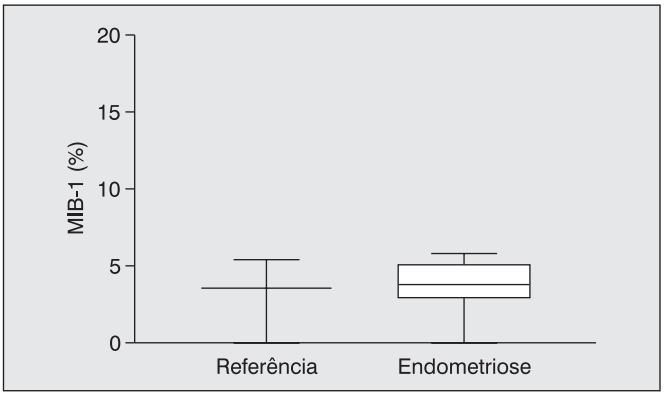


FIG. 1 - Expressão de MIB-1 em células tipo endometrial de esfregaços de fluido peritoneal em pacientes com endometriose (n=12) e grupo de referência (n=3). Intervalo de confiança 95%. p = 0,5316

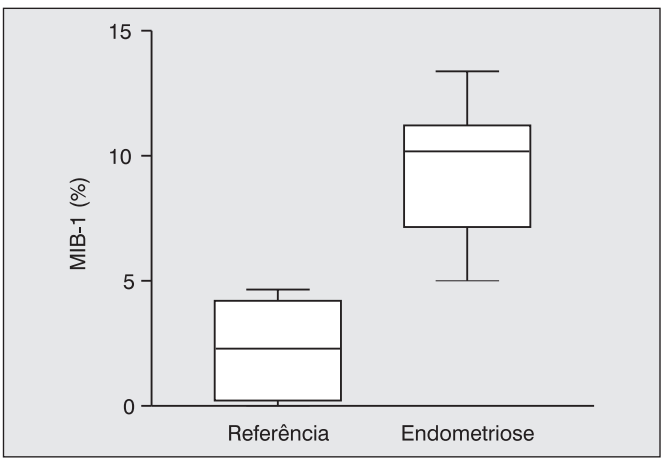


FIG. 2 - Expressão de MIB-1 em macrófagos de esfregaços de fluido peritoneal em pacientes com endometriose (n=20) e grupo de referência (n=20). Intervalo de confiança 95%. p < 0,0001

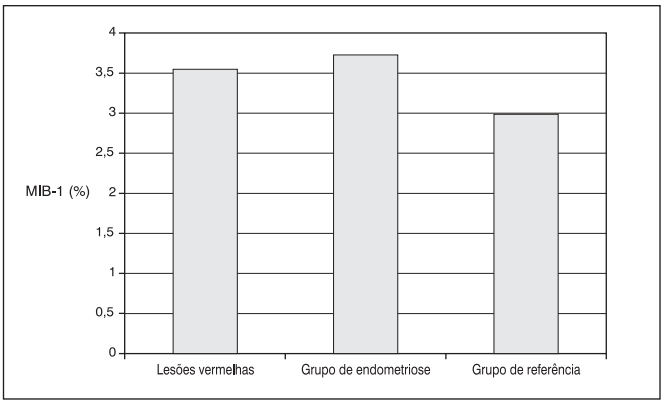


FIG. 3 - Comparação entre a expressão média de MIB-1 em células tipo endometrial entre casos de endometriose com lesão vermelha e grupos de endometriose e referência.

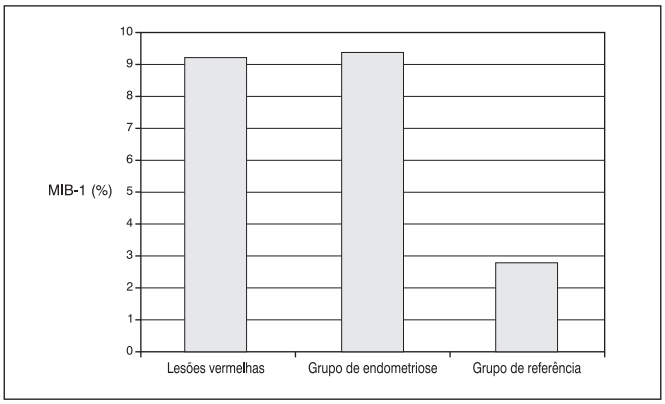


FIG. 4 - Comparação entre a expressão média de MIB-1 em macrófagos peritoneais de casos de endometriose com lesão vermelha e grupos de endometriose e referência.

DISCUSSÃO

Em tecidos endometrióticos, Klein e cols. (apud Nisolle e Donnez, 1997)[1] observaram ocasionais células glandulares coradas, em tecido, pelo Ki-67 em uma taxa consistentemente menor que 1%. Ao contrário, Nisolle e Donnez (1997)[1], encontraram uma maior índice de proliferação glandular em endométrio ectópico (0,2 a 41%). Durante a fase secretória houve uma redução neste índice tanto em lesões vermelhas como em lesões negras. Estes autores sustentam também uma independência hormonal relativa ou, pelo menos, a existência de mecanismo de controle diferente em relação a focos endometrióticos.

Na análise de MIB-1 em células com características epiteliais se observou expressão no grupo de pacientes com endometriose em 91,67% e no grupo de referência a expressão ocorreu em 50% dos casos, não havendo significância estatística no percentual de núcleos positivos entre os grupos estudados (p=0,5316). Comparando-se com dados até então obtidos em estudos de biópsias, a única observação a ser feita é da falta de conhecimento que se tem sobre o comportamento destas células quer em tecidos, onde a variação de atividade proliferativa encontrada é muito grande, quer em células esfoliadas em fluido peritoneal até então pouco estudadas[1,3].

Levando-se em conta apenas os casos que apresentavam lesões vermelhas à laparoscopia, em 85% das vezes houve expressão de MIB-1 em células com características epiteliais endometriais, cuja média da percentagem de núcleos corados foi de 3,5%, com evidente semelhança ao grupo geral. Assim, os elementos glandulares, em esfregaços de sedimento de fluido peritoneal, parecem, mesmo em condições de aparente ausência de endometriose, manifestar atividade proliferativa, que por sua vez tende a evidenciar-se de maneira semelhante quer com a presença de lesões vermelhas ou não.

Halme e cols. (1987)[6] , sugerem que em casos de endometriose a maturação celular macrofágica ocorre, com aparecimento de células mais volumosas e mais ativas, capazes de liberar substâncias que estimulariam a multiplicação e implante de células endometriais que chegam a cavidade peritoneal. Halme e cols. (1983)[7] (1988)[8], Leslie e cols. (1984)[9], Samejima e cols. (1989)[10], Rana e cols. (1996)[11] e Loh e cols. (1999)[12] consideram que os macrófagos peritoneais, em casos de endometriose, estariam com uma maior ativação e secretando diversas formas de fatores de crescimento. Para Loh e cols. (1999)[12] a diferença entre macrófagos peritoneais em mulheres com endometriose e normais foi mais qualitativa que quantitativa.

Em todos os casos do grupo de endometriose o MIB-1 foi expressado por macrófagos, enquanto no grupo de referência a expressão ocorreu em 55% dos casos. Entre os grupos foi observado uma diferença estatística significante ($p < 0,0001$) do percentual de núcleos corados para MIB-1, indicando claramente uma maior atividade proliferativa macrofágica nos quadros de endometriose. Embora não tenham sido ainda realizado estudos abordando a atividade macrofágica desta maneira, outros têm demonstrado por outras metodologias um papel importante destes elementos celulares na patogênese da endometriose[1,7,8,9,10,11,12].

Assim, embora a atividade proliferativa em células tipo endometrial, avaliadas por MIB-1, presentes em fluido peritoneal tenha se demonstrado de pouca ajuda no acompanhamento e diagnóstico de endometriose, o estudo imunocitoquímico por MIB-1 de macrófagos aponta uma diferença significante entre os grupos de portadoras de endometriose pélvica e referência, que deve ser mais estudada procurando-se um maior número de casos para um melhor conhecimento do enigmático papel destas células no mecanismo da endometriose.

BIBLIOGRAFIA

1. **Nisolle, M.; Donnez, J.** *Peritoneal, ovarian and recto-vaginal endometriosis – the identification of three separate diseases.* 1st Ed. The Parthenon Publishing Group. UK. 1997.
2. **Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H. *et al.*** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133:1710-1715. 1984.
3. **Brown, D. C.; Gatter, K. C.** Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopatology.* 17:489-501. 1990.
4. **Eleutério Jr, J.; Cavalcante, D. I. M.; Ferreira, F. V. A.; Medeiros, F. C.** Receptores de estrógeno e progesterona em células do sedimento de fluido peritoneal na endometriose pélvica: estudo imunohistoquímico. *R.B.G.O.*; 2:83-86. 2001.
5. **Donnez, J.; Wayembergh, M.; Casanas-Roux, F. *et al.*** Syndrome du follicule luteinise non rompu et endométrioe experimentale chez lal lapine. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 16:871-876. 1987.
6. **Ravinsky, E.** Cytology of peritoneal washings in gynecologic patients diagnostic citeria and pitfalls. *Acta Cytol.* 30:8-16. 1986.
7. **Halme, J.; Becker, S.; Stephen, H.** Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. Am. J. Obstet. Gynecol. 156:783-786. 1987.
8. **Halme, J.; Becker, S.; Hammond, M. G. *et al.*** Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 145:333-337. 1983.
9. **Leslie, C. C.; Musson, R. A.; Henson, P. M.** Production of growth factor activity for fibroblasts by human monocyte-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 36:143-59. 1984.
10. **Samejima, T.; Masukaki, H.; Ishimaru, T.; Yamabe, T.** Activity of peritoneal macrophages in endometriosis. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.* 15:175-181. 1989.
11. **Rana, N.; Braun, D. P.; House, R. *et al.*** Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 65:925-30. 1996.
12. **Loh, F.; Bongson, A.; Fong, C. *et al.*** Effects of peritoneal macrophages from women with endometriosis on endometrial cellular proliferation in an in vitro coculture model. *Fertil. Steril.* 72:533-538. 1999.

Correspondência para:
José Eleutério Junior
Rua Tenente Benévolo, 1560 / 202 – Meireles – Fortaleza-CE – 60160-040
E-mail: eleuterio@secrel.com.br

Exame do líquido ascítico nos laboratórios do estado de Santa Catarina

Ascites liquid examination in the state of Santa Catarina

Patrícia Haas; Kenya Thiesen & Cidônia L. Vituri*

RESUMO – Existem numerosos métodos para o estudo do líquido ascítico. Avaliamos a metodologia aplicada nos laboratórios do estado de Santa Catarina, através do envio de questionários para os laboratórios das maiores cidades do Estado, com objetivo de estabelecer um perfil metodológico do exame do líquido ascítico abrangendo as seguintes áreas: as análises citológicas, bioquímicas, microbiológicas e provas complementares. Observamos que nas análises citológicas, bioquímicas e microbiológicas da amostra de líquido ascítico não há uma homogeneidade nos protocolos entre os laboratórios para a maioria das análises.

PALAVRAS-CHAVE – Líquido ascítico.

SUMMARY *– Numerous methods exist for the study of Ascites liquid. We evaluated the methodology applied in the laboratories of the state of Santa Catarina, with the objective of establishing a methodological profile of ascites liquid examinations, questionnaires were sent to the laboratories in the largest cities of the State, covering the following areas: cytological, biochemical and microbiological analyses and supplementary examinations. We observed that in the cytological, biochemical and microbiological analyses of the ascites liquid sample, there was not homogeneity in the protocols among the laboratories for the majority of the analyses.*

KEYWORDS *– Ascites liquid.*

INTRODUÇÃO

A cavidade peritoneal é uma pseudocavidade fechada do organismo. Diz-se pseudo por somente se tornar cavidade quando ocorre um acúmulo de líquido no seu interior[9]. Essa cavidade é revestida por uma membrana serosa que envolve os órgãos da cavidade abdominal e da pelve[9], sendo esta membrana composta por dois folhetos, denominados de membrana parietal (a porção que reveste as paredes da cavidade) e a membrana visceral (a porção que reveste os órgãos)[6,8,9]. Cada um desses folhetos é constituído por uma camada de células mesoteliais repousando sobre um suporte de tecido conjuntivo[6]. Entre esses folhetos há uma quantidade de líquido suficiente para diminuir o atrito sofrido pelas membranas com a movimentação dos órgãos que ela reveste, denominado líquido peritoneal[6,8,9].

O líquido peritoneal é formado através de uma ultrafiltração do plasma pela membrana parietal e reabsorção pela membrana visceral[6,8], sem a participação de nenhum outro material formado pelas células das membranas que revestem esta cavidade[6,8], sendo sua produção e reabsorção dependente da pressão hidrostática exercida pelos capilares, a pressão coloidal (oncótica) exercida pelo plasma, reabsorção linfática e a permeabilidade capilar[6,8]. O volume desse líquido normalmente não se altera, pois a velocidade de produção e de reabsorção são proporcionais[9]. Normalmente existe cerca de 50 ml[3], sendo por alguns autores aceito normal até 100 ml[8] do líquido presente na cavidade peritoneal.

O derrame do líquido peritoneal, recebe o nome de ascite, e o líquido é conhecido como líquido ascítico[3,6,8]. Os derrames podem ser classificados em dois grupos, com base na causa do acumulo de líquido; sendo divididos em transudato e exsudato[1,3,5,6,7,8,9]. Um transudato é um derrame causado por fatores mecânicos ou sistêmicos, rompendo o equilíbrio entre a filtração e a reabsorção (doenças não inflamatórias, como insuficiência cardíaca por exemplo)[3,5,6,7,8,9]. Um exsudato é um derrame causando comprometimento direto dos revestimentos mesoteliais (doenças inflamatórias, infecções e neoplásicas)[3,5,6,7,8,9]. O líquido para a realização dos exames laboratoriais é colhido por aspiração e esse procedimento recebe o nome de paracentese abdominal[1,3,5,6,7,8,9,10].

Os exames de rotina que iram propiciar a classificação em transudato e exsudato são: aparência; contagem celular global e diferencial; análises bioquímicas e microbiológicas as quais são realizadas da mesma maneira em todos os líquidos serosos[9].Entretanto o significado dos resultados e a necessidade de realizar provas especiais variam muito de um líquido para o outro[9].

Recebido em 4/7/2000
Aprovado em 22/11/2001
*Departamento de Análises Clínicas -UFSC

Os protocolos, de rotina, da análise do líquido ascítico incluem cuidados que vão desde o acondicionamento da amostra[2,3,7,9], aspectos físico-químicos[2,3,5,6,7,8,10,11], exames citológicos[1,2,3,4,5,6,7,8,10,11], bioquímicos[2,3,5,7,8,10,11] e microbiológicos[2,3,5,6,7,11]; tendo também como possibilidade para avaliação, provas complementares, as quais possuem uma variabilidade das técnicas entre os laboratórios.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento, em relação ao perfil metodológico do exame de líquido ascítico no estado de Santa Catarina, quanto ao acondicionamento da amostra, às análises citológicas, bioquímicas, microbiológicas 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 -** pH, cor, aspecto e densidade.
- **Citológicas -** citologia global, citologia diferencial.
- **Bioquímicas -** dosagem de glicose, proteínas, amilase e albumina.
- **Microbiológicas -** bacteroscopia, cultura e pesquisa de fungos.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Dos laboratórios que responderam ao questionário pode-se analisar que existe uma variação entre as formas de acondicionamento da amostra biológica. O anticoagulante utilizado para análises citológicas é o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) em 23,1%, a heparina em 23% dos laboratórios e não responderam a pergunta 53,9% dos laboratórios (Figura 1). Quanto ao anticoagulante utilizado nas amostras, para análises bioquímicas, a heparina é utilizada por 23% dos laboratórios; heparina e/ou separação natural em 7,7%; anticoagulante G Winer em 7,7%, e não responderam 61,5%. A quantidade colhida para realização do exame deve ser grande para que fiquem disponíveis amostras adequadas para cada um dos setores do laboratório[9]. A paracentese diagnóstica é realizada na maioria dos pacientes com ascite nova ou já existente, quando houver alteração no quadro do paciente[3]. O volume mínimo para a realização do exame completo é de 30 ml[3,5]. Ainda pode ser realizado a lavagem peritoneal diagnóstica em casos onde se suspeita que o paciente possua um traumatismo fechado na área abdominal, além de avaliar pacientes com suspeita de peritonite aguda ou pancreatite[3]. Pode-se utilizar ainda o líquido de diálise peritoneal, a fim de evidenciar infecções[3,5,6,8]. A importância dos exames realizados depende da suspeita e do tipo de amostra[3]. A coleta da amostra feita para realização de provas bioquímicas geralmente não requer o uso de anticoagulantes[3], ou amostras heparinizadas[9], já as amostras bacteriológicas e citológicas podem ser coletadas com EDTA ou heparina sódica estéril[3,7] e as amostras devem ser concentradas antes da realização dos exames[9]. As amostras destinadas à cultura devem ser colhidas em frascos estéreis[7,9]. Deve ser colhida também uma amostra sem anticoagulante para a observação de coagulação espontânea[9]. Amostras para estudos especiais como *Mycobacterium*, bactérias anaeróbias ou vírus, podem requerer procedimentos de manuseio especiais[3].

Com relação às avaliações físico-químicas (Figura 2) pode-se analisar que haja uma ligeira variação entre os laboratórios que as realizam. O pH é analisado por 84,6% dos laboratórios. O pH auxilia a diferenciação das diversas causas de derrame no líquido ascítico. Principalmente quando associado a contagem leucocitária[3]. Um pH inferior a 7,32 ou uma diferença de pH sangue/líquido ascítico superior a 0,1 apresentam uma sensibilidade e uma especificidade de aproximadamente 90% para a peritonite bacteriana espontânea[3,6,8]. Os pHs inferiores a 7,15 são de mal prognóstico, sendo observado em pacientes com ascite maligna e pancreática e com peritonite tuberculosa[3]. A cor e o aspecto são estudados em todos os laboratórios. O líquido peritoneal normal é transparente e amarelo-claro[5,6,7,9]. A coloração dos derrames transudativos são geralmente claros e com coloração amarelo-pálida e é límpido ou ligeiramente opalescente[3,7], se houver icterícia intensa a coloração pode assumir tonalidade amarela[7], enquanto que os exsudativos são opacos ou turvos em decorrência do acúmulo de leucócitos, células tumorais, microorganismos e da concentração de proteínas[3,5,6,8], sendo indicativo de infecções bacterianas ou fúngicas[9]. A presença de partículas estranhas, de alimentos ou coloração esverdeada pela bile numa amostra de lavagem peritoneal diagnóstica indicam perfurações do trato gastro intestinal

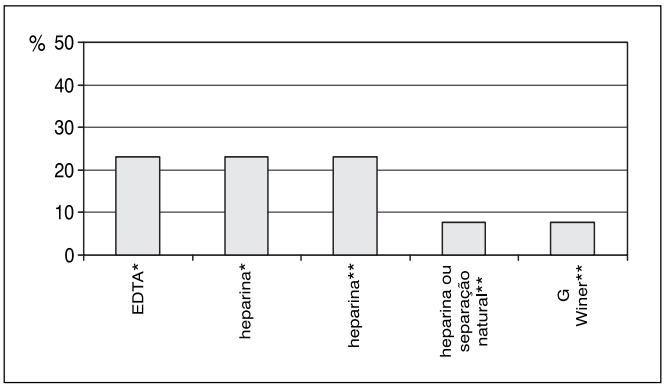


FIG. 1 - Anticoagulantes utilizados para coleta da amostra de líquido ascítico no estado de Santa Catarina.

***Utilizado para amostras de análises citológicas.**
****Utilizadas para amostras de análises bioquímicas.**

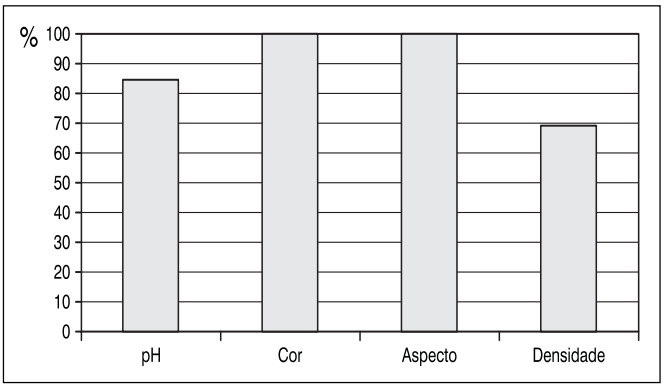


FIG. 2 - Exames físico-químicos realizados no líquido ascítico no estado de Santa Catarina.

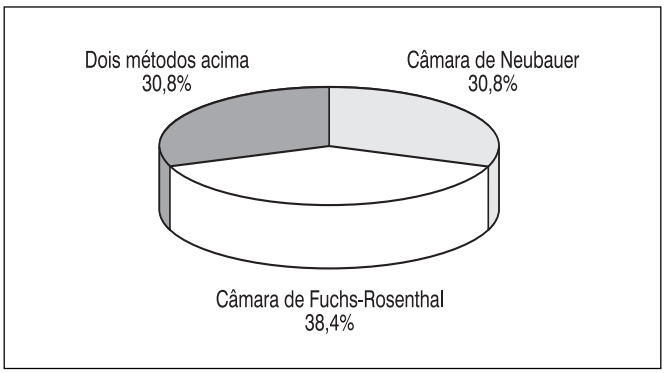


FIG. 3 - Métodos utilizados para contagem celular no líquido ascítico no estado de Santa Catarina.

***É a associação de um método manual com um método automatizado (75%) ou dois métodos manuais.**

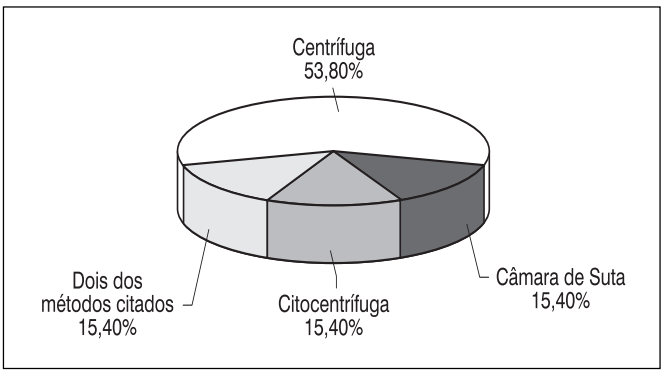


FIG. 4 - Métodos utilizados para concentração celular do líquido ascítico no estado de Santa Catarina.

ou biliar, a pancreatite e a colescistite, também possuem essa coloração[3,5,6,8,9], a presença de bile pode ser confirmada com o uso de provas bioquímicas convencionais para detecção de bilirrubina[9], ou mesmo com as fitas de urinálise[5,9]. O líquido hemorrágico deve ser diferenciado da punção traumática, onde o sangue usualmente clareia no decorrer da punção[3,5]. A ascite hemorrágica não associada a acidente de punção é observada nos processos malignos e na tuberculose[3] e em neoplasias[5,7]. Já o líquido leitoso que não clareia com a centrifugação sugere uma efusão quilosa (onde a turvação é decorrente da presença de lipoproteínas e quilomícrons[11]) ou pseudoquilosa (onde a turvação é decorrente da presença de restos celulares, ocasionalmente associadas a neoplasias e infecções intra-abdominais[11]), que são causadas por rupturas ou bloqueios do fluxo linfático por trauma, carcinoma, tuberculose, cirrose hepática e outras patologias[3,5,7,9], o exame celular pode mostrar macrófagos fagocitando gordura[9]. A densidade é analisada em 69,2% dos laboratórios,30,8% não responderam. A densidade do transudato é geralmente inferior a 1,016, e nos transudatos normalmente é superior a 1,016[1,7].

Quanto às analises citológicas (Figura 3) o que se observou foi: a citologia global é realizada através da contagem em câmara de Neubauer por 30,8% dos estabelecimentos, através da câmara de Fuchs-Rosenthal por 38,4%, é utilizado dois dos métodos citados por 30,8% dos laboratórios, sendo que destes, 75% realizam a contagem através de um método manual e através de automação. A contagem celular deve ser feita com a câmara de Neubauer. Quando se utilizar contadores eletrônicos, é preciso corrigir as inclusões de células teciduais e evitar o entupimento das tubulações do aparelho por resíduos contidos no líquido[9]. Já na citologia diferencial (Figura 4), é utilizado como método de concentração celular a centrífuga em 53,8%, através da câmara de Suta em 15,4%, através de citocentrifuga em 15,4%, são utilizados dois dos métodos de concentração celular citados em 15,4% dos estabelecimentos que participaram da pesquisa. A contagem normal de hemácias em geral fica abaixo de 100.000/ml[9], já os leucócitos são inferiores a 300/ml[1,9], sendo considerada por alguns autores normal até 500 leucócitos/ml[4,7,8,11]. Nos transudatos não infectados predominam habitualmente as células endoteliais e mesoteliais, sendo escassa a celularidade[7]. O achado de mais de 500 leucócitos/ml sugere infecção, cirrose ou neoplasia[5,7,9,11]. Para se diferenciar a cirrose da infecção deve–se fazer uma contagem absoluta de granulócitos: valores superiores a 250/ml^3 indicam infecção[5,6,8,9]. Quando o líquido ascítico exibe elevada concentração de leucócitos, com predomínio de polimorfonucleares, trata-se geralmente de infecção bacteriana aguda[7]. Se as células mononucleares constituírem percentual superior a 80%, o diagnóstico provável é de tuberculose

peritoneal[7], embora existam exceções[11]. O achado de numerosas hemácias é sugestivo de traumatismo hemorrágico[9,11], neoplasia (principalmente o carcinoma hepatocelular ou do ovário[11]) ou tuberculose[7,11]. Se o líquido mostra-se sanguinolento a olho nu, pode não ser necessário realizar a contagem[5,9]. A análise do líquido de lavagem fornece resultados precisos na detecção de hemorragia intra-abdominal por traumatismo abrupto, o número de hemácias e leucócitos ajudam a definir se há necessidade de cirurgia ou não[9]. É importante a pesquisa de células neoplásicas, feita sempre que possível por especialistas, já que existe grande risco dos endoteliócitos e mesoteliócitos serem confundidos com células malignas[5,6,7,8,9], além da importância na detecção de metastases[9]. Mudanças no líquido extracelular podem resultar em mudanças na contagem de leucócitos no líquido ascítico, por exemplo durante diureses, onde a contagem varia desde 300 leucócitos/ml até 1000 leucócitos/ml[3,5,6,8]. O predomínio de linfócitos pode ser visto como resultado em transudatos decorrentes de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), cirrose, síndrome nefrótica, efusão quilosa, peritonite tuberculosa e desordens malignas[5]. Os neutrófilos estão presentes em peritonites bacterianas onde podem apresentar degeneração que vão desde a formação de vacúolos a destruição dos grânulos[5]. A presença de eosinófilos podem ser observada nos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, diálise peritoneal crônica, vasculites, linfoma abdominal e ruptura hidático roto[3,5,6,8]. A coloração das células é feita através dos seguintes corantes: Leishmann em 30,8% dos laboratórios; May-Grünnwald Giemsa em 38,4%; são utilizados dois dos métodos citados em 30,8% dos laboratórios. A coloração recomendada pela literatura é pelo método de Wright[9] (Figura 5).

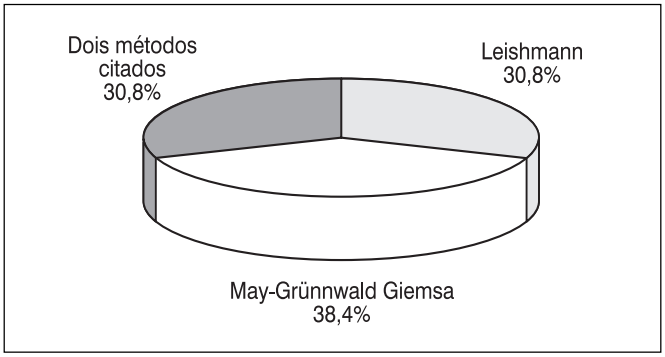


FIG. 5 - Método utilizado para a coloração celular do líquido ascítico no estado de Santa Catarina.

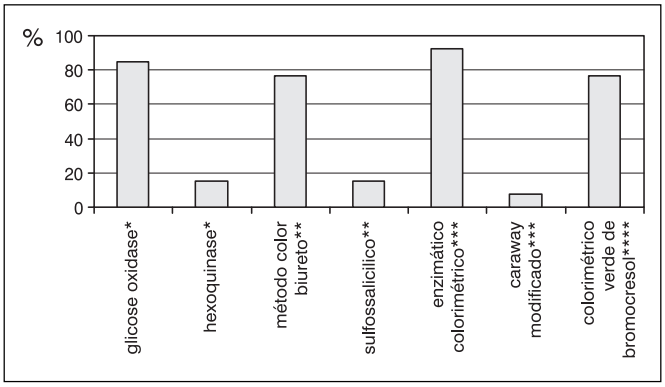


FIG. 6 - Figura 6 - Métodos utilizados para dosagens bioquímicas no líquido ascítico no estado de Santa Catarina.

***dosagem de glicose; **dosagem de proteína; ***dosagem de amilase; ****dosagem de albumina.**

Nas avaliações bioquímicas do líquido ascítico (Figura 6), os laboratórios foram questionados nas suas análises de glicose, proteínas, amilase, albumina, quanto a forma como são realizadas estas provas. Sendo que há diferenciação entre transudato e exsudato pode ser um passo importante para o diagnóstico e evolução das análises laboratoriais, já que em geral não são necessárias outras análises para o transudato[9]. Quanto à glicose, foi observado que nos laboratórios pesquisados este teste é realizado através do método da glicose oxidase em 84,6% deles, o método da hexoquinase é utilizado por 15,4% dos laboratórios. Os níveis de glicose estão diminuídos em casos de peritonite bacteriana e tuberculosa, e em pacientes com carcinomatose abdominal[3,5,9], além dos casos de pacientes com hipoglicemia[1]. Os níveis de glicose encontram-se elevados nos casos de pacientes com diabete primária sintomática e hiperglicemia[1]. Em geral, com outros fluídos corpóreos, os resultados encontrados com a dosagem de glicose são mais esclarecedores na diferenciação entre infecções e ascites malignas, do que no líquido ascítico[5]. Quanto à dosagem de proteínas, 76,9% utilizam o método do color-biureto, 15,4% utilizam a método do sulfossalicilico, e 7,7% não responderam. Os líquidos com concentrações de proteína superior a 3g/dl são considerados exsudatos e os que contém valores inferiores a esse são os transudatos[5,11], sendo que a correlação entre os níveis séricos e ascíticos de proteínas e desidrogenase lática (LDH) são um parâmetro importante para a diferenciação entre exsudato e transudato[5,11]. Em tuberculose e alguns casos de peritonite bacteriana, ascite pancreática, insuficiência renal crônica e neoplasma intra-abdominal, são frequentemente associados com concentrações de proteínas superiores a 3 g/dl, enquanto que a peritonite bacteriana espontânea está associada à concentrações inferiores a 3 g/dl[5]. Já quanto a dosagem de amilase, 92,3% utilizam o método enzimático colorimétrico, 7,7% utilizam o método de Caraway modificado. A amilase é produzida em grandes quantidades pelo pâncreas, glândulas salivares e determinados tumores malignos[1]. A sua quantidade no líquido ascítico e semelhante ao sérico[3]. Um valor três vezes superior ao sérico no líquido são indicações para o diagnóstico de pancreatite[4,5,6,8], ela também pode estar elevada em casos de perfurações gastrointestinais[3,9]. Quanto à dosagem de albumina, 76,9% a realizam através do método colorimétrico verde-de-bromocresol, 23,1% não responderam[3]. O gradiente de albumina soro/ascite definido como a concentração de albumina do líquido ascítico é considerado o exame mais fisiologicamente adequado, sendo que a diferença entre a albumina sérica e ascítica é superior a 1,1g/dl[11]. Todavia como todo critério utilizado para separar transudato de exsudato é falho, nos casos em que a associação de causas do derrame[3]. O gradiente de albumina reflete o

gradiente de pressão oncótica entre o leito vascular e o líquido ascítico, em geral, as doenças associadas a um gradiente amplo são transudativas e aquelas associadas a um gradiente baixo são exsudativas[11]. A hipoalbuminemia de qualquer causa está associada a ascite classicamente transudativa, sendo que está só ocorre quando a albumina sérica está muito baixa, geralmente menos de 2mg/dl[11].

Quanto às avaliações microbiológicas (Figura 7) o que se encontrou foi que a bacteroscopia é realizada através da coloração pelo método de Gram por 30,8% dos laboratórios, através da coloração pelos métodos de Gram/Ziel-Nielsen por 69,2%, a cultura é realizada em 92,3% dos estabelecimentos e 7,7% não responderam. A bacteroscopia através do Gram é positiva em 25% dos casos e a cultura em 50%, as colorações álcool-ácido resistentes para a tuberculose também não possuem uma sensibilidade muito alta ficando em torno de 20 a 30% e suas culturas variam entre 50 e 70%. A inoculação em meio de cultura sanguínea a beira do leito e a concentração de grandes volumes de líquidos podem melhorar a sensibilidade[3]. Mesmo com esses cuidados cerca de 35% dos pacientes ainda terão culturas negativas[3]. O achado de bacilos álcool- ácido resistentes é raro no líquido ascítico, sendo esta comprovação feita por meio de cultura[7]. Infecções na cavidade peritoneal podem ocorrer espontaneamente em pacientes com ascite crônica (cirrose) e também pode ser resultante da ruptura ou do derrame de um órgão oco ou depois de uma cirurgia, infecções são freqüentes evidências da localização de um abcesso ou uma peritonite generalizada[5,6,8].

São realizados também com testes complementares nos laboratórios que responderam a pesquisa, entre eles estão: dosagem de ácido úrico em 7,7%, e a determinação do fator reumatóide em 7,7%. A desidrogenase lática (LDH) é medida em 7,7% dos casos. A LDH está aumentada em pacientes com efusões malignas, sendo que quando as proporções entre a LDH no líquido ascítico/sérico for superior a 0,6 possui uma sensibilidade de 80%[3]. A LDH é uma enzima intracelular por isso seus níveis elevados são indicativo de dano tissular[4]. A associação da determinação do LDH e colesterol é proposta para a obtenção da diferenciação entre o carcinoma peritoneal e a ascite relacionada à cirrose e ao hepatocarcinoma[3]. A desidrogenase lática também tem sido utilizada para o diagnóstico precoce da peritonite bacteriana espontânea[3]. A pesquisa de proteína C reativa (PCR) é realizada em 7,7% dos laboratórios. A PCR embora possua uma concentração baixa, possui uma importância significativa como um reagente altamente sensível da fase aguda[3]. A PCR é o reagente que aumenta mais rapidamente e um dos que retornam mais rapidamente a normalidade após uma terapia bem sucedida[3]. A PCR é um valioso método de se monitorar a eficácia da terapia antimicrobiana durante episódios de peritonites agudas ou pacientes com que sofrem de diálise peritoneal[5]. A determinação da mucoproteínas foi realizada em 7,7%, o antigeno Austrália (HBV) em 7,7%, bem como o HCV em 7,7%.

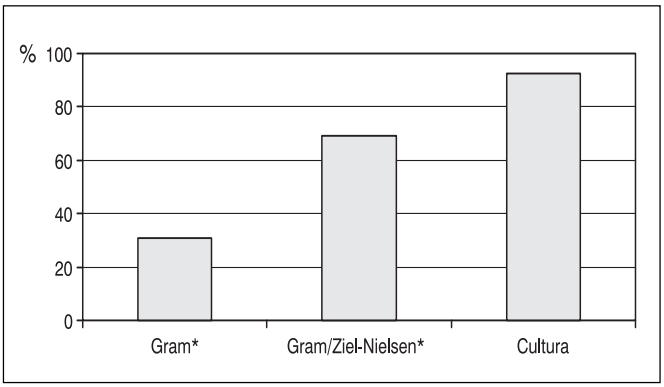


FIG. 7 - Metodologia para pesquisas microbiológicas do líquido ascítico no estado de Santa Catarina.

***Colorações para realização da bacteroscopia.**

Observamos que as técnicas recomendadas pela literatura estão sendo realizadas em proporções variadas, pelos laboratórios prestadores desse serviço no estado de Santa Catarina, na rotina de líquido ascítico. As rotinas que dependem de aparelhagem, como por exemplo a citocentrifuga ainda não foram incluída em um número significativo de laboratórios.

Finalmente podemos considerar que a rotina de líquido ascítico não possui um protocolo uniforme entre os laboratórios que participaram da pesquisa, a causa mais provável dessa variação possivelmente seja a adaptação da rotina de acordo com as condições de serviço e o tipo de paciente atendido. Este padrão de adaptação das metodologias disponíveis, foram observadas também nos exames de líquor e espermograma, mostrando ser uma característica peculiar da análise dos fluidos[2,9].

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

REFERÊNCIAS

1. **Chernecky, Cynthia C. *et al.*** *Métodos de laboratório, procedimentos diagnósticos.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995.
2. **HaasS, P.; Thiesen, K.; Vituri, C. L.** Exame do sêmen nos laboratórios do estado de Santa Catarina. *Newslab*, São Paulo, p.143-151.
3. **Henry, John B.** *Diagnóstico Clinico e conduta terapêutica dos exames laboratoriais.* São Paulo: Editora Manole, p.21, 249, 476-9, 1319. 1989.
4. **http://www.lamina.com.br./p_manual-3.htm** *Laboratório de Análises Médicas e investigações anatomopatológicas.* Página capturada em 6/3/2000.
5. **Kjeldsberg, C. R.; Knight, J. A.** Body Fluids. Laboratory examination of Cerebrospinal, seminal, serous & synovial fluids. 3rd ed. Chicago: *American Society of Clinical Pathologists*, p.65-127. 1993.
6. **McBride, Landy J.** *Textbook of Urinalysis and body fluids.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
7. **Miller, Otto *et al.*** *Laboratório para o clínico.* 8ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1997. p.319-22.
8. **Ringscud, Karen M.; Linné, Jean J.** *Urynalysis and body fluids a color text and atlas.* Missouri: Editora Mosby, p.191-201. 1995.
9. **Strasinger, Susan K.** *Uroanálise e fluidos biológicos.* 2ª ed. São Paulo: Editora Médica Panamericana, p.139-44. 1991.
10. **Vituri, C. L.; Haas, P.** Exame do líquor nos laboratórios do estado de Santa Catarina. *Revista Laes & Haes*, São Paulo, p.112-122.
11. **Wyngaarden, J. B.; Smith Jr., L. H.** *Cecil Tratado de Medicina Interna.* 19ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2. p.752-5, 811-3. 1993.

Endereço para correspondência:
Profª Patrícia Haas
Centro de Ciências da Saúde da UFSC - Departamento de Análises Clínicas
Campus Universitário - Cx. Postal nº 476 - Florianópolis - SC

Incidência de parasitoses intestinais em escolares do município de Novo Hamburgo-RS

Incidence of intestinal parasitosis in students from public school in Novo Hamburgo-RS

Alexandre A. Becker[1]; Rafael Ioschpe[2]; Daniela Delwing[2]; Débora Delwing[2] & Juliana Canali[2]

RESUMO – O presente trabalho objetivou verificar a incidência de parasitas intestinais em escolares do CIEP de Novo Hamburgo-RS no período de outubro a dezembro de 1999. Foram analisadas amostras de crianças da 1ª à 5ª séries na faixa dos 6 aos 13 anos, num total de 130 amostras. O material foi coletado em frascos contendo formol a 10% e os exames foram processados conforme a técnica de HPJ apresentando: 70 positivos (53,85%), e 60 negativos (46,15%). Encontrou-se 65,71% (46) de monoparasitados, 24,15% (19) de biparasitados e 7,14% (5) de poliparasitados. Entre os helmintos destacaram-se 25,70% de *Ascaris lumbricoides* e, entre os protozoários 22,90% de *Giardia lamblia*.

PALAVRAS-CHAVE – Parasitoses intestinais, HPJ, escolares, exame parasitológico de fezes.

SUMMARY *– The mentioned study had a target find out the incidence of intestinal parasitosis in students from public school in Novo Hamburgo from october to december, 1999. The study was carried out in samples of the children from the 1st to 5th grade year under 6 to 13 years old in 130 students. Parasitologic tests were carried out by HPJ technique and shows 70 (53.85%), positives samples and 60 (46.15%), negative samples. The study show monoparasitism in 46 (65.71%), biparasitism 19 (27.15%) and polyparasitism 5 (7.14%). From the helminths,* Ascaris lumbricoides *was the predominant with 25.70% and from the protozoa,* Giardia lamblia *with 22,90%.*

KEYWORDS *– Intestinal parasitosis, HPJ, school examination, parasitism prevalence.*

INTRODUÇÃO

No contexto dos grandes problemas de saúde pública as parasitoses intestinais figuram com um dos maiores índices de prevalência na grande massa populacional[3]. Fatores como péssimas condições de moradia, má alimentação, falta de água tratada e esgoto e principalmente educação e conscientização da necessidade, desde o primeiro ano escolar e por todos os outros do ensino primário, de criar no âmbito familiar a cultura de hábitos de higiene e limpeza que devem ser sistematicamente continuados na escola. Entre tantos prejuízos trazidos pelas parasitoses intestinais, principalmente as de curso crônico e assintomáticas, temos: déficit de desenvolvimento físico e mental, incapacitação para o trabalho na população estudantil. O grande prejuízo se traduz no baixo índice de aproveitamento escolar.

Após o término do estudo realizamos palestra educativa e apresentação áudio visual com pais, professores, alunos e funcionários da escola no intuito de mostrar os danos das doenças parasitarias, noções de higiene, saneamento, prevenção e reconhecimento de sinais e sintomas indicativos de parasitoses. Além disso a escola proporcionou, através de seu médico e o posto de saúde, o tratamento de todas as crianças parasitadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados 130 exames parasitológicos de fezes (EPF) de alunos da 1ª a 5ª séries, na faixa etária de 6 a 13 anos, da Escola Estadual de 1º Grau Seno Frederico Ludwig (CIEP) do município de Novo Hamburgo - RS no período de outubro a dezembro de 1999.

Foram entregues às crianças frascos para a coleta, previamente identificadas, contendo solução conservante de formol a 10%, juntamente com folheto explicativo aos pais de como realizar a coleta. As amostras foram processadas através do método HPJ[4] e em cada destas foi realizada a leitura de duas lâminas por dois profissionais diferentes.

Foram também realizados exames dos profissionais da cozinha, bem como de alguns professores que para nossa tranqüilidade encontraram-se negativos.

Recebido em 7/3/2002
Aprovado em 15/3/2002
*Trabalho realizado pelo Exame Laboratório – Novo Hamburgo/RS
[1]Gerente Técnico do Exame Laboratório; [2]Alunos concluentes do Curso de Análises Clínicas – ULBRA – Canoas/RS

RESULTADOS

A Tabela I e a Figura 1 mostram a distribuição em relação ao sexo que dos escolares examinados tivemos 56,15% (73) do sexo masculino e 43,85% (57) do sexo feminino.

A prevalência de positividade da amostra trabalhada está apresentada na Tabela II e Figura 2 que indicam 53,85% (70) de amostras positivas e 46,15% (60) de amostras negativas.

Em relação ao total de parasitos encontrados relacionados na Tabela III e Figura 3, obtivemos: *Ascaris lumbricoides* 25,70% (18), *Giardia lamblia* 22,90% (16), *Entamoeba histolytica* 17,10% (12), *Entamoeba coli* 15,70% (11), *Trichuris trichiura* 8,60% (6), *Hymenolepis nana* 5,70% (4), *Strongyloides stercoralis* 2,90% (2) e *Ancylostomatidae* 1,40% (1).

Em relação ao grau de parasitismo ressaltamos os dados conforme Tabela IV e Figura 4: monoparasitados 65,71% (46) biparasitados 27,15% (19), poliparasitados 7,14% (5).

Na associação de parasitas encontradas em amostras biparasitadas encontramos de acordo com a Tabela V e Figura 5: 8,56% (6) de *Ascaris lumbricoides* com *Trichuris trichiura*; 4,29% (3), de *Entamoeba coli* com *Entamoeba histolytica*; 2,86% (2) de *Ascaris lumbricoides* com *Entamoeba coli*; 2,86% (2), de *Ascaris lumbricoides* com *Giardia lamblia*; 2,86% (2), de *Giardia lamblia* com *Entamoeba coli*; 1,43% (1), *Entamoeba histolystica* com *Ancylostomatidae*; 1,43% (1), de T*richuris trichiura* com *Giardia lamblia*; 1,43% (1) *Ascaris lumbricoides* com *Entamoeba coli* e 1,43% (1) de *Hymenolepis nana* com *Ascaris lumbricoides*.

TABELA I e FIGURA 1
Total de pesquisados por sexo

Sexo	%	Freqüência
Masculino	56,15	73
Feminino	43,85	57
Total	100	130

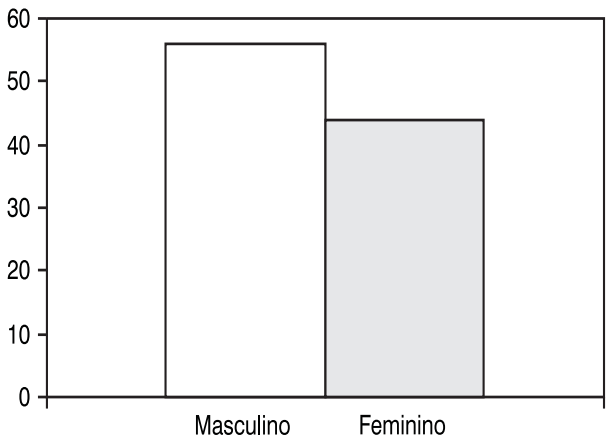


TABELA II e FIGURA 2
Positividade das amostras

Resultados	%	Freqüência
Positividade	53,85	70
Negatividade	46,15	60
Total	100	130

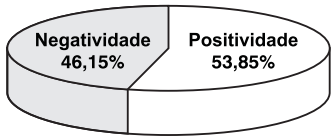


TABELA III e FIGURA 3
Total de parasitos encontrados na população

Parasitos	%	Freqüência
Ascaris lumbricoides	25,7	18
Giardia lamblia	22,9	16
Entamoeba histolytica	17,1	12
Entamoeba coli	15,7	11
Trichuris trichiura	8,6	6
Hymenolepis nana	5,7	4
Strongyloides stercoralis	2,9	2
Ancylostomatidae	1,4	1
Total	100	70

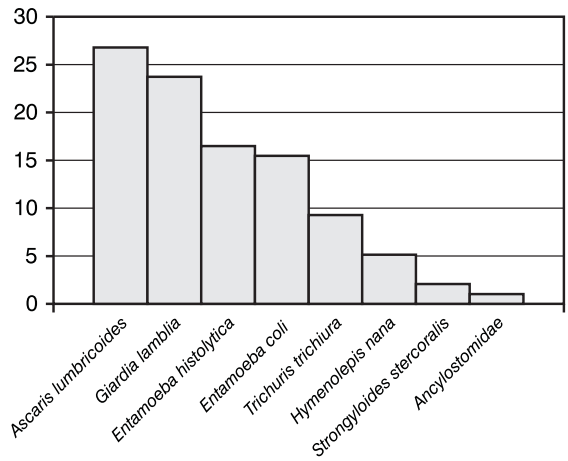


TABELA IV e FIGURA 4
Grau de parasitismo encontrado na população

Resultados	%	Freqüência
Monoparasitados	65,71	46
Biparasitados	27,15	19
Poliparasitados	7,14	5

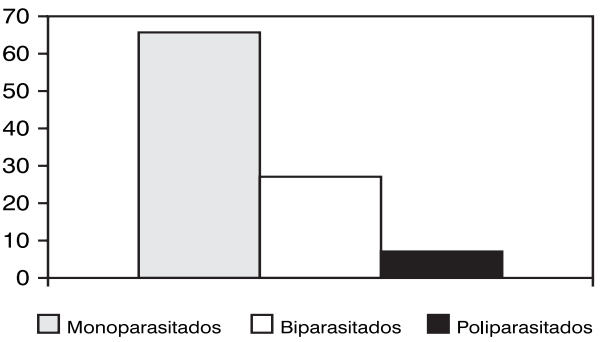
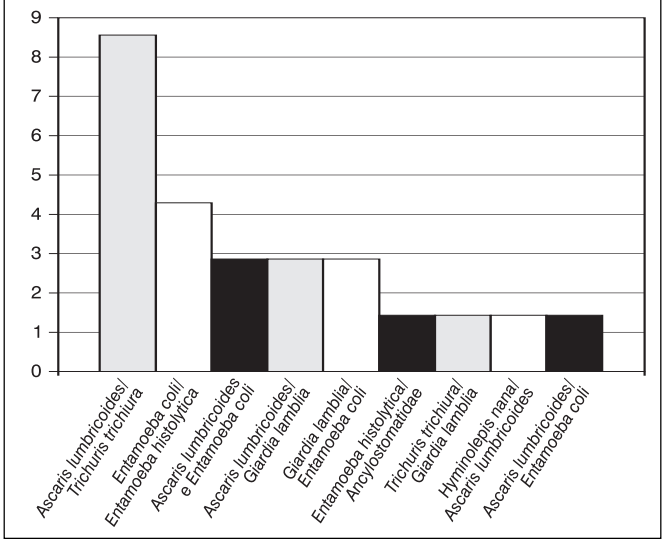


TABELA V e FIGURA 5
Associação de parasitas encontrados em amostras biparasitadas

Associações	% Biparasitados	Freqüência	% entre Biparasitados
Ascaris lumbricoides/ Trichuris trichiura	8,56	6	31,58
Entamoeba coli/ Entamoeba histolytica	4,29	3	15,78
Ascaris lumbricoides/ Entamoeba coli	2,86	2	10,52
Ascaris lumbricoides/ Giardia lamblia	2,86	2	10,52
Giardia lamblia/ Entamoeba coli	2,86	2	10,52
Entamoeba histolytica/ Ancylostomatidae	1,43	1	5,27
Trichuris trichiura/ Giardia lamblia	1,43	1	5,27
Hyminolepis nana/ Ascaris lumbricoides	1,43	1	5,27
Ascaris lumbricoides/ Entamoeba coli	1,43	1	5,27
Total	27,15	19	100



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Como notado no presente estudo o predomínio de *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia* traduz a falta de rede de esgoto na região bem como a presença de um córrego a céu aberto (valão), contribuindo sobremaneira para a disseminação de muitas doenças, em especial, as enteroparasitoses. A falta de ovos de *Enterobius vermicularis* se deve as características do método HPJ que não se mostra o mais indicado e por peculiaridades biológicas do ciclo do parasita.

Os índices apresentados neste estudo, revelam um perfil nada diferente de outros centros urbanos do país[2] e que bem retrata as condições precárias de saneamento básico como falta de água tratada e rede de esgoto, os baixos níveis de educação, conscientização e discernimento por parte dos moradores de locais com estas características, indicando claramente o seu baixo nível sócio econômico. Com este panorama ressaltamos que medidas preventivas de cunho teórico como palestras educativas nas escolas e centros comunitários, bem como, de cunho prático como obras de saneamento básico, destacando o tratamento de esgoto aliado a um tratamento, não só do escolar afetado mas, também, de seus familiares, são medidas efetivas para minimizar as grandes contaminações enteroparasitárias e seus efeitos nocivos.

AGRADECIMENTOS

Nós, do Exame Laboratório, agradecemos a cooperação e incentivo por parte da direção deste laboratório. E, também, à direção e secretaria da escola analisada, bem como todos os colaboradores do laboratório que de forma direta ou indireta proporcionaram-nos as condições ideais para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1 **Neves, D. P.** *Parasitologia humana*, 8ª ed. São Paulo, Atheneu, 1991.
2 **De Carli, G. A. *et al.*** Incidência de enteroparasitoses entre colonos sem terra nos assentamentos de Charqueadas e Capela de Santana no Estado do Rio Grande do Sul. R*ev. Bras. Anál. Clín.* 26(4):123-125, 1994.
3 **World Health Organization.** Intestinal protozoa and helmintic infections Geneva, Who, 1981 (*Technical Report Series*, nº 666).
4 **De Carli G. A.** *Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas-Métodos e Técnicas.* Rio de Janeiro, Ed. Médica Científica Ltda. 1994.
5 **Koneman, E. W *et al.*** *Diagnóstico microbiológico.* 2ª Ed. São Paulo: Panamericana, p. 660. 1993.
6 **Schmitt M. L.; Paes, M. A. S.** Prevalência de Parasitoses Intestinais em Escolares no Município de São Joaquim, SC. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 29(4):215-216, 1997.
7 **Henry, I. B.** *Diagnósticos clínicos e tratamento.* 18ª edição, Ed. Manole Ltda, São Paulo, 1995.

Endereço para correspondência:
Dr. Alexandre A. Becker
Laboratório Exame de Análises Clínicas Ltda.
Rua Joaquim Nabuco, 1040 - Centro - Novo Hamburgo-RS - CEP 93.310-002
Fone/Fax (0xx51)595-1818

Você está gostando da RBAC?

Queremos saber a sua opinião sobre a nossa revista.

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

geral@sbac.org.br

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

Padronização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em amostras endocervicais de pacientes portadoras de lesões pré-cancerosas ou cancerosas atendidas no LEPAC/UEM de Maringá-PR

Technique standardization of Polymerase Chain Reaction (PCR) to the diagnosis for infection by Human Papillomavirus (HPV) in endocervical samples from patients with cancerous or pre-cancerous lesions assisted in LEPAC/UEM Maringá-PR

Daniela Haponiuk Gomes[1]; Carlos Cristiano de Godoi Bidoia[1]; Mary Mayumi Taguti Irie[2]; Linda Emiko Suzuki[3]; Marcia Edilaine Lopes Consolaro[3] & Edilson Nobuyoshi Kaneshima[4]

RESUMO – Atualmente está bem clara a associação entre as infecções por HPV e a carcinogênese cervical. Por este motivo é de grande importância a detecção precoce deste tipo de infecção para que seja efetuado um tratamento específico, possibilitando assim, a cura e impedindo a disseminação da partícula viral do HPV. A técnica de PCR é considerada como uma metodologia de escolha para os casos que necessitem de uma confirmação diagnóstica mais detalhada. Este trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de PCR para a detecção do DNA de HPV em amostras endocervicais de pacientes atendidas no LEPAC/UEM. Inicialmente, a padronização foi realizada utilizando a amostra l (padrão), onde se determinou em 1,5 e 12,5 pmoles as quantidades ideais dos iniciadores GH20/PC04 e MY09/11 respectivamente, e a concentração do íon magnésio em 2,5 mM. A padronização obtida foi aplicada nas amostras 2, 3, 4, 5, 6 e 7; entretanto, as amostras 3 e 4 encontravam-se hemorrágicas e portanto não tiveram o DNA de HPV amplificado. Com a padronização da técnica de PCR é possível melhorar a sensibilidade e a exatidão do diagnóstico da infecção por HPV; no entanto, para amplificar o DNA proveniente das amostras clínicas hemorrágicas, este deve ser submetido à purificação através do método fenol-clorofórmio.

PALAVRAS-CHAVE – HPV; PCR; lesões pré-cancerosas cervicais; câncer cervical.

SUMMARY *– Nowadays it's very clear the association between the infections by HPV and the cervical carcinogenesis. For this reason it's very important the precocious detection of this infection type to effectuate an specific treatment, making possible the cure and avoid the dissemination in HPV viral particle. The PCR technique is the chosen methodology to cases that need a more detailed diagnostic confirmation. This work aimed to standardize the PCR technique to detect the DNA from HPV in endocervical samples from patients assisted in LEPAC/UEM. Initially the standardization was realized using the sample 1 (pattern) whose concentrations were determined being 1,5 and 12,5 pmoles as ideal amount of the primers GH20/PC04 and MY09/11 respectively, while the magnesium ion concentration was 2,5 mM, when the obtained standardization was applied in the samples 2, 3, 4, 5, 6 and 7, meanwhile the samples 3 and 4 were hemorrhagics and didn't have the HPV DNA amplified. Through the PCR technique standardization it is possible to improve the sensibility and the diagnostic accuracy of the infection for HPV. To get the DNA's amplity from hemorrhagics clinical samples, it must be submitted to the purification through the phenol-chloroform method.*

KEYWORDS *– HPV; PCR; pre-cancerous cervical lesions; cervical cancer.*

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é uma enfermidade relacionada com o comportamento sexual e o ambiente sócio-econômico de uma determinada população. Este tipo de câncer é o mais incidente nas mulheres dos países subdesenvolvidos, enquanto que nos países desenvolvidos encontra-se entre o quinto e o oitavo lugar. A baixa incidência nos países desenvolvidos é decorrente de várias companhas preventivas e efetivas realizadas nas últimas décadas. Entretanto a não existência ou a pouca efetividade destas campanhas nos países sub-

Recebido em 10/12/2001
Aprovado em 17/1/2002
[1]Acadêmicos do curso de Farmácia/UEM e bolsistas PIBIC/CNPq/UEM; [2]Farmacêutica Bioquímica do LEPAC/UEM/Maringá-PR;
[3]Docentes de Citologia Clínica da Univ. Est. de Maringá-PR; [4]Docente de Patologia Geral da Univ. Est. de Maringá-PR. e orientador dos bolsistas PIBIC/CNPQ/UEM

desenvolvidos são os principais fatores responsáveis pela não diminuição da incidência e pelo aumento no número de pacientes acometidas por esta patologia[5,15,33]. Nos países desenvolvidos, 80% dos casos de câncer cervical são detectados nos estágios iniciais onde o tratamento é fácil e de baixo custo. Entretanto nos países subdesenvolvidos, 80% dos casos de câncer cervical são incuráveis devido a detecção tardia dos mesmos[33].

Globalmente, estima-se que 450.000 novos casos de câncer cervical por ano sejam notificados acarretando em 300.000 mortes. Caso os estágios iniciais deste processo canceroso não sejam diagnosticados de forma precoce, dentro de pouco tempo haverá 900.000 novos casos anuais deste tipo de câncer no mundo. Isto corresponde a aproximadamente o número de novos casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em homens e mulheres a cada ano, porém este grande número de mulheres com câncer cervical normalmente é ignorado[33].

No Brasil, a estimativa para 1998 foi de 21.725 novos casos de câncer cervical[6]. Este tipo de câncer por apresentar um índice elevado de morbidade e mortalidade é considerado como o principal responsável pela elevação nos gastos com a saúde da mulher. Diante deste fato, torna-se necessário determinar os possíveis agentes responsáveis pela carcinogênese cervical de forma que o processo canceroso seja detectado de forma precoce contribuindo assim para uma diminuição na morbidade e mortalidade[18].

Nas últimas décadas, diversos estudos foram realizados e associam a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) com a carcinogênese cervical. A infecção por HPV é considerada como a Doença Sexualmente Transmissível (DST) de origem viral mais incidente na população apresentando um caráter emergente, o que representa um grave problema em termos de saúde pública[5,15,18]. Rotineiramente, os métodos mais utilizados para o diagnóstico do câncer cervical e da infecção por HPV são a colpocitologia, a colposcopia e a histopatologia[13,15]. Entretanto nos últimos anos, alguns métodos de detecção do DNA de HPV como a hibridização molecular, a captura híbrida e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) estão sendo desenvolvidos e implantados em vários laboratórios de pesquisa[1,2,7,8,11,14,15,17,19,24,25,27,28,32].

A técnica de PCR tem se mostrado extremamente sensível na detecção do DNA de HPV em pacientes portadoras de lesões cancerosas ou pré-cancerosas e também em pacientes portadoras de infecções assintomáticas ou subclínicas. Além da grande sensibilidade, esta técnica também é capaz de determinar o tipo e consequentemente o potencial carcinogênico do vírus. A técnica de PCR também pode ser um método de escolha para a confirmação de resultados conflitantes entre a colpocitologia, a colposcopia e a histopatologia[1,2,7,9,10,14,16,17,21,24,25,28,31,32,34].

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo principal padronizar a técnica de PCR para a detecção do DNA de HPV em amostras cervicais de pacientes portadoras de lesões cancerosas e pré-cancerosas atendidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (LEPAC-UEM). Esta padronização da técnica de PCR tem como finalidade melhorar a sensibilidade e a exatidão do diagnóstico da infecção por HPV. Desta forma será possível realizar a detecção precoce de lesões pré-cancerosas ou cancerosas ainda na fase inicial e assim auxiliar num possível controle dessa infecção, além de diminuir a morbidade e a mortalidade causada pelo câncer cervical.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras clínicas

Neste estudo foram utilizadas 07 amostras clínicas cervicais coletadas com auxílio de escovas endocervicais do tipo *cytobrush*, de pacientes atendidas no LEPAC/UEM. A amostra 01 foi considerada amostra padrão por ter sido coletada de uma paciente portadora de anormalidade colpocitológica do tipo lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) cujo diagnóstico para a infecção por HPV foi confirmado através da detecção do DNA viral por reação de hibridização. As demais amostras eram provenientes de pacientes portadoras de anormalidades colpocitológicas do tipo lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL) sugestiva ou não para a infecção por HPV; lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo tipo epidermóide, conforme Tabela I. As células endocervicais coletadas foram acondicionadas em frascos contendo 1,5 mL de solução tampão T.E. (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) e estocadas a - 20°C até a extração do DNA.

Extração de DNA

Nesta etapa foi utilizado o método de digestão enzimática com proteinase K conforme o descrito por Mahony *et al.*[22]. O material clínico cervical coletado anteriormente foi centrifugado a 10000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 500 μL de T.E. gelado. Para a extração do DNA das células endocervicais foram adicionados 5 μL de proteinase K (10mg/mL) e 10 μL de *tween* 80 (10% v/v) e incubado durante 3 horas a 37°C. Em seguida a proteinase K foi inativada no banho-maria a 100°C por 10 minutos e a solução obtida que contém o DNA extraído foi estocada a -20°C até ser utilizada na reação de amplificação.

TABELA I
Amostras clínicas selecionadas para extração do DNA e seu respectivo resultado colpocitológico

Amostras	Resultado colpocitológico
1 (amostra padrão)	HSIL
2	LSIL
3	LSIL
4	Câncer invasivo
5	LSIL
6	HSIL
7	LSIL

Padronização das condições de amplificação de parte dos genes HPVL1 e ß Globina Humana presentes na amostra 1 (amostra padrão)

Neste trabalho foram utilizados os iniciadores consenso MY09: 5′ CGTCCMAARGGAWACTGATC 3′ e MY11: 5′ GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3′ descritos por Manos *et al*.[24]e os iniciadores GH20: 5′ GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3′ e PC04: 5′ CAACTTCATCCACGTTCACC 3′ descritos por Saiki *et al.*[29]. Este par de iniciadores foi utilizado principalmente como um controle interno da reação. Os iniciadores MY 09/11 amplificam especificamente uma parte do gene HPVL1 que é a região mais conservada no genoma dos diferentes tipos de HPV, sendo responsável por codificar uma proteína do capsídeo viral. Estes iniciadores são capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb) do gene L1 tornando possível a detecção da maioria dos tipos de HPV[15,20]. Os iniciadores GH20 / PC04 amplificam um fragmento de aproximadamente 268 pb que corresponde a uma parte do gene b globina humana, motivo pelo qual foram utilizados como controle interno da reação de amplificação no diagnóstico de agentes infecciosos presentes em materiais clínicos humanos[3]. Nesta etapa de padronização, a reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μL sendo constituída por 50mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH 8,3); 200μM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 1 U de Taq DNA polimerase e 5μL da solução contendo o DNA da amostra 1, a concentração de $MgCl_2$ variou de 1 a 4 mM enquanto que a quantidade dos iniciadores MY09/11 e GH20/PC04 variou de 2 a 30 pmoles e de 1 a 10 pmoles respectivamente.

Utilização da técnica de PCR para amplificação do DNA de HPV presente em amostras clínicas cervicais

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25μL sendo constituída por 50mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH 8,3); 2,5mM de $MgCl_2$; 200μM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 1 U de Taq DNA polimerase e 12,5 pmoles de cada iniciador MY09/11 ou 1,5 pmoles de cada iniciador GH20/PC04. Em cada reação de amplificação foram utilizados 5μL da solução contendo o DNA extraído anteriormente. Em cada bateria de amplificação pela PCR, sempre foi utilizado um controle negativo constituído pelas mesmas concentrações e pelos mesmos reagentes da reação de amplificação, exceto o DNA. Os sistemas de amplificação contendo os iniciadores MY09/11 e PC04/GH20 foram realizados separadamente em tubos de 500μL que foram transferidos para o termociclador (MJ Research PTC 150). O programa de PCR utilizado consistiu das seguintes etapas: 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de amplificação (95°C por 1 min.; 55°C por 1 min.; 72°C por 1 min.) e 72°C por 5 minutos conforme descrito por Bauer & Manos[3].

Visualização do produto final amplificado e documentação do resultado obtido

Ao produto final amplificado foram adicionados 4μL de loading buffer (0,25% de azul de bromofenol; 15% de Ficoll tipo 400). O volume total obtido foi aplicado no gel de agarose a 1,4% (m/v) que foi submetido a corrida eletroforética em cuba horizontal a 110 V durante 45 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através de um transiluminador com luz Ultra Violeta no comprimento de onda de 302 nm que foram posteriormente fotografados através do sistema Polaroid utilizando-se o filme polaroid tipo 667 para uma posterior análise do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos[30].

RESULTADOS

A etapa de padronização das condições de amplificação de parte dos genes da ß globina humana e da região L1 do HPV através da técnica de PCR foi baseada no descrito por Bauer & Manos[3]. Nesta etapa foram realizadas alterações nas concentrações de alguns reagentes e também no volume final que passou a ser de 25μL, conforme descrito em materiais e métodos. As alterações executadas foram necessárias para a obtenção das melhores condições para a amplificação dos fragmentos de DNA provenientes dos genes ß globina humana e L1 de HPV.

Durante a fase inicial da padronização foi utilizado somente o DNA da amostra 1 (amostra padrão positiva) para as reações de amplificação, onde a concentração ideal dos iniciadores GH20/PC04 e MY09/11 foi determinada em 1,5 pmoles e 12,5 pmoles respectivamente, enquanto que a concentração ideal de $MgCl_2$ foi padronizada em 2,5mM.

Após a padronização da concentração dos reagentes da reação de amplificação, uma nova condição foi estabelecida, onde o DNA das amostras 2, 3, 4, 5, 6 e 7

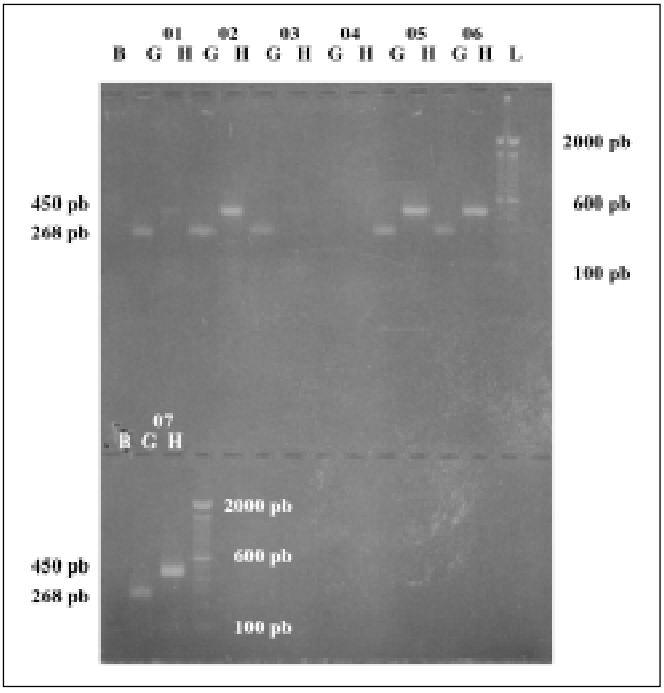


FIG. 1 - Perfil eletroforético do DNA humano (G) e de HPV (M) amplificados com os inicadores GH20/PC04 e MY09/11 provenientes das amostras 01; 02; 03; 04; 05; 06 e 07 conforme mostrado acima. B- branco; L- 100 bp DNA ladder (Life Technologies GIBCO/BRL).

foi submetido às reações de amplificação para avaliar se a padronização da concentração dos reagentes obtida com a amostra padrão também poderia ser aplicada em outras amostras clínicas portadoras de anormalidades citológicas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1 onde está o perfil eletroforético dos fragmentos de DNA provenientes das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Através da análise dessa figura é possível verificar que a grande maioria das amostras tiveram o DNA da ß globina humana amplificado (fragmento de 268 pb), exceto a amostra 4. O mesmo ocorreu durante a amplificação do DNA de HPV (fragmento de 450 pb), entretanto as amostras 3 e 4 apesar de serem provenientes de pacientes portadoras de LSIL e HSIL não apresentaram a amplificação do DNA de HPV.

DISCUSSÃO

O DNA extraído da amostra 1 (amostra padrão positiva) serviu como DNA molde na padronização da reação de amplificação descrita por Bauer & Manos[3]. Vale salientar que esta amostra é proveniente de uma paciente portadora de lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL), onde, segundo Gross & Barrasso[15] para este caso, a PCR tem uma positividade de 69 a 100%.

O DNA molde foi amplificado utilizando-se 1,5 e 12,5 pmoles dos iniciadores GH20/PC04 e MY09/11 respectivamente. Estas quantidades foram consideradas ideais pelo fato de que quando utiliza-se quantidades mais baixas de iniciadores pode não ocorrer a amplificação do DNA molde, principalmente se este estiver em pequena quantidade. Esta informação já foi confirmada por Bidoia *et al.*[4] e Gomes *et al.*[12]. Estes autores diluíram o DNA molde na proporção de 1:5 e verificaram que este DNA diluído não era amplificado quando utilizava-se quantidade inferior a 1,5 e 12,5 pmoles dos iniciadores GH20/PC04 e MY09/11 respectivamente.

Com relação à concentração do íon magnésio descrita por Bauer & Manos [3], esta necessitou ser diminuída de 4 para 2,5mM, pois altas concentrações deste íon diminui a especificidade das reações de amplificação acarretando na amplificação de fragmentos inespecíficos, do tipo primer-dimer[26]. Verificou-se também que a utilização do íon magnésio em concentrações inferiores a 2,5mM promovia perdas na eficiência da enzima Taq DNA polimerase onde em muitos casos não ocorria a amplificação do fragmento de DNA principalmente pelo fato do íon magnésio ser o cofator desta enzima[26].

Através da análise da Figura 1, verifica-se a amplificação de fragmentos de DNA de 268 pb e de 450 pb em quase todas amostras, entretanto a amostra 3 apresentou somente a amplificação do fragmento de 268 pb e a amostra 4 não apresentou a amplificação de nenhum fragmento de DNA. Uma possível explicação para a não amplificação destes fragmentos de DNA podem estar relacionados com o fato das amostras 3 e 4 encontrarem-se hemorrágicas onde o sangue possui muitos inibidores da enzima Taq DNA polimerase conforme descrito por Mahbubani & Bej[23]. No entanto, apesar da amostra 3 apresentar-se hemorrágica ainda foi possível a visualização do fragmento de DNA de 268 pb que corresponde a amplificação de uma parte do gene da ß globina humana; neste caso, esta amostra encontrava-se com uma menor quantidade de sangue no material coletado e portanto com um número menor de inibidores da enzima. Esta característica associada com o fato do gene da ß globina estar em todas as células humanas e portanto em maior quantidade facilitando a disponibilidade de seqüências de DNA para a amplificação. Esta situação tornou possível a amplificação deste fragmento de DNA pela enzima Taq DNA polimerase. A amostra 4 não amplificou nenhum fragmento de DNA pois encontrava-se altamente hemorrágica, e portanto com uma grande quantidade de inibidores enzimáticos.

A padronização da técnica de PCR para a detecção do DNA de HPV em amostras cervicais de pacientes portadoras de lesões cancerosas e pré-cancerosas atendidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC-UEM) é de grande importância, pois esta técnica pode ser utilizada principalmente nos casos em que é necessária a confirmação do diagnóstico colpocitológico ou em situações onde há conflito entre os resultados da colpocitologia, colposcopia e histopatologia necessitando assim de uma confirmação diagnóstica mais detalhada[1,2,8,21,14,16,19,20,24,31,32].

Através da padronização da técnica de PCR é possível melhorar a sensibilidade e a exatidão do diagnóstico da infecção por HPV junto ao laboratório de Citologia Clínica (LEPAC-UEM) possibilitando assim a detecção precoce dessa infecção viral ainda na fase inicial ou nos casos subclínicos ou latentes[15]. Desta forma é possível contribuir para a diminuição da morbidade e da mortalidade causada pelo câncer cervical Entretanto a técnica de PCR deve ser utilizada em amostras clínicas cuja coleta seja isenta de sangue devido à presença dos inibidores enzimáticos ou submeter a amostra clínica hemorrágica ao processo de purificação através do método fenol-clorofórmio descrito por Sambrook *et al.*[30].

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Dra Mônica Lúcia Gomes e ao Laboratório de Doença de Chagas – DAC/UEM pela cessão dos equipamentos necessários para a realização deste trabalho. E também ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – LEPAC/UEM pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. **Adams, V.; Moll, C.; Schmidt, M.; Rodrigues, C.; Moos, R.; Briner, J.** Detection and typing of Human Papillomavirus in biopsy and cytological specimens by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: A method suitable for semiautomation. *Journal of Medical Virology*, 48:161-170, 1996.
2. **Bauer, H. M.; Ting, Y.; Greer, C. E.; Chambers, J. C.; Tashiro, C. J.; Chimera, J.; Reingold, A.; Manos, M. M.** Genital Human Papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*, 265:472-477, 1991.
3. **Bauer, H.M.; Manos, M.M.** PCR detection of genital Human Papillomavirus. *In:* **Persing, D. H.; Smith, T. F.; Tenover, F. C.; White, T. J. (Ed.).** *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications.* Rochester: Mayo Foundation, p.407-413. 1993.
4. **Bidoia, C. C. G.; Gabriel, M.; Consolaro, M. E. L.; Suzuki, L. E.; Kaneshima, E. N.** Padronização das condições de amplificação do gene HPVL1 para o diagnóstico molecular da infecção por Papilomavírus Hu-

mano (HPV) em materiais cérvico vaginais. *Anais do IX Encontro Anual de Iniciação Científica CNPq; UEL, UEM, UEPG, UNIOESTE.* p.439-440, 2000.

5. **Bonfiglio. T. A.; Erozan, Y. E.** *Gynecologic cytopathology*. New York: Lippincott-Raven, 1997.
6. **BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer.** *Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil.* 1998. Rio de Janeiro, 1998.
7. **Chow, V. T. K.; Loh, E.; Yeo, W. M.; Tan, S. Y.; Chan, R.** Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. *Pathology*, 32:204-208, 2000.
8. **Coker, A. L.; Gerasimova, T.; King, M. R.; Jachson, K. L.; Pirisi, L.** High risk HPVs and risk of cervical neoplasia: a nested case-control study. *Experimental and Molecular Pathology* 70: 90-95, 2001.
9. **Cox, J. T.** Evaluating the role of HPV testing for women with equivocal Papanicolaou test findings. *JAMA*, 281:1645-1647, 1999.
10. **Cuzick, J.** Human Papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *JAMA*, Chicago, 283:108-109, 2000
11. **Daniel, R. W.; Ahdieh, L.; Hayden, D.; Cu-Uvin, S.; Shah, K. V.** Intralaboratory reproducibility of Human Papillomaviurs identification in cervical specimens by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Clinical Virology* 19:187-193, 2000.
12. **Gomes, D. H.; Consolaro, M. E. L.; Suzuki, L. E.; Yoshida, C. S.; Kaneshima, E. N.** Otimização da reação de amplificação do gene ß globina humana para auxiliar no diagnóstico de agentes infecciosos. *Anais do IX Encontro Anual de Iniciação Científica.* CNPq; UEL, UEM, UEPG, UNIOESTE. p.442-444, 2000.
13. **Gompel, C.; Koss, L.** *Citopatologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas.* São Paulo, Manole, 1997.
14. **Gravitt, P. E.; Peyton, C. L.; Apple, R. J.; Wheeler, C. M.** Genotyping of 27 Human Papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single hybridization, reverse line blot detection method. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:3020-3027, 1998
15. **Gross, G. E.; Barrasso, R.** *Infecção por Papilomavírus Humano: Atlas clínico de HPV*. Porto Alegre: Artmed, 1999.
16. **Hietanen, S.; Ekblad, U.; Pelliniemi, T. T.; Syrjanen, K.; Helenius, H.; Syrjanen, S.** Type I diabetic pregnancy and subclinical Human Papillomavirus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 24:153-156, 1997.
17. **Iwasawa, A.; Nieminen, P.; Lehtinen, M.; Paavonen, J.** Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. *Obstetrics & Gynecology*, 89:81-84, 1997.
18. **Jacyntho, C.; Almeida-Filho, G.; Maldonado, P.** *HPV –Infecção genital feminina e masculina.* Rio de Janeiro, Revinter, 1996.
19. **Kado, S.; Kawamata, Y.; Shino, Y.; Kasai, T.; Kubota, K.; Iwasaki, H.; Fukazawa, I.; Takano, H.; Nunoyama, T.; Mitsuhashi, A.; Sekiya, S.; Shirasawa, H.** Detection of Human Papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. *Gynecologic Oncology,* 81: 47-52, 2001.
20. **Lancellotti, C. L. P.; Levi, J. E.; Silva, M. A. L. G.; Schwarzschild, M.; Nicolau, S. M.** Diagnóstico Laboratorial. *In:* **Carvalho, J. J. M.; Oyakawa, N.** (Ed.). *I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus Humano.* São Paulo: BG Cultural, p.45-60, 2000.
21. **Loreto, C. D; Maeda, M. Y. S.; Cavaliere, M. J.; Pereira, G. M. C.** Fatores interferentes na correlação cito-histológica em Papilomavírus (HPV). *Revista Brasileira de Patologia Clínica,* 28: 2, 1992.
22. **Mahony, J. B.; Luinstra, K. E.; Sellors, J. W.; Chernesky, M. A.** Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:1753-1758, 1993.
23. **Mahbubani, M.H.; Bej, A. S.** *Aplications of Polymerase Chain Reaction methodology in clinical diagnostics.* CRC Press Inc., 1994.
24. **Manos, M. M.; Ting, Y.; Wright, D. K.; Lewis, A. J.; Broker, T. R.; Wolinsky, S. M.** Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital HumanPapillomaviruses. *Cancer Cells*, 7:209-214, 1989.
25. **Nelson, J. H.; Hawkins, G. A.; Edlund, K.; Evander, M.; Kjellberg, L.; Wadell, G.; Dillner, J.; Gerasimova, T.; Coker, A. .; Pirisi, L.; Petereit, D.; Lambert, P. F.** A novel and rapid PCR-based method for genotyping Human Papillomaviruses in clinical samples. *J. Clinical Microbiology*, 38:688-695, 2000.
26. **Persing, D. H.** Target selection and optimization of amplification reactions *In:* **Persing, D. H.; Smith, T. F.; Tenover, F. C.; White, T. J.** *Diagnostic molecular microbiology principles and applications.* Rochester: Mayo Foundation, 1993. p. 88-104.
27. **Peyton, C. L.; Gravitt, P. E.; Hunt, W. C.; Hundley, R. S.; Zhao, M.; Apples, R. J.; Wheeler, C.M.** Determinants of genital Human Papillomavirus detection in US population. *The Journal of Infectious Diseases,* 183:1554-64, 2001.
28. **Rólon, P. A; Smith, J. S.; Muñoz, N.; Klug, S. J.; Herrero, R.; Bosch, X.; Llamosas, F.; Meijer, C. J. L. M.; Walboomers, J. M. M.** Human Papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int.J.Cancer*, 85:486-491, 2000
29. **Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N.** Enzymatic amplification of ß-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350, 1985.
30. **Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, J.** *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.
31. **Tenti, P.; Zappatore, R.; Migliora, P.; Spinillo, A.; Belloni, C.; Carnevali, L.** Perinatal transmission of Human Papillomavirus from pregnants with latent infections. *Obstetrics & Gynecology,* 93:475-479, 1999.
32. **Villa, L. L.** Biologia molecular: conceitos e princípios básicos. *In:* **Martins, N. V.; Pereyra, E. A. G. (Ed.).** *Conhecendo o HPV. Patologia do trato-genital inferior. Colposcopia e CAF.* São Paulo: Frôntis Editorial, 2000. p.137-143.
33. **WHO, World Health Organization.** Cervical cancer control in developing countries: Memorandum from a WHO meetting. *Bulletin of the World Health Organization*, 74: 345-351, 1996.
34. **Wright, T. C.; Denny, L.; Kuhn, L.; Pollack, A; Lorincz, A.** HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA,* 283:81-86, 2000.

Endereço para correspondência:
Professor MSc. Edilson Nobuyoshi Kaneshima
Universidade Estadual de Maringá, Depto de Análises Clínicas, Setor de Patologia Geral
Av. Colombo, 5179, Maringá-PR., CEP 87020-900
e-mail: enkaneshima@uem.br

XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS
III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLINICA
RIOCENTRO – RIO DE JANEIRO – RJ
8 a 12 de junho de 2003

Estudo comparativo entre duas técnicas de contagem de subpopulação de células T em indivíduos infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência humana*

Comparative study between two technical counts of T cell subpopulations from individuals infected and no infected with the humam immunodeficiency virus

Caio Augusto Santos Rodrigues[1,3]; Maria Gorete Lins de Queiroz[2]; Valéria Soraya de Farias Sales[3]; Tereza Neuma de Souza Brito[3]; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca[4]; Aldair de Souza Paiva[4]; Maria Zélia Fernandes[4]; Maria Cleide de Araújo Lopes[4]; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva[3] & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior[3]

RESUMO – **Objetivo:** Realizar o controle da imunofenotipagem, comparando os valores absolutos da contagem das subpopulações de células T (CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+), obtidas de dois modelos diferentes de citômetros de fluxo, analisando a equivalência e sensibilidade destas determinações.
Material e Métodos: Foram analisadas amostras de sangue periférico proveniente de 57 indivíduos sororreagentes para o HIV-1 (35 homens e 22 mulheres) e 15 indivíduos HIV-1 soronegativos (7 homens e 8 mulheres). As amostras foram encubadas com anticorpos monoclonais (AcMo) direcionados contra subpopulação de linfócitos T e simultaneamente analisados em dois modelos diferentes de citômetros de fluxo.
Resultados e Conclusões: Os resultados obtidos no estudo comparativo das subpopulações de linfócitos T, oriundas de indivíduos sororreagentes e soronegativos para o HIV-1 mostraram resultados estatisticamente não significativos entre os dois equipamentos: TCD4+ (p=0,7488), TCD8+ (p=0,2724) e CD4/CD8 (p=0,1199) nos indivíduos sororreagentes. Estes dados mostram que a citometria de fluxo é a técnica que apresenta resultados homogêneos independente do modelo de equipamento empregado, infecção pelo HIV, idade e sexo.

PALAVRAS-CHAVE – Citometria de fluxo, imunofenotipagem, subpopulação de células T, vírus da imunodeficiência humana.

SUMMARY – Objective: *To realize immunophenotyping control, comparing the absolute values of T cell subpopulations (CD3+/CD4+ and CD3+/CD8+) count, obtained from two differents flow cytometry models, analyzing the equivalency and sensitivity of these determinations.*
Material and Methods: *Peripheral blood samples from 57 HIV-1 seropositive patients (35 men and 22 women) and 15 HIV-1 seronegative people (7 men and 8 women). This samples were incubated with monoclonal antibodies (MoAbs) to T cell subpopulation and simultanesusly avaluted in the two differents models of flow cytometry.*
Results and Conclusions: *The results obtained for comparative counts of T cell subpopulations from HIV-1 seropositive and seronegative people indicated no statistically significant differences between the 2 equipaments: TCD4+(p=0,7488), TCD8+ (p=0,2724) and CD4/CD8 (p= p=0,1199) from seropositive group. Thus we were able to show that flow cytometry is a technique with a homogeneous standard, independent of the equipament models used, independent fo HIV-1 infection, age or sex.*

KEYWORDS *– Flow cytometry, immunophenotyping, T cell subpopulation and human immunodeficience virus.*

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) leva a um profundo estado de imunossupressão, caracterizado por uma progressiva redução da população de linfócitos TCD4. Estes linfócitos são as células envolvidas no reconhecimento inicial do antígeno apresentado por macrófagos, sendo, portanto, responsáveis pela amplificação da resposta imune através da liberação de citocinas. A destruição progressiva destes linfócitos torna o indivíduo susceptível a doenças oportunistas e neoplásicas que caracterizam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)[1,2,3,4,5].

O achado imunológico causado pela infecção do HIV-1 foi incorporado no acompanhamento dos pacientes infectados, como um marcador de evolução para a AIDS, assim como para a introdução de terapia anti-retroviral e profilaxia de infecções oportunistas[1,4,5,6].

Recebido em 25/02/2002
Aprovado em 28/02/2002
*Trabalho apresentado ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT/UFRN) para elaboração de monografia de conclusão do Curso de Farmácia na habilitação de Farmacêutico-Bioquímico.
[1]Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ); [2]Laboratório Central da Secretaria de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Norte (LACEN-RN); [3]Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT/UFRN); [4]Instituto de Onco-Hematologia de Natal (IONH).

A citometria de fluxo é atualmente a metodologia de escolha para este tipo de análise, pois permite a quantificação específica de subpopulações celulares através do uso de anticorpos monoclonais específicos, além de ser uma metodologia semi-automatizada, permitindo o processamento e leitura de um grande número de amostras em um curto período de tempo[1,7,8].

As células previamente marcadas com os anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados a fluorocromos são introduzidas no citômetro de fluxo. Dentro do equipamento, as células são transportadas em um fluxo de líquido isotônico até um compartimento denominado câmara de fluxo ("flow cell")[8,9,10,11]. Nesse compartimento, um feixe de raio laser incide sobre cada célula individualmente. Ao incidir sobre a célula, uma fração, ou seja, uma parte da luz é bloqueada frontalmente ("Forward Scatter" ou FSC) e outra fração é dispersa lateralmente ("Side Scatter" ou SSC). A fração FSC é relativa ao tamanho da célula e o SSC representa a complexidade intracitoplasmática que, nos leucócitos, caracteriza a granulosidade interna[8,9,10,11].

Adicionalmente, sob a ação do raio laser, anticorpos conjugados a fluorocromos emite sinais fluorescentes detectados por tubos fotomultiplicadores, convertendo a luz em sinais eletrônicos[8,9,10,11].

Análises preliminares (SSC x FSC) fornecem informações que identificam e separam os leucócitos em populações celulares diferentes, distinguindo, desta forma, linfócitos, monócitos, granulócitos e os debris, ou seja, resíduos de células e plaquetas.

Sinais eletrônicos são posteriormente usados para analisar as células de acordo com os marcadores de superfície, indicando as que reagiram positivamente para cada uma das fluorescências. Os resultados são dados em forma de histogramas[8,9,10,11].

Na região correspondente aos linfócitos, as subpopulações são definidas de acordo com a positividade ou negatividade de marcadores de diferenciação, tornando possível definir em uma única amostra o número de linfócitos B, T e "Natural Killer" (NK), bem como as subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8), através do uso de AcMo específicos conjugados a diferentes fluorocromos[8,9,10,11,12].

Existe uma grande variabilidade de resultados na contagem de linfócitos TCD4, devido à tecnologia empregada, além de fatores que influenciam a subpopulação linfocitária como: fatores biológicos (infecção intermitente aguda), uso de drogas (antiretrovirais, cefalosporinas, quimioterápicos, nicotina, corticosteróides), variação diurna, stress e esforço físico, podendo todos esses fatores levar a uma diminuição da contagem de células TCD4[12,13].

Baseando-se na variabilidade de resultados que podem ser obtidos, a citometria de fluxo constitui a metodologia mais adequada a ser empregada na imunofenotipagem de subpopulação de linfócitos, visto que nesta metodologia é possível a exclusão dos monócitos, que também expressam o antígeno CD4+ na superfície celular[8,12,13].

Objetivos

A constante inovação tecnológica possibilitou a realização desse trabalho, que teve como objetivo geral confrontar os resultados da contagem de subpopulações de linfócitos TCD4/TCD8 em amostras de pacientes infectados pelo HIV-1 e indivíduos soronegativos para o HIV através de dois citômetros de fluxo de modelos diferentes.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Casuística

Foram analisadas amostras de sangue periférico provenientes de 72 indivíduos de ambos os sexos, sendo 57 infectados pelo HIV-1 e 15 não infectados, que serviram como grupo controle. O sangue foi coletado pelo sistema Vacutainer, cujos tubos continham EDTA-K_3, para posterior análise hematológica e de imunofenotipagem. Informações referentes à idade e sexo também foram devidamente anotadas na ficha de resultados.

As análises foram realizadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Norte (LACEN-RN) e no Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto de Onco-Hematologia de Natal (IOHN).

Anticorpos monoclonais

a) AcMo duplamente conjugados com fluorocromos (Phicoeritrina-PE e Isotiocianato de Fluoreisceína-Fitc) e com especificidade para caracterização da subpopulação linfocitária T, empregados para análise no citômetro de fluxo modelo FACS-can:

$CD3_{fict}$/$CD4_{pe}$ (*Simultest*/Becton & Dickinson): linfócitos T auxiliar indutor ou T helper.

$CD3_{fict}$/$CD8_{pe}$ (*Simultest*/Becton & Dickinson): linfócitos T supressor/citotóxico.

$Gama1_{fict}$/$Gama2_{pe}$ (*Simultest* / Becton & Dickinson): controle isotípico inespecífico.

b) Conjunto de reagentes para o citômetro modelo FACS-count (Becton & Dickinson) que fornece 50 pares de tubos de reação. Cada par consiste de um tubo contendo AcMo anti CD3 e CD4 (tubo de tampa verde) e outro contendo anticorpos monoclonais anti CD3 e CD8 (tubo de tampa branca) marcados com fluorocromos e com especificidade para caracterização da subpopulação de linfócitos T.

Metodologia

Parâmetros hematológicos

Exames hematológicos tais como contagens de total e diferencial de leucócitos foram realizado no analisador hematológico "*Cell-Dyn* 3.000".

Marcação com anticorpos monoclonais para análise no citômetro de fluxo modelo FACS-can

- Pipetar 100 microlitros (μL) de sangue periférico total e homogeneizar com 10 μL de anticorpos monoclonais específicos CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+ em tubos de ensaios distintos identificados com o número do paciente e com o tipo de AcMo;

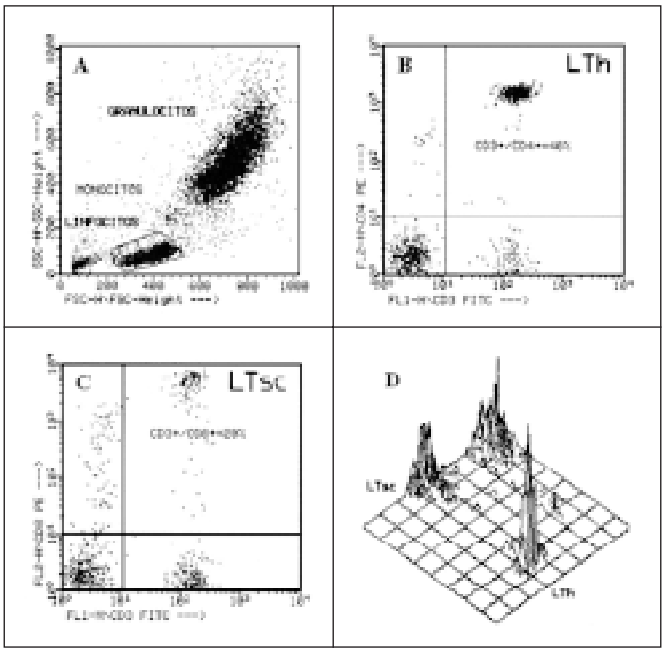


FIG. 2 - Histograma demonstrativo das subpopulações de linfócitos T em um indivíduo sadio. A) Demonstração das características físicas SSC (granulosidade interna) e FSC (tamanho), destaque para a população linfóide; B) e C) Dupla marcação CD3/CD4 e CD3/CD8, demonstrando as subpopulações de linfócitos T helper (LTh) e T supressor citotóxico (LTsc) dentro dos limites de normalidade; D) Histograma tridimensional mostrando a relação CD4/CD8 dentro dos limites de normalidade.

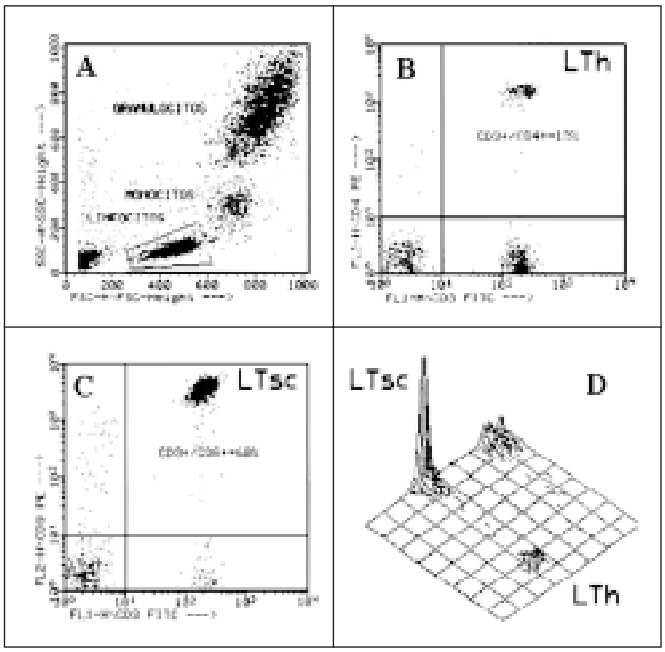


FIG. 3 - Histograma demonstrativo das subpopulações de linfócitos T em um indivíduo soropositivo para o HIV-1. A) Demonstração das características físicas SSC (granulosidade interna) e FSC (tamanho), destaque para a população linfóide; B) Dupla marcação CD3/CD4, demonstrando depleção da subpopulação dos linfócitos T helper (LTh); C) Dupla marcação CD3/CD8, demonstrando exacerbação da subpopulação dos linfócitos T supressor citotóxico (LTsc); D) Histograma tridimensional demonstrando a inversão da relação CD4/CD8.

- Incubar por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente;
- Acrescentar 2 (mililitros) μL de solução de lise a 10% (*Lysing Soluction* / Becton & Dickinson). Homogeneizar e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz;
- Centrifugar por 5 minutos a 2.000 rotações por minutos (rpm);
- Lavar 2 vezes com salina tamponada com fosfatos (PBS), pH 7.4;
- Fixar com formalina a 1% em PBS e guardar ao abrigo da luz até o momento da aquisição das amostras no citômetro de fluxo;
- Para cada amostra, utilizou-se o controle isotípico de marcação inespecífica (*Simultest*: $Gama1_{fict}/Gama2_{pe}$).

Marcação com anticorpos monoclonais para análise no citômetro de fluxo modelo FACS-count

- Rotule um par de tubos CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+, escrevendo em cada um deles o número do paciente;
- Agite, por 5 segundos no vórtex, o par de tubos de reação com as tampas para baixo e por mais 5 segundos em posição normal;
- Abra esses tubos e coloque-os na estante de trabalho. Feche a tampa da estante de trabalho para protegê-los da luz;
- Pegue a amostra do paciente e homogeneize o sangue, invertendo delicadamente o tubo cinco vezes;
- Pipete 50μL de sangue em cada um dos tubos de reagentes CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+. Troque as ponteiras a cada pipetagem;
- Tampe os tubos e agite, em vórtex, por 5 segundos, na posição normal;
- Incube, por 60 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para isso, coloque os tubos na estação de trabalho e feche a tampa;
- Destampe os tubos após a incubação e acrescente, em cada um deles, 5μL de solução fixadora. Troque as ponteiras a cada pipetagem;
- Tampe os tubos com novas tampas e agite, no vórtex por 5 segundos;
- Faça aquisição para a leitura da amostra no FACS-count dentro de no máximo 2 horas após a preparação. Até a aquisição das amostras os tubos devem ser mantidos na estante de trabalho ao abrigo da luz.

Aquisição e análise nos citômetros de fluxo

A análise foi realizada paralelamente em dois citômetros de fluxo. Um do modelo FACS–can (Becton e Dickinson; San José, Ca; USA), onde se utilizou o programa Lyses II, com aquisição de 10.000 eventos, levando-se em conta os parâmetros FSC em escala linear que avalia o tamanho celular, SSC também em escala linear, avaliador da complexidade e/ou granulosidade celular assim como os parâmetros FL1 e FL2 em escala logarítmica que detectam a fluorescência verde e laranja, ou seja, a reação antígeno/anticorpo conjugado ao FICT e PE.

Os resultados foram fornecidos através do número percentual de células positivas que para conversão em valores absolutos foram multiplicados pelo número absoluto de linfócitos e dividido por cem, quando a análise procedeu-se no modelo FACS-can (Figuras 2 e 3).

O outro modelo de citômetro de fluxo onde foram realizadas as análises é o FACS-count, (Becton & Di-

ckinson; San José, Ca, USA), onde as células marcadas com os anticorpos fluorescentes são introduzidas no equipamento e analisadas através dos parâmetros FSC e o SSC. Os feixes de laser incidem sobre anticorpos fluorescentes ligados à superfície das células. Esses compostos com a ação do raio laser emitem sinais fluorescentes detectados por tubos fotomultiplicadores, que convertem a luz em sinais eletrônicos, de modo semelhante ao observado no modelo FACS-can.

O sistema FACS–count fornece o número absoluto de linfócitos T auxiliares / indutores (CD3+/CD4+) e de linfócitos T supressores / citotóxicos (CD3+/CD8+). Neste modelo de citômetro de fluxo, é possível contar o número absoluto de linfócitos porque, em cada tubo de amostra, existe um número conhecido de partículas de referência *reference beads*, conjugadas com fluorocromos. Essas partículas atuam como um padrão para a quantificação das células. Como o equipamento lê fluorescência tanto das partículas de referência quanto das células, conhecendo a quantidade de partículas, ele pode calcular o número de células, o registro gráfico da intensidade da fluorescência das partículas de referência e das células.

Análise estatística

Os resultados foram analisados usando-se o teste "*t de Student*", sendo considerados significativos os valores de $p<0,05$.

RESULTADOS

Perfil dos indivíduos infectados pelo HIV-1

Da população analisada, 35 foram indivíduos do sexo masculino e 22 do sexo feminino. A idade da população analisada variou de 25 a 73 anos para os homens de 18 a 49 anos para as mulheres. A faixa etária mais acometida pela doença foi de 30 a 40 anos com 23 casos (40%), representada por 16 indivíduos do sexo masculino (28%) e 7 do sexo feminino (12%), como podemos observar na Figura 1.

As características laboratoriais da população analisada encontram-se distribuídas na Tabela I, constando de variações mínimas, máximas e medianas da idade, sexo, bem como de dados hematológicos e imunológicos.

Nos dados hematológicos, observou-se que leucometria variou de 1.800 a 12.500/mm^3. Na contagem de linfócitos observou-se uma variação maior compreendida entre 60 a 2.600 células/mm^3 (Tabela I).

Já no quadro imunológico, pode-se ver que a contagem de linfócitos TCD4+ variou de 2 a 1.055 células por mm^3 nas mulheres e 15 a 750 células por mm^3 nos homens. Os linfócitos TCD8+ compreenderam uma contagem de 43 a 2.350 células por mm^3 e a relação entre essas duas subpopulações linfocitárias variou com uma mínima de 0,01 a 1,31, quando analisado pelo FACS-count (Tabela I).

De acordo com a Tabela V a variação máxima encontrada na contagem de linfócitos TCD4 e CD8 entre os dois citômetros para o sexo feminino foi de 61 e 185 células por mm^3 respectivamente. A relação CD4/CD8 por sua vez observou-se uma variação máxima de 0,10.

As variações máximas encontradas na contagem de linfócitos TCD4, CD8 e a relação entre essas duas

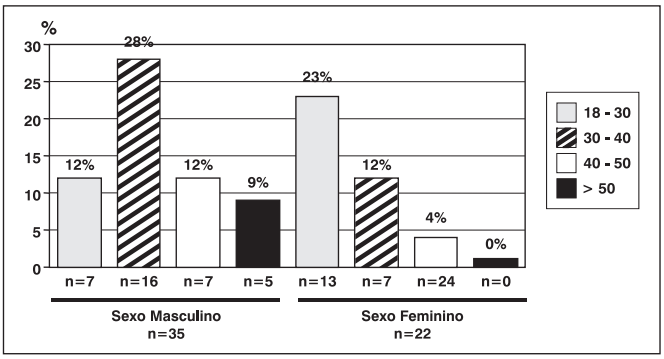


FIG. 1 - Distribuição dos casos de pacientes HIV-1 positivos segundo o sexo e faixa etária.
Fonte: Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Rio Grande do Norte (LACEN-RN).

TABELA I
Perfil dos indivíduos infectados pelo HIV-1

Variações	Homens (n= 35)			Mulheres (n=22)			Total (n= 57)	
	Min	Máx	Me	Min	Máx	Me	Min	Máx
Idade (anos)	25	73	37	18	49	29	18	73
Leucócitos (x10^3 / mm^3)	1,80	9,50	4,95	2,10	12,50	4,60	1,80	12,50
Linfócitos (x10^2 / mm^3)	0,06	2,60	1,20	0,20	2,23	1,09	0,06	2,60
Linfócitos TCD4 / mm^3	15	750	225	02	1.055	340	02	1.055
Linfócitos TCD8 / mm^3	43	2.350	983	162	1.519	771	43	2.350
Relação CD4+/CD8+	0,07	0,94	0,21	0,01	1,31	0,40	0,01	1,31

Fonte: Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Rio Grande do Norte (LACEN–RN)

TABELA II
Perfil do grupo controle

Variações	Homens (n=7)			Mulheres (n=8)			Total (n=15)	
	Min	Máx	Me	Min	Máx	Me	Min	Máx
Idade (anos)	15	46	25	10	45	29	10	46
Leucócitos (x10^3 / mm^3)	3.1	8.2	4.1	3.5	12.0	6.5	3.1	12.0
Linfócitos (x10^2 / mm^3)	1.2	3.3	2.2	1.5	3.5	2.1	1.2	3.5
Linfócitos TCD4 / mm^3	796	1321	950	923	1396	1100	796	1396
Linfócitos TCD8 / mm^3	445	687	510	473	680	550	445	687
Relação TCD4/TCD8	1.6	2.7	2.1	1.6	3.1	2.2	1.6	3.1

Fonte: Laboratório de Citometria de Fluxo (Instituto de Onco-Hematologia de Natal-IOHN)

TABELA III
Distribuição dos valores de contagens de linfócitos nos dois tipos de citômetro de fluxo em indivíduos não infectados do sexo masculino

Caso Nº	TCD4/mm^3			TCD8/mm^3			Relação CD4/CD8		
	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.
01	1.087	1.110	23	687	710	23	1,6	1,6	0
02	1.321	1.309	12	495	496	01	2,7	2,6	0,1
03	988	975	13	543	536	07	1,8	1,8	0
04	796	785	11	486	472	14	1,6	1,6	0
05	1.121	1.137	11	445	461	16	2,5	2,4	0,1
06	853	863	10	423	413	10	2,0	2,1	0,1
07	856	872	16	463	466	03	1,8	1,9	0,1

** Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto de Onco-Hematologia de Natal-RN*
*** Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Rio Grande do Norte (LACEN–RN)*

subpopulações para o sexo masculino foram respectivamente de 158, 381 e 0,15 de acordo com a Tabela VI. Apesar da variação máxima encontrada para o grupo do sexo masculino infectado pelo HIV-1 ter sido superior a encontrada para o sexo feminino (Tabela V), a variação não apresentou diferença estatística signifi-

TABELA IV
Distribuição dos valores de contagens de linfócitos nos dois tipos de citômetro de fluxo em indivíduos não infectados do sexo feminino

Caso Nº	CD4/mm³			CD8/mm³			Relação CD4/CD8		
	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.
01	958	975	17	489	536	47	1,9	1,8	0,1
02	1.022	1.053	31	598	596	02	1,7	1,8	0,1
03	1.322	1.340	18	563	622	59	2,3	2,1	0,2
04	923	935	12	473	459	14	1,9	2,0	0,1
05	1.089	1.097	08	465	451	14	2,3	2,4	0,1
06	1.080	1.089	09	680	688	08	1,6	1,6	0,1
07	1.357	1.303	54	486	495	09	2,8	2,6	0,2
08	1.396	1.378	18	453	435	18	3,1	3,2	0,1

** Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto de Onco-Hematologia de Natal-RN*
*** Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Rio Grande do Norte (LACEN–RN)*

TABELA V
Distribuição dos valores de contagens de linfócitos nos dois tipos de citômetro de fluxo em indivíduos do sexo feminino infectados pelo HIV-1

Caso Nº	CD4/mm³			CD8/mm³			Relação CD4/CD8		
	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.
01	360	389	29	1410	1388	22	0,25	0,28	0,03
02	558	539	19	1519	1704	185	0,37	0,32	0,05
03	26	29	03	250	245	05	0,10	0,12	0,02
04	312	312	00	771	857	76	0,40	0,36	0,04
05	380	360	20	314	816	02	0,47	0,44	0,03
06	377	316	61	704	545	159	0,53	0,58	0,05
07	452	471	19	826	780	36	0,55	0,60	0,05
08	1023	1033	10	778	771	07	1,31	1,34	0,03
09	02	02	00	293	293	00	0,01	0,01	00
10	390	407	17	740	683	57	0,53	0,60	0,07
11	340	349	09	870	855	15	0,39	0,41	0,02
12	460	434	26	1320	1388	68	0,35	0,31	0,04
13	22	23	01	500	481	19	0,04	0,05	0,01
14	145	118	27	271	251	20	0,53	0,43	0,10
15	536	537	01	960	957	03	0,50	0,56	0,06
16	85	87	02	250	247	03	0,30	0,35	0,05
17	500	515	15	590	571	19	0,85	0,90	0,05
18	38	34	04	162	164	02	0,23	0,21	0,02
19	260	268	08	570	562	08	0,46	0,48	0,02
20	530	525	05	1010	1006	04	0,52	0,52	00
21	1055	1062	07	1170	1108	62	0,90	0,96	0,06
22	175	185	10	1340	1320	20	0,13	0,14	0,01

** Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto de Onco-Hematologia de Natal-RN*
*** Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Rio Grande do Norte (LACEN–RN)*

cante (Tabela VII), através da análise feita pelo teste "*t de Student*", onde o p-valor para células TCD4+, TCD8+ e a relação CD4/CD8 foi de 0,7488, 0,2724 e 0,1199 respectivamente.

Perfil do grupo controle

Da população controle analisada, 7 eram indivíduos do sexo masculino e 8 do sexo feminino, totalizando de 15 indivíduos com sorologia negativa para o HIV e aparentemente sadios, cuja finalidade foi servir de controle para o estudo, tendo a faixa etária deste grupo variado de 10 a 46 anos (Tabela II).

TABELA VI
Distribuição dos valores de contagens de linfócitos nos dois tipos de citômetros de fluxo em indivíduos do sexo masculino infectados pelo HIV-1

Caso Nº	CD4/mm³			CD8/mm³			Relação CD4/CD8		
	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.	FACS-can	FACS-count	Var.
01	306	306	00	801	801	00	0,38	0,38	0,00
02	99	99	00	1319	1319	00	0,08	0,08	0,00
03	195	215	20	1195	1193	02	0,16	0,18	0,02
04	225	242	17	2350	2200	150	0,09	0.11	0,02
05	280	285	05	590	580	10	0,47	0,49	0,02
06	250	295	45	1475	1470	05	0,17	0,20	0,03
07	380	381	01	750	693	57	0,50	0,55	0,05
08	15	11	04	28	28	15	0,33	0,39	0,06
09	208	245	37	1399	1241	158	0,15	0,20	0,05
10	228	249	21	313	341	28	0,73	0,73	0,00
11	94	122	28	572	539	67	0,20	0,23	0,03
12	208	170	38	983	848	135	0,21	0,20	0,01
13	422	495	73	450	596	146	0,94	0,83	0,11
14	430	465	35	2130	2000	130	0,20	0,23	0,03
15	125	125	00	1140	1120	10	0,07	0,07	0,00
16	128	128	00	610	597	13	0,20	0,20	0,00
17	75	108	33	890	509	381	0,08	0,21	0,13
18	565	407	158	1140	1120	20	0,51	0,36	0,15
19	125	134	09	597	597	00	0,20	0,22	0,02
20	221	221	00	1140	1140	00	0,19	0,19	0,00
21	200	200	00	974	974	00	0,21	0,21	0,00
22	250	210	40	1250	1315	65	0,20	0,16	0,04
23	400	424	24	1250	1008	242	0,32	0,42	0,10
24	145	149	04	850	842	08	0,17	0,18	0,01
25	315	315	00	1488	1488	00	0,20	0,21	0,01
26	750	751	01	1765	1760	05	0,42	0,43	0,01
27	325	328	03	490	536	46	0,66	0,61	0,07
28	150	139	11	1550	1688	138	0,10	0,08	0,02
29	360	364	04	1130	1094	36	0,32	0,33	0,01
30	280	286	06	683	685	02	0,40	0,42	0,02
31	430	434	04	510	498	12	0,84	0,87	0,03
32	410	401	09	1260	1262	02	0,32	0,32	0,00
33	230	223	07	775	779	04	0,30	0,29	0,01
34	65	67	02	680	668	12	0,09	0,10	0,01
35	95	104	09	1280	1264	16	0,07	0,08	0,01

** Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto de Onco-Hematologia de Natal-RN*
*** Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Rio Grande do Norte (LACEN–RN)*

TABELA VII
Resultados dos testes "t de Student" (observações emparelhadas), na comparação dos valores de linfócitos TCD4, TCD8 e a relação TCD4/TCD8 obtida no laboratório 1* e no laboratório 2* nos indivíduos infectados para o HIV-1

Resultados	Variáveis		
	TCD4	TCD8	TCD4/TCD8
Dif. de médias	– 1,2807	– 194,5962	– 0.009649
t– calculado	1,309156	992,0732	– 0,000102
Graus de liberdade	56	56	56
P – valor	0,7488	0,2724	0,1199

** Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto de Onco-Hematologia de Natal-RN*
*** Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Rio Grande do Norte (LACEN–RN)*

A variação dos níveis de linfócitos TCD4 em indivíduos do sexo masculino e feminino do grupo controle encontra-se presente respectivamente nas Tabelas III e IV, mostrando-se dentro dos limites de normalidade. Conforme observamos, a maior variação para o sexo masculino foi de 23 células por mm^3. Nos indivíduos do sexo feminino, verificou-se uma mesma tendência, ou seja, constatou-se uma baixa variação compreendida em torno de 54 células por mm^3 mostrando dessa forma uma homogeneidade nos resultados.

Na contagem de linfócitos TCD8, Tabelas III e IV respectivamente, os resultados das variações apresentaram níveis dentro dos limites de normalidade tanto para o sexo masculino com uma variação máxima de 23 células por mm^3, como para o sexo feminino com 47células por mm^3 (Tabela III e IV).

Além das variações das subpopulações de linfócitos TCD4 e TCD8 foi feita a análise na variação dessas subpopulações, que se comportou com uma variação máxima para o sexo masculino de 0,1 e 0,2 para o sexo feminino. Ambos dentro dos limites aceitáveis (Tabela III e IV).

Consideramos como valores de referência para linfócitos T e subpopulações em indivíduos adultos sadios os seguintes valores[14]:

- Linfócito T (CD3+): 875 a 1.900/mm^3
- Linfócitos T helper (CD3+/CD4+): 700 a 1.400/mm^3
- Linfócitos T supressor/citotóxico (CD3+/CD8+): 190 a 725/mm^3
- Relação TCD4/TCD8: 1,0 – 3,0

DISCUSSÃO

Embora na evolução da infecção pelo HIV-1 sejam atingidos todos os setores do sistema imune, ao menos indiretamente, a conseqüência clínica de maior expressão parece decorrer do comprometimento da resposta mediada por células T[15].

O vulto da depleção das células TCD4 varia entre pacientes. Após a queda inicial, muitos podem manter um nível de células CD4+ relativamente normal ou ligeiramente inferior, durante longos períodos, seguidos de quedas bruscas que, em vários pacientes, coincidiu com aumentos marcantes do antígeno HIV-1 circulante[6,15,16].

Em geral, os portadores assintomáticos e indivíduos com o complexo relacionado à AIDS apresentam contagens de linfócitos TCD4 mais elevadas do que aqueles com sarcoma de Kaposi e/ou os atingidos por infecções oportunistas[16].

Baseado nesses relatos, os resultados obtidos, para a contagem de células TCD4 através da citometria de fluxo, devem expressar valores bastante exatos dada a importância dessa subpopulação linfocitária na avaliação clínica, terapêutica e imunológica do pacientes infectado pelo HIV-1[12,17,18].

Calcado neste princípio foram realizadas análises estatísticas dos resultados da imunofenotipagem de linfócitos TCD4 obtidos através dos dois modelos de citômetro de fluxo. As análises dos resultados demonstraram equivalência, uma vez que as variações do número de células TCD4 do mesmo indivíduo infectado pelo HIV-1 não foram estatisticamente significantes, conforme demonstrado na Tabela VII.

De acordo com a literatura, a interpretação clínica da contagem de células TCD4 na avaliação imunológica, terapêutica e profilática do indivíduo HIV-1 positivo varia com os níveis dessas células. Nos pacientes onde a contagem é próxima de 1.000/mm^3 a variação de uma contagem para outra pode ser flexível, o que não é tão significativa. Ao passo que indivíduos apresentam contagens de células TCD4 inferior a 500 células/mm^3 a variação deve ser de no máximo 30% no caso de duas contagens, devido diferenças maiores implicar em conduta terapêutica distinta, bem como medidas profiláticas peculiares as possíveis infecções oportunistas que possam vir a surgir de acordo com o nível de linfócitos TCD4+[16].

O número de células TCD8+ também varia nos indivíduos infectados pelo HIV-1. Muitos indivíduos sadios, soropositivos, além daqueles com síndromes linfoadenopáticas e linfoadenopatia generalizada progressiva apresentam níveis elevados de células TCD8+. A expansão da população de TCD8+ pode representar a geração de respostas citotóxicas contra o HIV-1 e outros patógenos[19,20].

No curso final da doença, os pacientes com AIDS portadores de infecções oportunistas encontram-se, a miúde, privados de todas as células linfóides, inclusive dos linfócitos CD8+. O mecanismo que resulta nessa depleção não está claro, mas pode ser causado por severa supressão da medula óssea[16].

Tais abordagens descritas na literatura estão evidentes na Tabela I onde se verificam variações de linfócitos TCD8 de 43 a 2.350 células/mm^3 entre os indivíduos infectados, mostrando assim que o nível de células TCD8+ depende do estágio evolutivo da infecção pelo HIV-1, uma vez que foi analisado material biológico (sangue) de indivíduos nas diversas fases da infecção. Outro ponto importante que deve ser ressaltado foi a não observação de divergências nas contagens de linfócitos TCD8+ no mesmo indivíduo, que semelhante aos linfócitos TCD4 não devem apresentar variações bruscas em contagem dupla, conforme demonstrado nas Tabelas V e VI.

Com esses dois parâmetros laboratoriais, contagem de linfócitos TCD4 e TCD8, é possível obter um terceiro, que é a relação entre essas duas subpopulações de linfócitos T (CD4+/CD8+) onde, em indivíduos sadios, não infectados pelo HIV-1, deve estar sempre a favor da subpopulação CD4+. Nos indivíduos infectados, essa relação se inverte favorecendo as células CD8+, tornando-se, desta forma, mais um indicativo da infecção.

Como podemos observar ainda nas Tabelas V e VI a relação CD4+/CD8 obtida através dos dois modelos de citômetro de fluxo ratifica a equivalência dos resultados das subpopulações de linfócitos TCD4 e TCD8, uma vez que não foram detectadas divergências nas análises estatísticas dessa relação

(Tabela VII). É válida ainda a ressalva de que foram evidenciados 2 casos onde os indivíduos infectados apresentaram relações CD4+/CD8+ acima de 1,0 o que favorece o linfócito CD4+.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que a citometria de fluxo constitui uma metodologia de padrão homogênea, pois se observou concordância nos resultados obtidos, tanto no grupo problema quanto no grupo controle, independente do modelo do equipamento empregado.

REFERÊNCIAS

1 **Neves Jr, I.; Morgado, M. G.** Immunological evaluation of human immunedeficiency virus infected individuals by flow cytometry. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3):393-400, 2000.

2 **Nokta, M. A.; Li, X. D.; Nichols, J.; Pou, A.; Asmuth, D.; Pollard, B. P.** Homeostasis of Naive and memory t cell subpopulations in peripheral blood and lymphoid tissues in the context of human immunodeficiency virus infection. *The Journal of infectious Diseases*, 183:1336-1342, 2001.

3 **Sereti, I.; Lane, H. C.** Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus: Implications for immune-based therapies. *Clinical Infectious Diseases*, 32:1738-1755, 2001.

4 **Fauci, A. S.** Host factors and the pathogenesis of HIV-induced diseases. *Nature*,384: 529-533, 1996.

5 **Cohen, O. J.; Kinter, A.; Fauci, A.** Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunological Reviews*, 159:31-48, 1997.

6 **Lawn, S. D.; Butera, S. T.; Folks, T. M.** Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4):753-777, 2001.

7 **Giorgi, J. V.; Hultin, L. E.** Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clinical Immunology*, 10(4):55-69, 1990.

8 **Oliveira, M. S. P.** Citometria de fluxo em imunofenotipagem celular I. Perfil imunológico de linfócitos circulares. *Boletim*, 163(15),59-67, 1993.

9 **Morgado, M. G.; Neves Jr, I.** Laboratório de AIDS e imunologia molecular. *In: Simpósio citometria de fluxo na avaliação imunológica de indivíduos infectados pelo HIV*, 1998. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, p.37-38, 1998.

10 **FACS-CAN User's Guide.** San Jose (California): Becton Dickinson Immunocytometry systems, Cap 1: 1-2, System overview,1998.

11 **Manual de Contagem de Linfócitos TCD4.** *Os linfócitos.* Brasília: Ministério da Saúde, p.13-19, 1998.

12 **Carvalho, F. G.** Citometria de fluxo no estado da AIDS. *In: Simpósio Citometria de Fluxo na Avaliação Imunológica de Indivíduos Infectados pelo HIV*. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, p.38-39. 1998.

13 **Pardine, R.** Acompanhamento do paciente infectado pelo HIV-1. *In: Simpósio Citometria de Fluxo na Avaliação Imunológica de Indivíduos Infectados pelo HIV*. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz. p.39-40. 1998.

14 **Carrasa, F. R.** *In: Laboratório em pediatria – Interpretação clínica*, 1ª edição, cap.3, p.115, 1989.

15 **Pantaleo, G.; Fauci, A. S.** Immunopathogenesis of HIV infection. *Annual Reviews Microbiology*, 50:825-854,1996.

16 **Koening, S.; Fauci, A. S.** AIDS: imunopatogenia e resposta imune ao vírus da imunodeficiência humana. *In:* **Devita Jr., V. T.; Helman, S.R. ; Steven, A.** *AIDS: etiologia, diagnóstico, tratamento e prevenção.* 2ª edição. Rio de Janeiro: Revinter, 1991. Cap.4, p.63-79.

17 **Phair, J. P.** Determinants of the natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of infectious diseases*, 179(2):384-386, 1999.

18 **Valles, L. M. A. T. *et al.*** Contagem de linfócitos CD4+ e CD8+: comparação entre três métodos. *Newslab*, 8:46-47, 1996.

19 **McMichael, A. J.; Callan, M.; Appay, V.; Hanke, T.; Ogg, G.; Rowland-Jones, S.** The dynamics of the cellular immune response to HIV infection: implications for vaccination. *Phil. Trans. Society Royal London*, 355:1007-1011, 2000.

20 **Copeland, K. F. T.; Heeney, J. L.** T helper cell activation and human retroviral pathogenesis. *Microbiology Reviews*, Editora Interamericana, São Paulo-SP, 60(4):722-742. p.200, 1996.

Endereço para correspondência:
Prof. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior
Disciplina de Imunologia Clínica
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / DACT
Faculdade de Farmácia – Univ. Federal do Rio Grande do Norte / UFRN
E-mail: gbcjunior@hotmail.com

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

Avaliação da velocidade de hemossedimentação (VHS) utilizando o método de Westergren (original e modificado) e os sistemas Vacuette e Sedivette

Erythrocyte sedimentation rate evaluation by Westergren (original and modified) and Vacuette and Sedivette systems

Luci Maria Sant'Ana Dusse[1]; Ana Paula Mendonça Ribeiro[2]; Geralda de Fátima Guerra Lages[3]; Lara Carvalho Godoi[4]; Anna Letícia Soares[2]; Lauro Mello Vieira[5] & Maria das Graças Carvalho[1]

RESUMO – O método de Westergren é universalmente utilizado para a determinação da VHS. Ao longo do tempo, esse método sofreu algumas modificações que foram aceitas pelo *International Committee for Standardization in Hematology/ICSH*, 1977[4]. Com o advento da AIDS, tem crescido a preocupação com a questão da biossegurança no laboratório clínico. Em conseqüência dessa preocupação e considerando-se os riscos envolvidos na determinação da VHS, que incluem manuseio e descarte de grande volume de sangue, tem surgido, no mercado, sistemas para realização da VHS que minimizam o contato com o sangue. Para investigar se estas diferentes metodologias reproduzem de modo fidedigno o método proposto por Westergren, foi realizado o presente trabalho que teve como objetivo comparar os resultados de VHS aos 30, 60 e 120 minutos obtidos pelo método clássico de Westergren (método 1), método de Westergren modificado, utilizando EDTA como anticoagulante e fazendo-se a diluição do sangue com salina (método 2); utilizando EDTA como anticoagulante e sem a diluição com salina, como tem sido freqüentemente feito nos laboratórios clínicos (metodo 3); através dos sistemas Vacuette (método 4) e Sedivette (método 5). Não foi observada diferença significativa quando se compararam os cinco métodos utilizando amostras de sangue de mulheres jovens e aparentemente saudáveis. No entanto, para a correta interpretação dos resultados, o mesmo estudo deverá obrigatoriamente ser realizado em um grupo de pacientes com doenças sabidamente aceleradoras do processo de VHS a fim de se conhecer o impacto destas condições patológicas nas diferentes metodologias de determinação da velocidade de hemossedimentação.

PALAVRAS-CHAVE – VHS, Westergren, Vacuette, Sedivette.

SUMMARY *– Westergren's method is widely utilized for erythrocyte sedimentation rate determination (VHS), whose method has shown modifications that has been accepted by* International Committee for Standardization in Hematology/ICSH, *1977[4]. Because to AIDS, issues related to biosecurity in Clinical Labs have been arisen. Due to this worry and considering the risks involved in VHS determination, including manipulation and discard of a great blood volume, other commercially available methodologies have appeared in order to reduce the contact with patient's blood samples. To investigate whether these different methodologies are able to reproduce, in a very similar way, the original Westergren method results, it has propused the present work, whose aim is to compare VHS results at 30, 60 and 120 minutes by the conventional Westergren method (method 1), modified Westergren method using EDTA as anticoagulant followed by blood dilution with NaCl 0.85% (method 2); using EDTA as anticoagulant with no saline dilution as it has frequently been observed in Clinical Labs (method 3); through Vacuette (method 4) and Sedivette systems (method 5). No significant difference was observed as the five different methods were compared in blood samples of juvenil and apparently healthy women. However, for the correct results interpretation, similar studies must be carried out in a patients group with diseases that, indoubtly, cause increase of VHS rate in order to know the impact of the pathological conditions on different methodologies.*

KEYWORDS *– Erythrocyte sedimentation rate, Westergren, Vacuette, Sedivette.*

INTRODUÇÃO

A velocidade de hemossedimentação (VHS) corresponde à medida da coluna de plasma de uma amostra de sangue após a sedimentação espontânea das hemácias[1,2]. O método de Westergren é universalmente utilizado para a determinação da VHS. Esse método utiliza tubo de vidro de 30cm de comprimen-

Recebido em 10/12/2001
Aprovado em 15/3/2002
[1]Doutoras do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas/Faculdade de Farmácia/UFMG; [2]Bolsitas do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq); [3]Farmacêutuca-Bioqyímca do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas /Faculdade de Farmácia/ UFMG; [4]Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutucas/Faculdade de Farmácia / UFMG; [5]Mestre do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas/Faculdade de Farmácia/UFMG

to, 2,4 a 2,5mm de diâmetro interno, graduado de zero a 200mm, sendo que a marca 200 corresponde à borda inferior do tubo. Como anticoagulante para a obtenção da amostra de sangue, utiliza-se uma solução aquosa de citrato de sódio diidratado ($Na_3C_6H_50_7.2H_20$) a 109mmol/L (32,08 g/L), na proporção de uma parte da solução para quatro partes de sangue[3].

O *International Committee for Standardization in Hematology* /ICSH, 1977[4] considera aceitável algumas modificações introduzidas ao método originalmente proposto por Westergren, entre elas a substituição do tubo de vidro por tubo de plástico (polipropileno ou policarbonato) e o uso de EDTA como anticoagulante, desde que seja feita uma diluição do sangue, imediatamente antes de iniciar o exame, com uma parte de solução salina a 0,9g/L para quatro partes de sangue.

Nas últimas décadas, com o surgimento da AIDS, tem crescido a preocupação com a questão da biossegurança no Laboratório Clínico. Em conseqüência dessa preocupação e considerando-se os riscos envolvidos na determinação da VHS, que inclui o manuseio e descarte de grande volume de sangue, tem surgido no mercado sistemas para realização da VHS que minimizam o contato com o sangue. Tais sistemas incluem tubos com citrato de sódio a 3,2 g/dL para a coleta do sangue e tubos para sedimentação das hemácias, que são preenchidos por capilaridade, sem necessidade de aspiração da amostra. Ao final, todo o material utilizado é descartado. São inquestionáveis as vantagens desses sistemas de determinação da VHS, considerando-se a praticidade de execução e a biossegurança. No entanto, torna-se imprescindível avaliar se essas metodologias reproduzem de modo fidedigno o método proposto por Westergren.

O objetivo do presente estudo foi comparar os resultados de VHS, aos 30, 60 e 120 minutos, obtidos simultaneamente pelo método clássico de Westergren (método 1), método de Westergren modificado, utilizando EDTA como anticoagulante e fazendo-se a diluição do sangue com salina (método 2), utilizando EDTA como anticoagulante e sem a diluição com salina, como tem sido freqüentemente feito nos laboratórios clínicos (método 3), através dos sistemas Vacuette (método 4) e Sedivette (método 5), que utilizam tubos plásticos de altura inferior ao proposto por Westergren.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Amostra biológica

Foram coletados de cada participante 14.5mL de sangue venoso, sendo 4.5mL em EDTA (tubos Vacutainer), 4.5mL em citrato de sódio (tubos Vacutainer), 2.0mL em citrato de sódio (tubos Vacuette) e 3.5mL em citrato de sódio (tubos Sedivette). Todas as amostras foram obtidas após o esclarecimento dos objetivos da pesquisa, a obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido e o preenchimento da ficha clínica.

2) Grupo de estudo

Mulheres selecionadas dentre as alunas matriculadas na Faculdade de Farmácia da UFMG (n=15).

3) Critérios de inclusão

1) Idade, compreendida entre 21 e 24 anos.
2) Estar em jejum.
3) Não apresentar manifestações clínicas de processos infecciosos e/ou inflamatórios.

4) Metodologia

Foi determinada a velocidade de hemossedimentação, aos 30, 60 e 120 minutos, utilizando-se os seguintes métodos:

1) Método original proposto por Westergren, com amostra colhida em citrato de sódio, utilizando-se a pipeta e o suporte de Westergren.
2) Método de Westergren, com a amostra colhida em EDTA e diluída em solução fisiológica (uma parte de solução fisiológica para quatro partes de sangue).
3) Método de Westergren modificado, com amostra colhida em EDTA.
4) Sistema Vacuette, com tubos de vácuo e pipetas desse sistema.
5) Sistema Sedivette, com tubos desse sistema.

RESULTADOS

As Figuras 1, 2, e 3 representam a velocidade de hemossedimentação obtida pelos cinco métodos, aos 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. A análise estatística dos resultados (*Kruskal-Wallis*) revelou que não houve diferença entre os valores obtidos, aos 30, 60 e 120 minutos, comparando-se os cinco métodos.

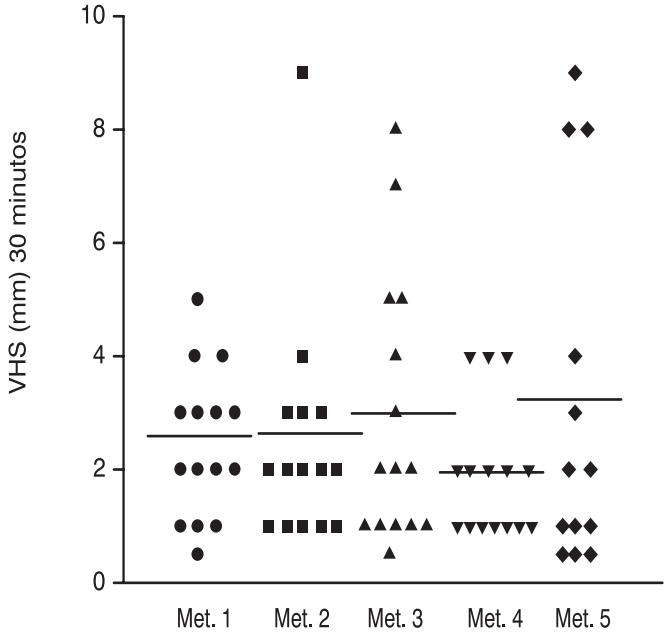


FIG. 1 - Velocidade de hemossedimentação (mm) aos 30 minutos. A linha horizontal representa a média dos valores obtidos.

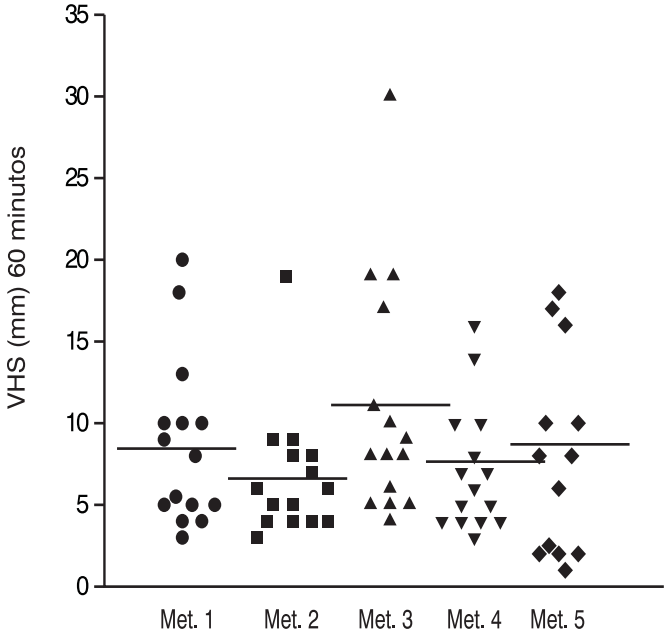


FIG. 3 - Velocidade de hemossedimentação (mm) aos 120 minutos. A linha horizontal representa a média dos valores obtidos.

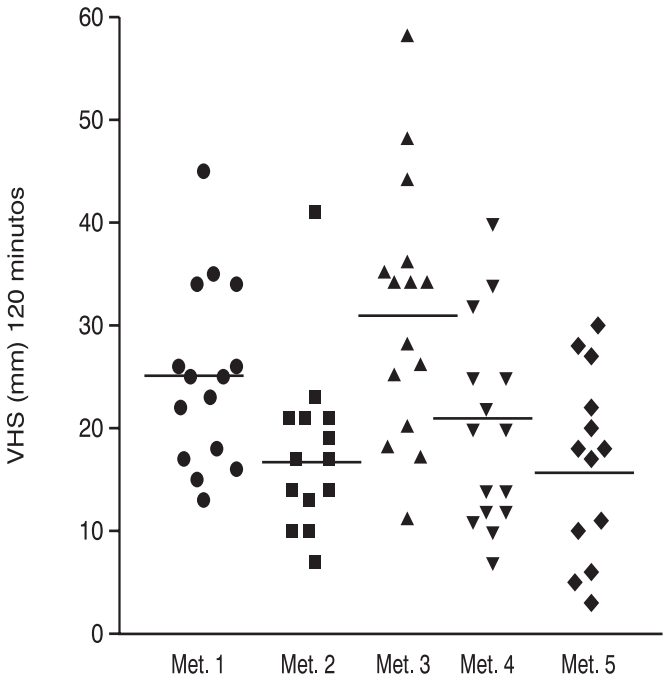


FIG. 2 - Velocidade de hemossedimentação (mm) aos 60 minutos. A linha horizontal representa a média dos valores obtidos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Uma resposta do organismo à ocorrência de lesões localizadas ou sistêmicas, doenças inflamatórias ou gravidez, pode resultar em um aumento das proteínas plasmáticas, especialmente das globulinas e do fibrinogênio. Apesar da baixa sensibilidade da velocidade de hemossedimentação, algumas aplicações desse exame merecem ser citadas tais como acusar alguns tipos de moléstia oculta ou monitorar o curso de uma doença ou atividade[5].

O fenômeno da aceleração da velocidade de hemossedimentação das hemácias é dependente quase exclusivamente do plasma. O aumento dos níveis plasmáticos de fibrinogênio e de globulinas contribui para a alteração das propriedades físico-químicas do plasma, o que resulta na redução da carga elétrica das hemácias, facilitando o processo de empilhamento das mesmas (*rouleaux*) e, conseqüente aumento da velocidade de sedimentação dessas[6].

Apesar de muitas controvérsias sobre o real valor da medida da VHS, não há dúvida de que esse exame constitui um importante parâmetro auxiliar para detecção de alterações na composição do plasma devido a diversas patologias ou condições que favoreçam o fenômeno de separação das hemácias do plasma. Portanto, há necessidade de se realizar um estudo comparativo dos métodos avaliados no presente trabalho utilizando amostras de sangue de pacientes com doenças sabidamente capazes de acelerar a VHS para concluir se tais métodos são equivalentes, nessas circunstâncias.

Considerando que o presente estudo foi realizado em amostras de sangue de mulheres jovens e saudáveis, seus resultados não poderão ser extrapolados para pacientes. Dessa forma, a conclusão plausível deste estudo consiste na observação de que os resultados da VHS de mulheres jovens e saudáveis não diferiram quando se compararam os métodos de Westergren original ou com as modificações propostas, os sistemas Vacuette e Sedivette, utilizando-se amostras colhidas em jejum e realizando-se o teste imediatamente após a coleta, conforme recomenda o ICSH.

Apoio financeiro

PIBIC / CNPq.

REFERÊNCIAS

1 **Carvalho, M. G.; Silva, M. B. S.** *Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação.* Belo Horizonte: [s.n.], 1988.
2 **Dacie, J. V.; Lewis, S. M.** *Hematologia practica.* 2ª ed. Barcelona: Ediciones Toray S. A. 1970.
3 **Ciscar, F.; Farreras, P.** *Diagnostico hematologico.* 1ª ed. Barcelona, 1960.
4 **International Committee for Standardization in Haematology.** Recomendation for Measurement of Erytrocyte Sedimentation Rate of Human Blood. *Am. J. Clin. Pathol.* 66:59-61, 1977.
5 **Sacher, R. A.; McPherson, R. A.** *Interpretação clínica dos exames laboratoriais.* 11ª ed. Ed. Manole, São Paulo, 2000.
6 **Silva, T. M.; Gilbert, M. F. P.; Almeida, E. T.** Análise comparativa de VHS realizada nos equipamentos automáticos Sedisystem e Ves Matic, tendo como referência padrão o método Westergren. *Newslab.* 35:190-194, 1999.

Endereço para correspondência:
Profª Luci Maria Sant'Ana Dusse
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas/Faculdade de Farmácia/UFMG
Av. Olegário Maciel, 2360 - sala 608 - Belo Horizonte - Minas Gerais/MG
CEP 30180-112
Fax (0xx31)3339-7644
E-mail: lucim@farmacia.ufmg.br

Avaliação entre métodos, baseados na sedimentação por centrifugação em formol-éter, utilizados para diagnóstico das enteroparasitoses*

A comparative study based on formol-ether concentration technique used in parasitological diagnostic

Elúzio José Lima Cerqueira[1]; Fernando Luiz Trindade Rego[2]; Rejane Cardoso Rodrigues[3]; Lêda Maria Alcântara[1] & Neci Matos Soares[1]

RESUMO – Amostras de fezes de 302 pacientes, portadores de no mínimo uma espécie de helminto e uma espécie de protozoário, foram utilizadas para avaliar a eficácia dos métodos de Ritchie simplificado por Ridley & Hawgood (1956) e de Ritchie modificado por Allen & Ridley, baseados na Sedimentação por centrifugação em formol-éter.

PALAVRAS-CHAVE – Técnicas parasitológicas, diagnóstico laboratorial.

SUMMARY *– To compare an efficacy of Ritchie simplification by Ridley & Hawgood (1956) with modification of Ritchie by Allen & Ridley, based on formol-ether concentration technique in 302 sample fecal with at least on type of helminths and on type of protozoa applied to enteroparasitological diagnostic.*

KEYWORDS *– Parasitological technique, laboratory diagnostic.*

INTRODUÇÃO

O método da sedimentação por centrifugação, tendo como base o formol-éter e conhecido como "Método do formol-éter", foi desenvolvido por Ritchie em 1948 (Método de Ritchie) e, posteriormente, simplificado por Ridley & Hawgood (1956). Esta técnica, tão eficiente e mais simples que a original, tem sido amplamente adotada como procedimento de diagnóstico. Anos depois, em 1970, Allen & Ridley fizeram modificações do método com a finalidade de obter maior rendimento na pesquisa de ovos e larvas de helmintos.

Este trabalho tem como objetivo testar a eficiência dos métodos de Ritchie simplificado por Ridley & Hawgood (1956, Ritchie simplificado) e de Ritchie modificado por Allen & Ridley (1970, Ritchie modificado), baseados na sedimentação por centrifugação em formol-éter, utilizados para o diagnóstico de enteroparasitoses, principalmente na pesquisa de ovos e larvas de helmintos.

MATERIAL E MÉTODO

As amostras de fezes utilizadas foram recebidas pelo Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia e examinadas pelo método de sedimentação espontânea, durante os meses de dezembro de 2000 a dezembro de 2001. Destas amostras, 302 foram selecionadas pelo critério de estarem contaminadas com, no mínimo, um helminto e um protozoário. A faixa etária dos pacientes variou de 1 a 76 anos, sendo 137 do sexo feminino e 165 do sexo masculino. As amostras selecionadas foram então analisadas pelos métodos de Ritchie simplificado (1956) e de Ritchie modificado (1970). A análise estatística foi realizada através de recursos de computação, utilizando-se para a construção da base de dados e análises o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows™, versão 9.0. A associação entre variáveis categóricas foi avaliada pelo teste do Qui-quadrado (X^2). O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,05.

Recebido em 12/4/2001
Aprovado em 15/4/2002
*Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia
[1]Prof. Adjunto de Parasitologia Clínica; [2]Prof. Assistente - FF/UFBA; [3]Estudante da FF/UFBA – Bolsista / UFBA - Laboratório de Parasitologia Clínica

RESULTADOS

Os resultados apresentados na Tabela I demonstram que o método de Ritchie simplificado não é adequado para pesquisa de ovos e larvas de helmintos, como demonstrado anteriormente (Allen & Ridley, 1970; Cerqueira & Barreto, 1993). No entanto, o emprego do método de Ritchie modificado permitiu elevar a freqüência dos helmintos em 54% (Tabela I).

A Tabela II demonstra que algumas espécies de helmintos diagnosticadas pelo método de Ritchie modificado é significativamente maior do que estas espécies encontradas pelo método de Ritchie simplificado (P = 0,000; Teste Qui-quadrado), sendo a freqüência de 1,83 vezes maior para *Ascaris lumbricoides*, 2,04 para *Trichuris trichiura* e 3,0 para Ancilostomídeos. Apesar da eficácia do método, a sedimentação espontânea elevou ligeiramete a freqüência total dos helmintos (Tabela I). No entanto, para cada espécie de helminto diagnosticada, não houve diferenças significativas quando empregada os métodos de sedimentação espontânea ou de Ritchie modificada (P>0,05; Teste Qui-quadrado, Tabela II). Quanto ao diagnóstico dos protozoários, tanto os métodos de Ritchie simplificado quanto a de Ritchie modificada são igualmente eficazes. No entanto, são ligeiramente

TABELA I
Freqüência de parasitos encontrados nas 302 amostras analisadas par diferentes métodos

Métodos	Freqüência de parasitos		
	Helmintos (ovos e/ou larvas)	Protozoários (cistos)	Total
Hoffman, Pons & Janer (Sedimentação espontânea)	374	393	767
Ritchie simplificado por Ridley & Hawgood	159	471	630
Ritchie modificado por Allen & Ridley	346	487	833

TABELA II
Freqüência de diferentes espécies de helmintos em 302 amostras analisadas por diferentes métodos

Helmintos (ovos e/ou larvas)	Métodos					
	Hoffman, Pons & Janer (sedimentação espontânea)		Ritchie simplificado por Ridley & Hawgood		Ritchie modificado por Allen & Ridley	
	Freqüência	%	Freqüência	%	Freqüência	%
Ascaris lumbricoides	181	59,93	98*	32,45	179*	59,27
Trichuris trichiura	106	35,09	50*	16,55	102*	33,77
Enterobius vermicularis	007	2,31	–	–	005	1,65
Ancilostomideos	025	8,27	007*	2,31	021*	6,95
Strongyloides stercoralis	027	8,90	003	0,99	017	5,62
Schistosoma mansoni	022	7,28	001	0,33	018	5,96
Taenia sp	002	0,66	–	–	001	0,32
Hymenolepis nana	003	0,99	–	–	002	0,66
Hymenolepis diminuta	001	0,33	–	–	001	0,33

** Teste Qui-quadrado p = 0,000*

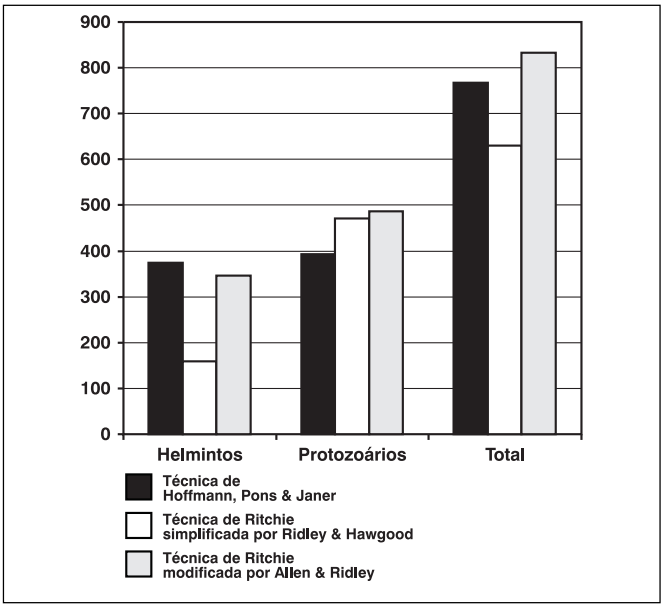


FIG. 1 - Análise das 302 amostras estudadas e relacionadas por métodos e pela freqüência de helmintos e protozoários encontrados.

TABELA III
Freqüência de diferentes espécies de protozoários em 302 amostras analisadas por diferentes métodos

Protozoários (cistos)	Métodos					
	Hoffman, Pons & Janer (sedimentação espontânea)		Ritchie simplificado por Ridley & Hawgood		Ritchie modificado por Allen & Ridley	
	Freqüência	%	Freqüência	%	Freqüência	%
Endolimax nana	182*	60,26	239	79,13	238*	78,80
Entamoeba coli	128	42,38	132	43,70	138	45,69
Entamoeba histolytica	041	13,57	056	18,54	058	19,20
Iodamoeba butschlii	013	4,30	013	4,30	013	4,30
Giardia lamblia	023	7,61	035	11,58	034	11,25
Chilomastix mesnili	006	1,98	006	1,98	006	1,98

** Teste Qui-quadrado p = 0,000*

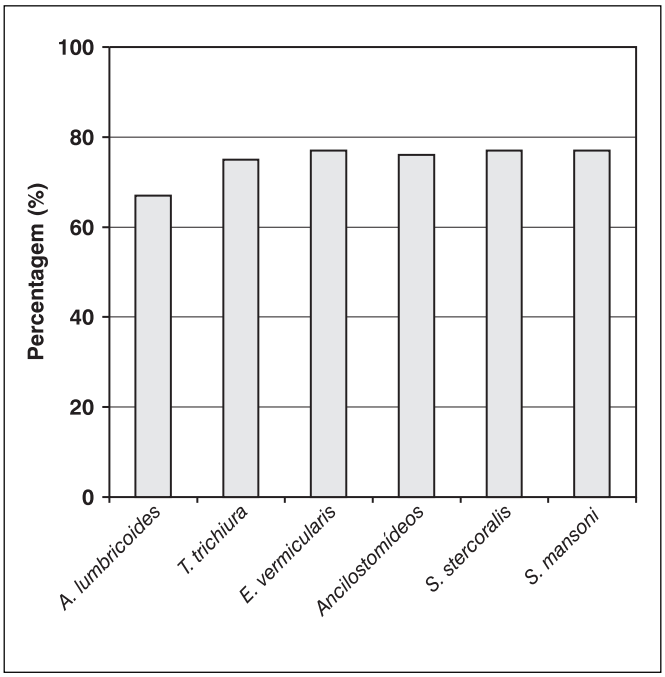


FIG. 2 - Helmintos que não foram diagnosticados pelo método de Ritchie simplificado em 302 amostras de fezes analisadas em comparação com o método da sedimentação espontânea.

mais sensíveis do que a sedimentação espontânea (Tabela I e Figura 1), principalmente para a pesquisa de *Endolimax nana* (P = 0,000; Teste Qui-quadrado, Tabela III).

DISCUSSÃO

Segundo Allen & Ridley (1970), o Método de Ritchie simplificado (1956) tem sido amplamente adotado em laboratórios para pesquisa de ovos, larvas de helmintos e cistos de protozoários. No entanto, o método é insatisfatório para pesquisa de ovos de helmintos, principalmente de *Ascaris lumbricoides*, *Taenia* sp e *Schistosoma* sp. Além do mais, Cerqueira & Barreto (1993) demonstraram também a ineficácia deste método para o diagnóstico das helmintoses e ressaltam a sua grande eficiência para pesquisa de cistos de protozoários, em comparação a outras técnicas utilizadas na rotina de um laboratório clínico. Allen & Ridley (1970) fizeram modificações no Método de Ritchie, demonstrando a elevada sensibilidade deste método modificado para pesquisa de ovos e larvas de helmintos.

Neste estudo foi confirmado que o método de Ritchie simplificado é ineficaz para diagnóstico da helmintíase, ficando em média 74.8 % das amostras contaminadas com *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, Ancilostomídeos, *Strongyloides stercoralis*, e/ou *Schistosoma mansoni*, não diagnosticadas (Figura 2). Por outro lado, a aplicação do método de Ritchie modificado, no diagnóstico parasitológico, demonstra elevada sensibilidade quando comparado com o método de sedimentação espontânea. Assim, a ligeira diminuição da freqüência total de helmintos demonstrada no método de Ritchie modificado compensa pela também ligeira elevação da freqüência total dos protozoários, podendo, então, este método ser utilizado para diagnóstico de rotina em laboratórios clínicos, como já se aplica na Escola de Higiene e Medicina Tropical de Londres (Allen & Ridley, 1970), por ser um método sensível, de baixo custo, rápido e de fácil execução.

CONCLUSÕES

1. A utilização do método de Ritchie modificado melhora sensivelmente a pesquisa de ovos e larvas de helmintos, quando comparada com o método de Ritchie simplificado (Figura 1);

2. A aplicação do método de Ritchie modificado resulta em um ligeiro decréscimo na freqüência total dos helmintos, nas amostras analisadas, quando comparado com o método de sedimentação espontânea. No entanto, o diagnóstico para cada espécie não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$, Tabela II);

3. A aplicação do método de Ritchie modificado comparado com o método de sedimentação espontânea resulta em elevação na freqüência total dos protozoários, nas amostras analisadas. Este aumento se reflete na significativa sensibilidade do método de Ritchie modificada para o diagnóstico da *Endolimax nana* ($p < 0,000$, Tabela III);

4. Para a pesquisa de protozoários, o método de Ritchie simplificado apresenta resultados semelhantes ao método de Ritchie modificado. No entanto, é um método pouco sensível para pesquisa de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e Ancilostomídeos (Tabela II);

5. O método de Ritchie modificado pode substituir o método da Sedimentação espontânea, comumente utilizado na rotina dos laboratórios de Parasitologia Clínica, sem perda da sensibilidade do diagnóstico.

REFERÊNCIAS

1. **Allen, A. V. H.; Ridley, D. S.** Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites**.** *Journ. Clin. Pathol.*, 23(6):545-546, 1970.
2. **Cerqueira, E. J.L.; Barreto, R. O.** Avaliação da eficácia de três métodos no diagnóstico de parasitoses intestinais. *Rev. Bras. Anal. Clín.*, 25(3):85-86, 1993.
3. **Hoffman, W. A.; Pons, J. A.; Janer, J. L.** The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. *J. Pub. Health Trop. Med.*, 9:281-298, 1934.
4. **Lutz, A.** O Schistosoma mansoni e a schistosomose segundo observações feitas no Brasil. *Rev. Inst. Oswaldo Cruz*, 11:121-144, 1919.
5. **Ridley, D.S.; Hawgood, B. C.** The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova**.** *Journ. Clín. Path.*, 9(1):74-76, 1956.
6. **Ritchie, L. S.** An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull. U.S. Army Med. Dep.*, 8:326, 1948.

Endereço para correspondência:
Prof. Elúzio J. L. Cerqueira
Faculdade de Farmácia / Universidade Federal da Bahia
Campus Universitário de Ondina
Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina
40.170-290. Salvador, Bahia - Tel: 332-1580, Fax: 235-9350
E-mail: eluzio@ufba.br