

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

- Anemia ferropriva e β -talassemia heterozigota: aspectos laboratoriais e diagnóstico diferencial ... 51**
 Marcos K. Fleury; Nilma Porto Gusmão; Tatiana Magioli Coelho Silva & Gizela Xavier Vieira
 Iron deficiency anemia and β -thalassemia minor: laboratorial aspects and differential diagnostic
- Prevalência de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* produtoras de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) em pacientes do Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS 55**
 R. C. V. Santos; J. L. Hoerlle; A. R. C. Aquino & R. N. Moresco
 Prevalence of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* producers Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) in patients from Divina Providencia Hospital, Porto Alegre, RS
- Identificação e teste de susceptibilidade a drogas de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes provenientes de Hospital Público de Referência, Goiânia/GO 59**
 Márcia Alves Vasconcelos Rodrigues; Maria Cláudia D. P. Borges André; Suely Lemes de Alves; Marieta Pereira M. Souza; André Kipnis & Álvaro Bisol Serafini
 Identification and drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients at the Public Reference Hospital, Goiânia, Goiás
- Diagnóstico precoce de carcinoma de próstata: Antígeno Prostático Específico (PSA) - um marcador quase ideal 63**
 N. A. B. Corrêa; G.F.M. Costa; E. M. Massambani; F. H. Matumoto & M. M. M. Paula
 A precocious diagnosis of prostate carcinoma: prostate specific antigen (PSA) - an almost ideal marker
- Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das infecções por *Clostridium difficile* 65**
 Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva & Caio Roberto Salvino
 Clinical, epidemiological and laboratorial aspects of *Clostridium difficile* infections
- Adaptação dos métodos da contagem na gota e da alça calibrada para a contagem de lactobacilos e estreptococos do grupo mutans da saliva 73**
 Celso Luiz Cardoso; Andréia Guerra; Márcio Guilhermetti; Maria Cristina Bronharo Tognim & Lourdes Botelho Garcia
 Adaptation of drop-plate and calibrated loop methods for enumerating lactobacilli and mutans streptococci group of saliva
- Infecções urinárias por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes cateterizados na Clínica Urológica da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza - Ceará 77**
 Everardo Albuquerque Menezes; Joquibede dos Santos Brasil; Maria Valdenir Abreu de Paula Rocha; Maria do Socorro de Sena Andrade; Maria Neuman Ricarte Monteiro; Márcio de Souza Cavalcante & Francisco Afrânio Cunha
 Urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* through catheter in patients from the urology clinic of Santa Casa de Misericórdia Hospital at Fortaleza - Ceará
- Meningite por *Listeria monocytogenes* em Campina Grande - Paraíba, Brasil: relato de um caso ... 81**
 Raíssa Mayer Ramalho Catão; Wellington Afonso Vigolovino; Wellington Torres Andrade & Ernesto Hofer
 Meningitidis by *Listeria monocytogenes* in Campina Grande - Paraíba, Brazil: a case report
- Relação entre a ocorrência de parasitas intestinais e sintomatologia observada em crianças de uma comunidade carente de Cidade Nova, em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil 85**
 Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino; Júlia Fernandes de Lima Nunes & Edna Marques de Araújo Silva
 Relation observed between the occurrence of intestinal parasites and symptomatology in children from Cidade Nova community wanting in Natal city - Rio Grande do Norte State, Brazil
- Adesinas, hemolisinas e hemaglutininas em amostras uropatógenicas de *Escherichia coli* 89**
 Rosália Rubel & Ana Lúcia Nicastri
 Adhesins, hemolysins and hemagglutinins in *Escherichia coli* uropathogenic samples
- Importância do Fator Antinuclear (FAN) em pacientes com Artrite Reumatóide Juvenil (ARJ) 93**
 Leila Monte Pires; Adélia Fernandes Vieira de França; Danielle Folador Guimarães; Antônio Sérgio da Fonseca; Valéria Soraya de Farias Sales; Janaina Cristiana de Oliveira Crispim
 Significance of Antinuclear Antibodies (ANA) in Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA)
- HPV - Relato de um caso clínico 97**
 C. Filippin; F. M. Hamada & C. L. Vituri
 HPV - a case report
- Presença de ovos de helmintos em hortaliças fertilizadas com lodo de lagoa de estabilização 101**
 João Bezerra de Carvalho; Elmiro Rosendo do Nascimento; Vinicius Rezende Ribeiro; José Firmino Nogueira Neto; Isabela Sgarbi de Carvalho; Fabiano Sgarbi de Carvalho; Leonardo Sgarbi de Carvalho & Juliana Sgarbi de Carvalho
 Presence of the helminths eggs in vegetables fertilized with stabilization lake sludge

Emais...

Temas Livres do XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas • 2003
 e do III Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

2

VOLUME 35

2003

Anemia ferropriva e β -talassemia heterozigota: aspectos laboratoriais e diagnóstico diferencial*

Iron deficiency anemia and β -thalassemia minor: laboratorial aspects and differential diagnostic

Marcos K. Fleury¹; Nilma Porto Gusmão²; Tatiana Magioli Coelho Silva³ & Gizela Xavier Vieira⁴

RESUMO – As anemias microcíticas e hipocrômicas consistem nas anemias mais freqüentes em todo o mundo. Esta alta incidência deve-se, principalmente, a anemia ferropriva e a β -talassemia heterozigota. Desta forma, em regiões onde essas duas formas de anemia estão presentes, o correto diagnóstico torna-se imprescindível. Várias regras foram propostas para a realização do diagnóstico diferencial, entretanto, nenhuma delas mostrou-se completamente confiável para um diagnóstico preciso. O conhecimento das características de cada uma dessas doenças certamente facilitará o diagnóstico diferencial. A análise dos resultados do hemograma, das dosagens bioquímicas e da eletroforese, em conjunto, é necessária para um diagnóstico diferencial definitivo.

PALAVRAS-CHAVE – Anemia ferropriva, beta talassemia heterozigota, diagnóstico diferencial.

SUMMARY – The hypochromic microcytic anemias are the most common type of anemia worldwide. This high prevalence is due, mainly, to iron deficiency anemia and β -thalassemia minor. In regions where these types of anemia are present, the accurate diagnostic became an important tool. Some proposed rules could separate iron deficiency from thalassemia minor, however none of these rules seems completely reliable for distinguishing these two diseases. The study of the laboratorial characteristics of each kind of anemia will allow the differential diagnostic. The analysis of the hematological and biochemical parameters with the electrophoretic pattern is necessary to a precise diagnostic.

KEYWORDS – Iron deficiency anemia, thalassemia minor, differential diagnostic.

INTRODUÇÃO

As anemias representam uma das doenças hematológicas mais freqüentemente enfrentadas pelos profissionais de saúde tanto nos consultórios médicos como nos laboratórios de análises clínicas. Dentre as diversas formas de apresentação desta patologia, as classificadas como microcíticas e hipocrômicas são, sem sombra de dúvida, as formas de anemia mais prevalentes. Fazem parte desta classe de anemias duas das anemias mais comuns no mundo: a anemia ferropriva e a β -talassemia.

Anemia ferropriva

A deficiência de ferro é, isoladamente, a mais comum das deficiências nutricionais no mundo. Estimativas recentes situam em pelo menos 2 bilhões o número de pessoas portadoras dessa deficiência^{2,3}. A deficiência de ferro pode ser causada pelo aumento das necessidades, diminuição da absorção ou ambos. A deficiência de ferro é bastante comum nos primeiros dois anos de vida devido à dieta, geralmente inadequada para a demanda de um crescimento rápido⁴. Meninas durante a adolescência, podem tornar-se ferroprivas devido a dieta inadequada associada a perda menstrual. O crescimento rápido observado nos meninos adolescentes pode levar a um estado de eritro-

poese ferro-deficiente⁵. Em homens a causa mais freqüente é a perda crônica pelo trato gastrointestinal e, nas mulheres jovens, a perda menstrual e a gravidez podem ser consideradas como principais causas⁶.

Outras causas de anemia podem ser consideradas, porém em menor freqüência: gastrectomia, síndromes de má absorção, verminoses com grande infestação etc.

Além dos sinais e sintomas usuais observados nos estados anêmicos como palidez, língua lisa e cansaço, alguns sinais aparecem especificamente nos casos de anemia ferropriva: perversão do apetite (desejo de comer terra ou gelo), ulcerações nos cantos da boca e glossite. Embora este último não seja específico de carência de ferro.

O quadro clássico de um paciente com anemia ferropriva apresenta anemia com microcitose (VGM de 50 a 79 fl) e hipocromia (HGM de 21 a 29 pg), anisocitose e poiquilocitose em graus variados. Níveis baixos de ferro sérico e ferritina e altos níveis de capacidade total de combinação ao ferro. Níveis de ferritina abaixo de 12 ng/ml são diagnósticos de anemia ferropriva⁷.

Talassemia beta

A talassemia beta resulta de mutações que causam uma menor produção de RNAm e, conseqüentemente, menor síntese de globina beta.

Recebido em 15/1/2003

Aprovado em 18/2/2003

*Trabalho realizado no Laboratório de Hemoglobinas - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

¹Prof. Adjunto Hematologia - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ;

²Farmacêutica Bioquímica - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ;

^{3,4}Estagiárias - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

Em muitas partes do mundo, a frequência de β -talassemia é muito alta, sendo a segunda causa de microcitose e hipocromia entre os povos asiáticos e mediterrâneos (italianos, gregos, turcos etc.), todos com grandes colônias no Brasil^{8,9}.

Existem dois tipos de talassemia beta: uma com produção reduzida de cadeias beta (β^+) e outra que não apresenta nenhuma síntese de cadeias beta (β^0). Os pacientes com beta talassemia tipo β^+ tem sua síntese de cadeias beta diminuída de 3 a 10 vezes. Em pacientes com β -talassemia tipo β^0 a síntese de cadeias beta está ausente^{2,6}.

Os pacientes com somente um dos genes β afetados (heterozigotos) cursam clinicamente bem. As pessoas com dois genes afetados são freqüentemente referidos como homozigotos. Embora esta terminologia seja comumente aceita, ela não é geneticamente acurada. A heterogeneidade das β -talassemias é tão grande que indivíduos chamados de homozigotos são na verdade duplo heterozigotos para diferentes tipos de genes β -talassêmicos. A verdadeira homozigose é encontrada quase que exclusivamente em áreas geográficas isoladas onde casamentos consanguíneos são freqüentes.

A deficiência seletiva de uma ou mais cadeias polipeptídicas tem duas conseqüências imediatas: a diminuição da síntese de hemoglobina e o desbalançamento da produção de cadeias α e não- α . A primeira é a maior causa de hipocromia e é também responsável pela eritrocitose observada nos heterozigotos, porém de pouca importância clínica. A síntese desbalanceada de cadeias tem efeitos mais graves. Na ausência de cadeias de globina complementares as cadeias cuja síntese é normal formam agregados, precipitam no citoplasma, lesam as membranas celulares e levam à destruição prematura da célula^{2,6}.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 54 pacientes com idades variando de 1 a 66 anos, atendidos no Laboratório de Hemoglobinas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de abril de 2000 a novembro de 2001.

Os parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM, CHGM, RDW e reticulócitos) foram determinados em um contador eletrônico CELL-DYN 1700 (Abbott). As dosagens de ferro sérico e capacidade total de combinação foram realizadas segundo a metodologia de Goodwin modificada (Labtest Diagnóstica). As eletroforeses em acetato de celulose foram realizadas em equipamento Shandon Southern SAE 2761 usando-se fitas de 2,5×14,0cm cellogel (Chemetron)¹⁰. As dosagens de hemoglobina A2 foram realizadas segundo Naoum usando-se o método da eluição e as dosagens de hemoglobina Fetal segundo os métodos de Betke (valores até 4%) ou Singer (valores cima de 4%)¹¹.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo ferroprivo – composto por 26 pacientes (média de idade = 15,1 anos), sendo 8 (30,8%) do sexo masculino e 18 (69,2%) do sexo feminino e grupo talassêmico – composto por 28 pacientes (média de idade = 26,8 anos), sendo 18 (64,3%) do sexo masculino e 10 (35,7%) do sexo feminino (Tabela I).

Para a comparação estatística entre os grupos ferroprivo e talassêmico foram considerados um grupo de crianças e um grupo de adultos. O grupo de crianças é composto de 25 indivíduos com idades variando de 1 a 13 anos. O grupo de adultos conta com 29 indivíduos com idades de 14 a 66 anos^{12,13}.

Foram considerados talassêmicos os pacientes apresentando microcitose e hipocromia com valores normais de ferro sérico e dosagem de hemoglobina A2 acima de 3,8%. O grupo de ferroprivos foi composto por pacientes que apresentassem valores de ferro sérico abaixo de 50 mg%, que fossem microcíticos e hipocrômicos e com dosagens de Hb A2 inferiores a 3,8.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico *Epi Info - version 6.04d (January 2001) Center of Disease Control, Epidemiology Program Office, Atlanta, Georgia*. Os valores de "p" foram calculados usando-se os seguintes métodos: Teste de Bartlett para homogeneidade da variância e o Teste de Kruskal-Wallis, equivalente ao teste de qui-quadrado, para tabelas contendo até 250 células.

RESULTADOS

Os resultados obtidos em relação aos parâmetros hematológicos nos grupos ferroprivo e talassêmico estão apresentados na Tabela II, que mostra os valores mínimos e máximos observados em cada parâmetro, as médias e os desvios-padrão em cada um dos grupos.

As médias obtidas em relação aos valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM, CHGM, RDW e reticulócitos, foram estudadas comparando-se os grupos de ferroprivos e talassêmicos segundo a faixa etária (adultos e crianças). Os resultados estão apresentados analisando-se a totalidade dos pacientes (n = 54), o grupo de crianças (n = 25) e o grupo de adultos (n = 29) (Tabelas III, IV e V).

Os valores de ferro sérico observados nos grupos estudados foram os seguintes: grupo ferroprivo 34,51 ± 12,34 mg/dl e grupo talassêmico 104, 53 ± 34,67 mg/dl.

DISCUSSÃO

O diagnóstico diferencial das anemias consiste em um tema de grande importância na prática clínica e laboratorial, especialmente as anemias com características microcíticas e hipocrômicas. Neste sentido, estudos mais pormenorizados das patologias pertencentes a este grupo contribuem para o melhor entendimento e, conseqüentemente, maior facilidade no diagnóstico da anemia ferropriva e da β -talassemia heterozigota.

Quando a deficiência de ferro é intensa, geralmente não existe dificuldade no diagnóstico diferencial. Uma história clínica relacionando a anemia a uma das principais causas de ferropenia, de acordo com a faixa etária, é facilmente confirmada. A palidez é aparente e o exame da distensão sangüínea mostra microcitose e hipocromia sem a presença de policromatofilia. Embora este quadro seja bastante característico, existem outras patologias que podem ser confundidas no momento do diagnóstico, particularmente a talassemia beta heterozigota.

TABELA I
Características da população analisada

		Anemia ferropriva	β -Talassemia heterozigota	Total
Nº de indivíduos		26	28	54
Sexo	Masculino	8 (30,8%)	18 (69,2%)	26 (48,1%)
	Feminino	18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (51,9%)
Média de idade (anos)		15,1	26,8	21,1

TABELA III
Comparação dos parâmetros hematológicos entre os grupos ferroprivo e talassêmico na amostra total (n = 54)

		Média	S	p
Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	Talassemia	5,51	0,80	0,000002
	Ferropriva	4,62	0,58	
Hemoglobina (g/dl)	Talassemia	11,34	1,66	0,004656
	Ferropriva	10,13	1,72	
Hematócrito (%)	Talassemia	35,12	4,96	0,001004
	Ferropriva	31,18	4,88	
VGM (fl)	Talassemia	64,07	6,42	0,081390
	Ferropriva	67,91	10,35	
HGM (pg)	Talassemia	20,73	2,59	0,075519
	Ferropriva	22,06	3,80	
CHGM (%)	Talassemia	32,37	1,19	0,966141
	Ferropriva	32,30	1,45	
RDW (%)	Talassemia	16,34	1,41	0,116533
	Ferropriva	17,41	2,76	
Reticulócitos (%)	Talassemia	1,43	0,83	0,002325
	Ferropriva	0,91	0,66	

TABELA V
Comparação dos parâmetros hematológicos entre os grupos ferroprivo e talassêmico no grupo de adultos (n = 29)

		Média	S	p
Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	Talassemia	5,69	0,57	0,000121
	Ferropriva	4,56	0,50	
Hemoglobina (g/dl)	Talassemia	11,68	1,46	0,100428
	Ferropriva	10,32	2,10	
Hematócrito (%)	Talassemia	36,50	4,31	0,109566
	Ferropriva	32,73	5,81	
VGM (fl)	Talassemia	64,06	4,99	0,038300
	Ferropriva	71,45	11,15	
HGM (pg)	Talassemia	20,44	1,79	0,077655
	Ferropriva	22,73	3,98	
CHGM (%)	Talassemia	32,06	0,80	0,178282
	Ferropriva	31,36	1,29	
RDW (%)	Talassemia	16,23	1,01	0,430797
	Ferropriva	17,02	2,57	
Reticulócitos (%)	Talassemia	1,66	0,88	0,001367
	Ferropriva	0,73	0,39	

O diagnóstico morfológico desta condição deve, sempre, ser confirmado por outros meios, pois o diagnóstico presuntivo de anemia ferropriva baseado somente nos dados do hemograma é, freqüentemente, incorreto¹⁴. As patologias, caracterizadas por microcitose e hipocromia, são indistinguíveis com base na

TABELA II
Parâmetros hematológicos apresentados na amostra estudada (n = 54)

		Valores	Média	S
Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	Talassemia	2,63 a 6,46	5,51	0,80
	Ferropriva	3,50 a 5,93	4,616	0,58
Hemoglobina (g/dl)	Talassemia	6,5 a 15,0	11,34	1,66
	Ferropriva	5,4 a 13,0	10,13	1,72
Hematócrito (%)	Talassemia	19,0 a 45,0	35,12	4,96
	Ferropriva	18,0 a 41,0	31,18	4,88
VGM (fl)	Talassemia	55 a 79	64,07	6,42
	Ferropriva	56 a 92	67,91	10,30
HGM (pg)	Talassemia	17 a 28	20,73	2,59
	Ferropriva	14 a 30	22,06	3,80
CHGM (%)	Talassemia	30 a 35	32,37	1,19
	Ferropriva	29 a 35	32,30	1,45
RDW (%)	Talassemia	13,7 a 20,1	16,34	1,41
	Ferropriva	12,6 a 24,3	17,41	2,76
Reticulócitos (%)	Talassemia	0,3 a 3,9	1,43	0,83
	Ferropriva	0,3 a 3,4	0,91	0,66

TABELA IV
Comparação dos parâmetros hematológicos entre os grupos ferroprivo e talassêmico no grupo de crianças (n = 25)

		Média	S	p
Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	Talassemia	5,54	0,64	0,010707
	Ferropriva	4,75	0,59	
Hemoglobina (g/dl)	Talassemia	11,2	1,44	0,048801
	Ferropriva	9,93	1,61	
Hematócrito (%)	Talassemia	34,50	3,31	0,012772
	Ferropriva	30,13	4,36	
VGM (fl)	Talassemia	62,90	8,70	0,911443
	Ferropriva	64,00	10,58	
HGM (pg)	Talassemia	20,70	3,62	0,955507
	Ferropriva	20,93	4,08	
CHGM (%)	Talassemia	32,70	1,64	0,931942
	Ferropriva	32,667	1,45	
RDW (%)	Talassemia	16,21	1,68	0,107359
	Ferropriva	18,18	2,96	
Reticulócitos (%)	Talassemia	1,05	0,63	0,468264
	Ferropriva	1,02	0,80	

morfologia eritrocitária e nos índices hematimétricos quando considerados isoladamente.

Algumas regras foram propostas com o objetivo de diferenciar a β -talassemia da anemia ferropriva. No entanto, nenhuma destas regras, mostraram-se completamente confiáveis para um diagnóstico diferencial preciso. Desta forma, uma análise do conjunto de resultados de cada paciente deve ser considerado antes do diagnóstico definitivo.

Por causa da anisocitose presente, já nos estágios mais precoces da anemia ferropriva, a observação da variação do tamanho dos eritrócitos, (RDW), foi proposta como meio de diagnóstico diferencial. Seriam esperados valores de RDW menores na β -talassemia devido a maior uniformidade de tamanho das hemácias. Entretanto, os valores do RDW estão freqüentemente aumentados nestes casos, principalmente na-

queles acompanhados de reticulocitose. Sendo assim, o diagnóstico diferencial não deve ser realizado com base somente nestes valores^{2,15}.

Os resultados obtidos neste estudo não mostram diferenças estatisticamente significativas quando comparamos os valores de RDW obtidos nos grupos ferroprivo (17,41 ± 2,76 %) e talassêmico (16,34 ± 1,41%). Os resultados mostram-se de acordo com a literatura, mesmo quando comparamos este parâmetro dentro de cada uma das faixas etárias: grupo total (p = 0,116533); grupo de crianças (p = 0,107359) e grupo de adultos (p = 0,430797).

A reticulocitose, a policromatofilia e o ponteadado basófilo são encontrados, na β -talassemia e não nos casos de anemia ferropriva. No entanto, a presença, embora freqüente, destas características nos casos de talassemia, podem estar ausentes em alguns pacientes, inviabilizando esta característica como capaz de diferenciar as duas patologias^{2,13}.

Entretanto, os dados aqui apresentados mostram que diferenças significativas entre os grupos ferroprivo (0,91 ± 0,66%) e talassêmico (1,43 ± 0,83%) foram observadas em relação à contagem de reticulócitos no grupo total (p = 0,002325) e no grupo de adultos (p = 0,001367).

O grupo de crianças não apresentou diferença significativa entre ferroprivos e talassêmicos (p = 0,468264). Este fato talvez possa ser explicado pela grande variabilidade dos parâmetros hematológicos em crianças entre 0 e 4 anos.

A presença de β -talassemia heterozigota é classicamente diagnosticada por um quadro de microcitose e hipocromia, níveis de ferro sérico e ferritina normais e um aumento relativo dos níveis de hemoglobina A2. A deficiência de ferro pode mascarar a presença de β -talassemia associada. As quantidades de hemoglobina A2 estarão diminuídas nestes casos tornando o diagnóstico inviável. Os níveis de ferro sérico devem ser corrigidos para então ser realizada uma nova dosagem que resultará no diagnóstico¹⁴.

A adoção dos valores de VGM e da contagem de hemácias como critérios de diferenciação entre a anemia ferropriva e a talassemia beta heterozigota, pode ser utilizada em populações onde as freqüências destas patologias sejam semelhantes. Entretanto em regiões onde a anemia ferropriva é mais prevalente do que a talassemia heterozigota, o uso destes critérios pode resultar num excessivo número de erros diagnósticos^{16,17,18,19}.

Os valores das contagens de hemácias obtidas neste trabalho mostram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de ferroprivos e talassêmicos quando consideramos a população total (p = 0,000002), o grupo de crianças (p = 0,010707) e o grupo de adultos (p = 0,000121). Esta diferença ratifica os achados da literatura que descrevem a eritrocitose em casos de talassemia. Embora o Brasil esteja incluído entre as regiões de alta freqüência da anemia ferropriva, e este fato possa levar a erros diagnósticos, a presença de eritrocitose em casos de anemia microcítica e hipocrômica sugere fortemente o diagnóstico de β -talassemia heterozigota.

O VGM, quando usado isoladamente, não se mostrou como um parâmetro de interesse para o diagnóstico diferencial na população analisada. A comparação entre os grupos ferroprivo (67,91 ± 10,35 fl) e ta-

lassêmico (64,07 ± 6,42 fl) não apresentou resultados significativos na população total (p = 0,081390) e no grupo de crianças (p = 0,911443). Apenas o grupo de adultos apresentou diferença significativa (p = 0,038300), mostrando média de VGM mais baixa no grupo de talassêmicos.

Uma observação interessante que pode ser feita durante a análise dos grupos ferroprivo e talassêmico é a de que nos casos de β -talassemia encontramos valores de VGM muito baixos mesmo em pacientes com níveis de hemoglobina normal ou pouco abaixo do normal (Hb = 11,34 ± 1,66 g/dl). Já no grupo ferroprivo notamos que valores muito baixos de VGM estão associados a pacientes com níveis de hemoglobina bem abaixo do normal (Hb = 10,13 ± 1,72).

Estas características ratificam dados empíricos que apontam a talassemia heterozigota como sendo uma anemia microcítica e hipocrômica, com valores de VGM muito baixos, níveis de hemoglobina pouco diminuídos ou até mesmo normais e policromatofilia. Já a anemia ferropriva seria caracterizada como uma anemia microcítica e hipocrômica onde quanto maior a anemia maior a microcitose com ausência de policromatofilia.

REFERÊNCIAS

1. **United Nations, Administrative Committee on Coordination-Subcommittee on Nutrition.** *Second Report on the World Nutrition Situation.* Geneva, Switzerland. 40-48, 1992.
2. **Williams.** *Clinical Hematology.* 6th edition. New York. McGraw & Hill, Inc. 447, 2001.
3. **Siimes, M.; Salmenperä, L.; Perheentupa, J.** Exclusively breastfeeding for nine months: risk of iron deficiency. *J. Pediatr.* 104:196-199, 1984.
4. **Iron deficiency in infancy and childhood.** *A report of the International Nutritional Anemia Consultative Group.* New York: The Nutrition Foundation, 1979.
5. **Lønnerdal, B.; Dewey, K. G.** Deficiência de ferro no lactente e na criança. Epidemiologia da deficiência de ferro no lactente e na criança. Program in International Nutrition, Department of Nutrition, University of California, Davis, CA 95616, EUA. *Anais Nestlé:* 52, 1996.
6. **Wintrobe's Clinical Hematology.** 10th Edition, Baltimore. Williams & Wilkins, 1999.
7. **Naoum, P. C.; Alvarez, F.; Domingos, C. R. B.; Ferrari, F.; Moreira, H. W.; Sampaio, Z. A.; Maziero, P. A.; Castilho, E. M.** Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 23(3):68-79b, 1987.
8. **WHO.** *Update of the progress of haemoglobinopathies control. Report of 3rd and 4th Annual Meeting of the WHO Working Group of the Community Control of Hereditary Anemias,* Bangkok, 1985.
9. **Marengo-Rowe, A. J.** Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J. Clin. Path.* 18:790-96, 1965.
10. **Naoum, P. C.; Alvarez, F.; Domingos, C. R. B.; Ferrari, F.; Moreira, H. W.; Sampaio, Z. A.; Maziero, P. A.; Castilho, E. M.** Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 23(3):68-79, 1987.
11. **Wallach, J.** Interpretation of diagnostic tests. Little Brown: Boston, 1983.
12. **Dacie, J. D.; Lewis, S. M.** *Hematologia prática.* Barcelona. Ediciones Torray, 1970.
13. **Hoffman, R.; Benz, E. J.; Shattil, S. J.; Furie, B.; Cohen, H. J.; Silberstein, L. E.; McGlave, P.** *Hematology. Basic principles and practice.* Churchill Livingstone, Philadelphia, 3rd Ed. 516-517, 2000.
14. **Cartei, G.; Chisesi, T.; Cazzavillan, M.; Battista, R.; Barbui, T.; Dini, E.** Relationship between Hb and Hb A2 concentrations in beta-thalassaemia trait and effect of iron deficiency anemia. *Biomedicine.* 25:282, 1976.
15. **Han, P.; Fung, K. P.** Discriminant analysis of iron deficiency anaemia and heterozygous thalassaemia traits: a 3-dimensional selection of red cell indices. *Clin. Lab. Haematol.* 13:351, 1991.
16. **Junca, J.; Flores, A.; Roy, C.; Alberti, R.; Milla, F.** Red cell distribution width, free erythrocyte protoporphyrin, and England-Fraser index in the differential diagnosis of microcytosis due to iron deficiency or beta-thalassaemia trait. A study of 200 cases of microcytic anemia. *Hematol. Pathol.* 5:33-37, 1991.
17. **England, J. M.; Walord, D. M.; Waters, D. A. W.** Reassessment of the reliability of the hematocrit. *Br. J. Haematol.* 23:247-249, 1972.
18. **Lin, C. K.; Lin, J. S.; Chen, S. Y.; Jiang, M. L.; Chiu, C. F.** Comparison of hemoglobin and red blood cell distribution width in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:1030-1032, 1992.

Endereço para correspondência
Dr. Marcos Kneip Fleury
CP 68.000/RJ – 21941-590
E-mail: fleury@pharma.ufrj.br

Prevalência de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* produtoras de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) em pacientes do Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS*

Prevalence of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* producers Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) in patients from Divina Providencia Hospital, Porto Alegre, RS

R. C. V. Santos; J. L. Hoerlle; A. R. C. Aquino & R. N. Moresco

RESUMO – As β -Lactamases de Amplo Espectro (ESBL) produzidas, principalmente, por *Klebsiella* sp. e *E. coli*, constituem um problema cada vez mais comum e com sérias conseqüências terapêuticas. As ESBL são enzimas que conferem resistência às Cefalosporinas de amplo espectro, como a Cefotaxima, Ceftriaxona e Ceftazidima, e ao monobactâmico Aztreonam. Foram estudadas 88 amostras de isolados clínicos, provenientes de pacientes internados no Hospital Divina Providência, de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, durante o período de abril de 2001 a junho de 2002. Realizou-se o teste de triagem e o teste confirmatório através dos critérios padronizados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*. Os testes confirmatórios da produção destas enzimas foram executadas pela técnica da adição de Ácido Clavulânico ao disco de Ceftazidima. Foram caracterizadas no teste de triagem, 9 (10,2%) amostras suspeitas de serem produtoras de ESBL, sendo que 4 (4,5%) foram caracterizadas como produtoras de ESBL.

PALAVRAS-CHAVE – *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, ESBL, prevalência.

SUMMARY – Extended spectrum β -Lactamases (ESBL) produced by *Klebsiella* sp. and *E. coli* mainly, constitutes a common problem with serious therapeutical consequences. The ESBL are enzymes who confers resistance to extended-spectrum Cephalosporins as Cefotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime and Aztreonam. During april 2001 to June 2002, 88 isolated clinical samples were studied, from inpatients at the Divina Providência Hospital, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. The screen and confirmatory tests had been carried out in accordance with the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The production of these confirmatory enzymes tests, had been executed by Clavulanic acid addition to the Ceftazidime disk technique and 9 (10.2%) samples had been characterized in the screen test with suspicious to be producing ESBL and 4 (4.5%) had been characterized as producing ESBL.

KEYWORDS – *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, ESBL, prevalence.

INTRODUÇÃO

As β -Lactamases de Amplo Espectro (ESBL) são enzimas presentes em algumas células bacterianas, que conferem resistência às Cefalosporinas de amplo espectro, como a Cefotaxima, Ceftriaxona e Ceftazidima, e ao monobactâmico Aztreonam^{1,2,3}. Estas enzimas são mais freqüentemente encontradas em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, mas também podem estar presentes em *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* e outras espécies de *Enterobacteriaceae*^{4,5}.

A detecção dos organismos produtores destas enzimas pode ser de difícil realização quando se utiliza a concentração inibitória mínima (MIC) ou a técnica de difusão de discos, uma vez que a presença de ESBL

na célula bacteriana pode não produzir uma resistência fenotípica.

Em 1998, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* descreveu testes de triagem que indicavam uma provável produção de ESBL em cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*⁶. Em 1999, o NCCLS adicionou o teste confirmatório, através da técnica de adição de Ácido Clavulânico ao disco de Ceftazidima, confirmando assim, um resultado de "Cepa Produtora de ESBL"⁷.

Esse estudo tem por objetivo determinar a prevalência de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* produtoras de β -Lactamases de Amplo Espectro (ESBL) em pacientes internados no Hospital Divina Providência (HDP) de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Recebido em 23/9/2002
Aprovado em 17/9/2002

*Trabalho desenvolvido no Laboratório Unidos de Pesquisas Clínicas - Unilab

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas 88 cepas isoladas de diversas amostras clínicas, provenientes de pacientes internados no Hospital Divina Providência de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, durante o período de abril de 2001 a junho de 2002. As amostras foram isoladas através da inoculação primária em ágar Mc Conkey e ágar Sangue (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Foi utilizada a coloração de Gram e posteriormente as *Enterobacteriaceas* isoladas foram identificadas pelo equipamento mini-API (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foram realizados testes de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos: Ampicilina, Cefalotina, Cefoxitina, Gentamicina, Amicacina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Sulfametoxazol-Trimetropim, Ampicilina-Sulbactam, Ciprofloxacina, Imipenem, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepime, Cefotaxima e Aztreonam (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England).

Teste de triagem para ESBL

Foram adotados os critérios recomendados pelo NCCLS (1998)⁶ onde são consideradas bactérias potencialmente produtoras de ESBL, quando houvesse um halo de inibição menor que: 25mm para para Ceftriaxona, 27mm para Aztreonam, 22mm para Ceftazidima e 27 mm para Cefotaxima.

Teste confirmatório para produção de ESBL

O teste confirmatório da produção destas enzimas foi realizado pela técnica da adição de ácido clavulânico ao disco de Ceftazidima. A adição de ácido clavulânico (Smith-Beecham Pharmaceuticals, Worthing, England), foi realizada de acordo com os critérios propostos pelo NCCLS (1999)⁷.

Controle de qualidade

Foi realizado o controle de qualidade através da utilização de cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Escherichia coli* ATCC 25922 (não produtora de ESBL) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (produtora de ESBL).

RESULTADOS

Em nossa amostragem foram caracterizadas, no teste de triagem para detecção de ESBL, 9 amostras potencialmente produtoras de ESBL (10,2%). Destas, 4 foram caracterizadas como produtoras de ESBL (4,5%). A Tabela I mostra o local de isolamento das cepas estudadas, correlacionando se a mesma é produtora ou não de β -lactamases.

A Tabela II apresenta as 9 cepas consideradas potencialmente produtoras de ESBL no teste de triagem, indicando o número de amostras realmente produtoras destas enzimas, através do teste de adição de ácido clavulânico ao disco de ceftazidima.

TABELA I
Sítios de isolamento de Bactérias, HDP, 2002.

Isolado	ESBL	Sítio				
		Sangue	Trato Respiratório	Trato Urinário	Outros	Total
<i>E. coli</i>	Produtor	1	-	-	-	1
	Não-Produtor	1	4	54	4	63
	Total	2	4	54	4	64
<i>K. oxytoca</i>	Produtor	-	-	-	-	-
	Não-Produtor	-	2	1	-	3
	Total	-	2	1	-	3
<i>K. pneumoniae</i>	Produtor	-	1	2	-	3
	Não-Produtor	-	7	4	-	11
	Total	-	8	6	-	14

TABELA II
Teste confirmatório para ESBL em 9 cepas positivas no teste de triagem, HDP, 2002

	ESBL		Total
	Positivo	Negativo	
<i>E. coli</i>	1	2	3
<i>K. oxytoca</i>	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	3	3	6
Total	4	5	9

Das cepas de *K. pneumoniae* isoladas, 21,4% (3/14), foram caracterizadas como produtoras de ESBL e das cepas de *E. coli* isoladas, 1,5% (1/64), foram positivas para a produção destas enzimas. Nenhuma das amostras de *K. oxytoca* foram produtoras de ESBL.

DISCUSSÃO

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos tem sido associado, em grande parte, à disseminação das ESBL. Além de gerar dados incorretos de prevalência, a ausência de detecção dessas enzimas nas amostras leva à utilização de uma terapêutica incorreta, acarretando graves conseqüências para a vida do paciente. A resistência bacteriana decorrente da produção de ESBL pode também ser induzida durante a terapêutica, criando-se um problema que independe do procedimento laboratorial adotado anteriormente^{1,2,9}.

Os resultados encontrados em nosso estudo não são coincidentes com os índices de positividade de cepas produtoras de ESBL em outros estudos no Brasil^{10,11,12,13,14}. As condições gerais do ambiente hospitalar, métodos e técnicas utilizadas na detecção das ESBL, podem dificultar uma avaliação comparativa dos diferentes estudos realizados no Brasil e no Rio Grande do Sul.

A frequência de organismos produtores de ESBL diferem significativamente pela localização geográfica⁸. O programa SENTRY reporta uma frequência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL de 45% na América Latina, contra 7% nos Estados Unidos. A frequência de *E. coli* produtora de ESBL em hospitais do programa SENTRY foi mais baixa, numa faixa de 1 a 8%⁹. Nos E.U.A. os índices foram 5% de *K. pneumoniae* e menos de 2% para *E. coli* produtoras de ESBL, enquanto que na Europa a prevalência foi de 15 a 20%^{16,17}. Em hospitais brasileiros é reportada a prevalência de 9%

de *E. coli* e 50% de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL¹⁵.

No Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, São Paulo, os índices de positividade para ESBL, variou de 29% para cepas de *K. oxytoca*, 6,6% em cepas de *K. pneumoniae* e de 1,6% para *E. coli*^{11,12}. Em João Pessoa, Paraíba, os índices foram mais baixos que os encontrados em nosso estudo, sendo 2% (11/545), o percentual geral de cepas produtoras de ESBL^{10,13}. Em Porto Alegre, local do nosso estudo, o índice de positividade encontrado por d'Azevedo *et al* (2001)¹⁴, foi de 54,0% (34/63) para *E. coli*, 70,0% (42/60) para *K. pneumoniae* e 18,2% (2/11) para *K. oxytoca*.

A prevalência de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* produtoras de β-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) em pacientes internados no Hospital Divina Providência de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, foi de 4,5%. É importante lembrar que o perfil de produção de β-lactamases em amostras de isolados clínicos é influenciado pela maneira como os antimicrobianos são rotineiramente utilizados em um determinado hospital ou região geográfica. Dessa forma, é importante que as instituições situadas na mesma ou em diferentes localidades façam avaliações regulares do perfil de produção de β-Lactamases, pois esses dados podem ser muito úteis na orientação da terapêutica e na avaliação de novos antimicrobianos a serem introduzidos no mercado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Doutores Hélio Silva Sader e José Rodrigues pela contribuição na pesquisa deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. **Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A.** More extended-spectrum β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1679-1704, 1991.
2. **Livermore, D. M.** β-lactamases in clinical laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiol. Rev.* 8:557-584, 1995.
3. **Medeiros, A. A.** Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated generations of β-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 24:S19-S45, 1997.
4. **Cormican, M. G. et al.** Detection of ESBL producing strain by the Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* 34:1880-1884, 1996.
5. **Coudron, P. E. et al.** Occurrence and detection of extended spectrum β-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: seek and you may find. *J. Clin. Microbiol.* 35:2593-2597, 1997.
6. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.* 8th informational supplement, M100-S8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1998.
7. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.* 9th informational supplement, M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1999.
8. **Einhorn, A. E. et al.** ESBL: frequency, risk factors and outcomes. *Pharmacotherapy.* 22(1):14-20 (2002).
9. **Winokur, P.; Jones, R. N.; Pfaller, M. A. et al.** Characterization of strains from Europe, North and Latin America and Western Pacific that express the ESBL phenotype: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-1999). Presented at the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, Canada, September 17-20, 2000.
10. **Honório, L. C.; Santos, I. B.; Assis, A. M. L.; Filho, L. S.** Análise do perfil de resistência de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas em João Pessoa, PB. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.* 33(4):179-182, 2001.
11. **Gomes, A. C. L. F.; Martinez, R.** Detecção de enterobactérias produtoras de ESBL em amostras de sangue, cateter e outros materiais biológicos de pacientes do hospital das clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP). Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia – de 21 a 25 de outubro de 2001 em Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Página 75.
12. **Gomes, A. C. L. F.; Martinez, R.** Prevalência e significado clínico de enterobactérias produtoras de ESBL em amostras de urina de pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP). Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia – de 21 a 25 de outubro de 2001 em Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Página 76.
13. **Santos, I. B.; Xavier, D. E.; Assis, A. M. L.; Filho, L. S.** Resistance profile of Enterobacteriaceae producing ESBL isolated in João Pessoa-PB. Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia – de 21 a 25 de outubro de 2001 em Foz do Iguaçu – PR, Brasil. Página 76.
14. **Evaluation of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test for ESBL production in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*.** Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia – de 21 a 25 de outubro de 2001 em Foz do Iguaçu – PR, Brasil. Página 76.
15. **Sader, H.; Gales, A. C.; Pfaller, M. A.; Mendes, R. E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R. N.** Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *B.J.I.D.* 5(4):200-214, 2001.
16. **Jones, R. N.; Pfaller, M. A.** Bacterial resistance: a worldwide problem. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 31:379-88, 1998.
17. **Babini, G. S.; Livermore, D. M.** Antimicrobial resistance among *Klebsiella* spp. Collected from intensive care unit in southern and western Europe in 1997-1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:183-9, 2000.

Endereço para correspondência

Roberto Christ Vianna Santos
Laboratório Unilab - Hospital Divina Providência
Rua da Gruta, 145 - 91712-160 - Porto Alegre, RS
Tel./Fax: (0xx51) 3318-4389
E-mail: rchrist@tutopia.com.br



2003 CLINICAL LAB EXPO

EXPOSIÇÃO – 20 a 24 de Julho, 2003 • SEMINÁRIOS- 22 a 24 de Julho, 2003

Filadelfia, Pensilvania - EUA



A Exposição de Laboratório Clínico 2003 é a sua oportunidade de conhecer mais de 600 expositores que oferecem produtos e serviços a laboratórios clínicos e pesquisa, além de fabricantes de produtos para laboratórios.

A exposição apresenta produtos e serviços para diversas áreas, incluindo:

- Eletrólitos • Toxicologia e TDM • Exames cardiológicos • Imunoensaios • Automatização e robótica • Testes endocrinológicos
- Enzimologia • Testes de câncer • Testes de glicose • Diagnóstico molecular • Informática • Hematologia e Hemostasia
- Análise de DNA • Farmacogenômica • Testes de doenças infecciosas e muito mais

O Consulado Americano promove anualmente este evento em parceria com os organizadores da feira AACC. Entre em contato conosco para efetuar com antecedência sua inscrição gratuita para a feira. Nos consulte para conhecer as agências credenciadas para este evento em sua região.

O International Business Center facilita o entrosamento.

O International Business Center fornece serviços especiais de assistência aos visitantes estrangeiros através do Programa de Compradores Internacionais, do Departamento de Comércio dos Estados Unidos e da AACC. Os serviços do IBC incluem reuniões pré-agendadas com empresas americanas que procuram parcerias no Brasil, além da identificação computadorizada de fornecedores de produtos selecionados por tipo de produto. O IBC possui salas de reuniões e auxílio de especialistas comerciais e intérpretes.

Para outras informações visite o site da AACC : www.aacc.org ou www.transmar.com.br

Contato no Consulado Americano
Jefferson Oliveira

fone: (0xx11)3897-4038 • E-mail: jefferson.oliveira@mail.doc.gov

Contato na Transmar Turismo
Evelyn / Micheline

fone: (0xx11)3255-3733 • eventos@transmar.com.br

Identificação e teste de susceptibilidade a drogas de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes provenientes de Hospital Público de Referência, Goiânia/GO*

Identification and drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients at the Public Reference Hospital, Goiânia, Goiás

Márcia Alves Vasconcelos Rodrigues¹; Maria Cláudia D. P. Borges André¹; Suely Lemes de Alves²; Marieta Pereira M. Souza¹; André Kipnis¹ & Álvaro Bisol Serafini¹

RESUMO – Com o intuito de identificar e verificar a sensibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de 206 amostras clínicas obtidas de formas pulmonares e extrapulmonares, provenientes de 144 pacientes externos e internos do Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás, foi realizado baciloscopia pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen e a cultura em Lowenstein-Jensen e sistema bifásico. A identificação foi realizada através de provas de crescimento na presença de inibidores, produção de pigmentos, tempo de crescimento e provas bioquímicas, conjuntamente com a determinação da susceptibilidade às drogas antimicobacterianas. Foram isoladas micobactérias em 13 (6,3%) amostras, sendo 12 (92,3%) identificadas como *M. tuberculosis* e uma (7,7%) do complexo *M. avium* (MAC). Das amostras isoladas, 12 apresentaram sensibilidade a isoniazida, etambutol, rifampicina, estreptomicina, pirazinamida, etionamida e somente uma amostra, apresentou resistência à isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etionamida.

PALAVRAS-CHAVE – Micobactérias, tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*.

SUMMARY – To identify and conduct susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* strains, 206 clinical samples were isolated from pulmonary and extra-pulmonary forms, originating from 144 in- and out-patients of the Tropical Diseases Hospital from the Goiás State, by undergo Ziehl-Neelsen stain, cultures performed by the Lowenstein-Jensen and double phase system. The identification was based on growth in the presence of inhibiting agents, pigment production, growth time and biochemical testing, followed by the determination of susceptibility to antimycobacterial drugs. Thirteen samples (6.3%) were isolated, which 12 (92.3%) were identified as *M. tuberculosis* and one (7.7%) as *M. avium* Complex (MAC). From the isolated samples, 12 were sensitive to isoniazid, ethambutol, rifampicin, streptomycin, pirazinamid and ethionamid. Only one sample was resistant to ioniazid, rifampicin, pirazinamid and ethionamid.

KEYWORDS – *Mycobacteria*, tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença milenar que acompanha o homem no decorrer da História. Nas últimas décadas, nos países desenvolvidos, a TB apresentou declínio na incidência e mortalidade. Contudo, voltou a constituir problema nos últimos anos, pelo aumento do número de casos e à resistência às drogas. Este aumento tem sido associado às desigualdades sociais, desemprego, movimentos migratórios, negligência do poder público, perda da cultura da tuberculose pelos profissionais de saúde, quimioterapia inadequada, uso de drogas ilícitas por certos segmentos da população, aumento da expectativa de vida, imunodeficiências, como HIV, fatores culturais, religiosos etc³.

A TB é uma doença geralmente de longa duração, raramente causada pelo *M. bovis* e mais frequenter-

te pelo *M. tuberculosis*. A doença pode acometer praticamente todo o organismo, mas o pulmão é o órgão mais frequentemente acometido¹⁵.

Em 1993 a TB foi declarada "Emergência Global de Saúde" pela Organização Mundial da Saúde (OMS) por ser considerada fora de controle em diversas partes do mundo³⁹. Sendo que a OMS estabeleceu como meta para o ano 2000, como diretrizes estabelecidas para atingir seu controle, a detecção de 70% dos casos e a cura de 85% dos casos novos de TB pulmonar bacilífera⁴⁰. Esta emergência foi associada a 1/3 da população mundial infectada, mas somente 5% desenvolvem a doença ativa durante os primeiros anos após a exposição. Entretanto, isto representa 8 milhões de casos novos e 3 milhões de mortes a cada ano. Além disto, estes números estão aumentando, pois a pobreza, a deficiência nutricional e as guerras aumentam a taxa de reativação³⁴.

Recebido em 4/12/2002
Aprovado em 5/2/2003

*Trabalho realizado no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).
¹Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Imunologia do IPTSP/UFG; ²Laboratório Central (LACEN/GO) da Secretaria Estadual de Saúde.

O Brasil apresenta o mais elevado número de casos da América Latina (53,4 novos casos/100.000 habitantes), sendo o 6º país do mundo com maior incidência de TB³³. Mesmo países desenvolvidos, como o Reino Unido, a distribuição da TB, em grandes cidades é idêntica à de áreas pobres³⁴ e nos Estados Unidos, em 1998, o número de casos foi 35% menor do que em 1992, mas acima da meta nacional para o ano 2000².

A TB é um mal que impõe perdas expressivas à sociedade e incompatíveis com a vida social, pois a doença, no seu estágio inicial, quando o indivíduo já está infectando outras pessoas, é confundida pelos leigos, com gripe, bronquite, alergia respiratória ou outras pneumopatias e o retardo no diagnóstico agrava o estado clínico e o processo de disseminação do bacilo³. O desequilíbrio do sistema de saúde trouxe conseqüências negativas para a pesquisa sobre TB, como tratamentos incompletos, perda de contato dos pacientes e aumento da resistência a drogas^{34,13}. A curto prazo reconhece-se que o único método para reduzir a transmissão da TB é a detecção precoce e tratamento de pacientes³⁹.

A TB pode ser identificada presuntivamente através da pesquisa direta no material clínico, ou pela combinação dos sintomas clínicos, anormalidades no raio X e teste tuberculínico positivo. Porém, o diagnóstico definitivo requer o isolamento e identificação bioquímica das micobactérias²⁶. A cultura em meios sólidos têm um papel importante, não somente por seu menor custo e eficácia, mas por propiciarem um reconhecimento rápido de eventual presença de culturas mistas^{6,36,38}.

O complexo *M. avium* consiste de um grupo de micobactérias atípicas freqüentemente encontradas nos seres humanos. Em pacientes com AIDS, estas bactérias atuam como patógenos oportunistas³⁰. Sendo ainda incerto como os seres humanos contraem infecções pelo complexo *M. avium*, embora alguns estudos descrevam o isolamento destas bactérias de amostras de alimentos¹⁸, animais^{5,22}, águas³⁷, solo⁴¹ e amostras clínicas^{9,29}. Esta preocupação deve-se à ubiquidade das micobactérias do grupo NTM (*Non Tuberculous Mycobacteria*) e existem indícios de que o trato respiratório pode ser colonizado, sem ou com apresentação de sintomas^{12,20}.

Os relatos de micobactérias resistentes a drogas remontam ao início do uso da monoterapia com estreptomicina em 1944¹⁴. Nos EUA, os estudos mostram estabilidade ou declínio de pacientes com TB resistente a drogas entre 1950 e 1986, porém, na década de 1980, a freqüência de cepas resistentes a uma ou mais drogas antituberculosas aumentou de 7,0% para 14,2%^{11,19}. Esta tendência também foi observada na França e no Brasil^{24,25}.

O esquema terapêutico, normatizado pelo Ministério da Saúde em 1978, implantado em 1979, preconiza que os casos novos de TB sejam tratados por via oral em um período de 6 meses; nos dois primeiros, três drogas são utilizadas: isoniazida, rifampicina e pirazinamida, e nos meses seguintes, isoniazida e rifampicina⁷.

O presente estudo teve como objetivos pesquisar a presença de micobactérias em pacientes com quadro clínico suspeito de TB provenientes do Hospital de Doenças Tropicais-HDT/Goiás, identificar e determinar a susceptibilidade às drogas antimicobacterianas

utilizadas na clínica médica, bem como, observar a correlação entre baciloscopia e cultura como métodos de diagnóstico para tuberculose e micobacterioses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram colhidos 206 espécimens clínicos de 144 pacientes atendidos no HDT que apresentavam quadro clínico suspeito de TB entre janeiro de 1999 e dezembro de 2000. O espécime coletado foi definido pelo médico, de acordo com a suspeita clínica e/ou a necessidade de procedimentos invasivos. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás para a realização da baciloscopia, cultura, identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Inicialmente, os espécimes clínicos foram submetidos à baciloscopia pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen e, em seguida, foi realizado o tratamento de descontaminação por dois métodos: de Petroff (solução de NaOH a 4%) e do lauril sulfato de sódio-SDS (solução de NaOH a 1% com SDS). As amostras sépticas consideradas multibacilares foram descontaminadas e inoculadas em dois tubos de Lowenstein-Jensen (L-J) e dois no sistema bifásico, constituído de L-J associado ao meio 7H-9, e as amostras paucibacilares inoculadas em dois tubos com sistema bifásico com incubação a 35°C-37°C⁶.

As culturas com crescimento positivo para BK foram examinadas nas primeiras 48 horas para verificação da presença de contaminação, com leituras semanais até a 8ª semana, sendo novamente submetidas à baciloscopia por Ziehl-Neelsen para comprovação da presença de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR). A identificação das espécies foi feita por provas bioquímicas como: redução do nitrato, crescimento em presença de agentes inibidores (ácido tiofeno 2-carboxílico-T2H e ácido p-nitrobenzóico-PNB), tempo de crescimento e produção de niacina⁶.

O teste de susceptibilidade aos fármacos foi realizado pelo método das proporções e os resultados são relatados como a percentagem do total da população bacteriana resistente a uma determinada droga, obtida pela quantidade de crescimento no meio de cultura contendo a droga, quando comparado ao crescimento em meio sem a droga^{6,8}. Foram testadas as seguintes drogas: estreptomicina (SM) 4 µg/ml, etambutol (EMB) 2 µg/ml, etionamida (ETH) 20 µg/ml, isoniazida (INH) 0,2 µg/ml, pirazinamida (PZA) 100 µg/ml e rifampicina (RPM) 40 µg/ml^{6,8}.

RESULTADOS

Dos 206 espécimens de 144 pacientes (Tabela I), foram realizados esfregaços em lâmina do material direto, para pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistentes, dos quais 7 (53,8%) foram positivos e 6 (46,1%) tiveram baciloscopia negativa (Tabela II). A maior freqüência de amostras suspeitas foi proveniente das formas pulmonares (58,3%), incluindo aspirado brônquico (26,7%), escarro (25,7%) e líquido pleural (5,8%).

Das 206 amostras analisadas, 13 (6,3%) foram culturas positivas, isolando-se *M. tuberculosis* em duas (15,4%) das 55 amostras de aspirado brônquico, três (23%) de 53 de escarro, duas (15,4%) de 23 de biópsia

de gânglio, uma (7,7%) de três de aspirado gástrico, uma (7,7%) de 12 secreção purulenta de pele, uma (7,7%) de duas zaragatoas de lesão anal, uma (7,7%) de 24 de urina e uma (7,7%) de 12 de líquido pleural (Tabela I). Foi isolada *M. avium* de uma (7,7%) das 22 amostras de medula óssea.

A baciloscopia, foi realizada em todas culturas positivas para confirmação dos bacilos álcool-ácido-resistentes. A percentagem de esfregaços AFB e de cultura positivas foi maior em amostras (três) de escarro.

O teste de susceptibilidade às drogas evidenciou somente uma (7,7%), proveniente de aspirado gástrico, com *M. tuberculosis* multidroga resistente (MDR) à ETH, INH, PZA e RPM, as demais cepas, incluindo a de *M. avium*, foram susceptíveis às drogas testadas.

DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados 206 espécimes clínicos de 144 pacientes com suspeita clínica de TB, identificando em 13 (6,3%), através de baciloscopia e cultura, a presença de *Mycobacterium* sp. A maior frequência de amostras com suspeita de infecção (46,2%) ocorreu na forma pulmonar (Tabela I). Este percentual é diferente do apresentado para o Brasil, e principalmente para o Estado de Goiás, onde 85% dos casos de TB foram de localização pulmonar e 15% extra-pulmonares¹⁶.

A baciloscopia direta do escarro é considerada como o teste mais indicado para a confirmação de tuberculose, porém um resultado negativo não elimina o diagnóstico de TB²⁶. Nosso estudo revelou 7 (3,4%) amostras positivas, como observado em Santa Maria/RS com 2,3%¹⁷ e 6 (2,9%) negativas, porém estas foram positivas pela cultura (Tabela II). Esta diferença pode ser justificada pelo menor limiar de detecção da baciloscopia em relação à cultura²³, mesmo considerando-se que esta é influenciada tanto pelo método empregado na descontaminação da amostra, como pelo meio de cultura utilizado^{1,36,38}.

A maioria dos isolados foi culturalmente e bioquimicamente caracterizada como *M. tuberculosis* (92,3%) e apenas uma amostra bacteriana foi identificada como *M. avium* (7,7%), proveniente de medula óssea. Esta cepa só foi isolada após a descontaminação com lauril sulfato de sódio e forneceu cultura negativa quando tratada pela técnica de Petroff, indicando que este tipo de amostra clínica deve ser tratada com métodos menos agressivos, pois a descontaminação mais agressiva inativa cerca de 70% das micobactérias, não devendo ser utilizado em espécimes paucibacilares, nem em material suspeito de conter NTM, pois são mais sensíveis ao NaOH^{21,38}. O baixo número de isolamentos de *M. avium*, em nosso meio^{9,17} contrasta com os de países desenvolvidos como na Noruega²⁸, Suécia³² e Finlândia³⁵, onde ocorreu incremento no seu isolamento e decréscimo no de *M. tuberculosis*.

Nossos resultados foram similares aos obtidos no Hospital da Universidade de Santa Maria/RS, onde de 476 culturas, 42 (8,8%) foram positivas para *M. tuberculosis*, sendo 19 (45,2%) provenientes de escarros¹⁷, porém distintos do obtido em Bogotá, Colômbia onde obteve-se 1,4% de isolamento de *M. tuberculosis*²⁷, bem como dos encontrados no Hospital Geral do Rio de Janeiro/RJ, onde recuperaram micobactérias de 20,6% (313/1.517) de todos pacientes⁹, sendo que *M. tuberculosis* foi identificado em 94,2% (295/313).

TABELA I
Distribuição das 206 espécimes clínicos em relação ao número de amostras analisadas e de culturas positivas, Goiânia, Janeiro de 1999 a Dezembro de 2000

Espécime clínico	Total de amostras analisadas	Culturas positivas (%)*		
		Total	%*	%**
Medula óssea	22	01	7,7	4,5
Líquido pleural	12	01	7,7	8,3
Urina	24	01	7,7	4,1
Aspirado brônquico	55	02	15,4	3,6
Escarro	53	03	23,0	5,6
Biópsia gânglio	23	02	15,4	8,7
Aspirado gástrico	3	01	7,7	33,3
Secreção purulenta pele	12	01	7,7	8,3
Lesão anal	2	01	7,7	50,0
Total	206	13	100,0	

* % positividade em relação as 13 amostras com cultura positiva.

** % positividade em relação as amostras analisadas.

TABELA II
Distribuição das 13 amostras com cultura positiva, conforme o espécime clínico, método de descontaminação, espécie de Micobactéria isolada e resultado da baciloscopia, em pacientes de hospital público do Estado de Goiás, Janeiro de 1999 a Dezembro de 2000

Espécime clínico	Métodos de descontaminação		Bactéria isolada	Baciloscopia
	Petroff	SDS		
Medula óssea	C-	C+	<i>M. avium</i>	Negativa
Líquido pleural	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Negativa
Urina	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Negativa
Lavado brônquico	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Positiva
Escarro	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Positiva
Biópsia	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Negativa
Escarro	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Positiva
Biópsia	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Negativa
Aspirado gástrico	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Positiva
Escarro	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Positiva
Secreção purulenta pele	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Positiva
Aspirado brônquico	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Negativa
Zaragatoa de lesão anal	C+	C+	<i>M. tuberculosis</i>	Positiva

C+ = cultura positiva; C- = cultura negativa.

Em relação ao isolamento de *M. avium*, nosso estudo confirma o realizado na Colômbia, quando, mesmo em pacientes infectados por HIV, *M. avium* foi identificado em 4,5% (13/286) dos casos²⁷ e ao do Rio de Janeiro onde detectaram NTM em 5,8% dos casos (18/313)⁹.

Em relação ao perfil de susceptibilidade das drogas antituberculosas testadas, no presente estudo, todas as cepas mostraram sensibilidade, com exceção de uma proveniente de aspirado gástrico que mostrou resistência múltipla para 4 (ETH, INH, RPM e TZA) das seis drogas testadas, identificando paciente portador de cepa de *M. tuberculosis* MDR adquirida, isto é, bacilo multirresistente proveniente de paciente com história de tratamento anterior. A ficha clínica evidenciou que o paciente encontrava-se em tratamento com esquema III, padronizado no país para uso em casos de falência às drogas de primeira linha.

A identificação dos pacientes portadores de cepas MDR é crítica, uma vez que esses poderão transmiti-las a seus contatos, principalmente, durante a admissão hospitalar, caso não sejam adotadas medidas de prevenção⁴.

O processo da resistência na TB é particularmente grave para os pacientes que receberam tratamento prévio sem sucesso. Em muitos deles, as lesões avançam por reativações repetidas e tratamento insuficientes, favorecendo o aparecimento de bacilos mutantes resistentes a uma ou mais drogas³¹. Um fator decisivo é a demora em reconhecer a presença de uma cepa resistente, assim como, a falha em observar as precauções recomendadas de isolamento do paciente e ventilação apropriada com pressão negativa nas salas e quartos de isolamento¹⁰.

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que além da baciloscopia, a realização da cultura é importante pois permite posterior identificação, juntamente com a determinação do perfil de susceptibilidade às drogas antimicobacterianas.

Concluiu-se também que o diagnóstico definitivo de TB depende da associação de técnicas, mesmo que o resultado demande um determinado período de tempo. O controle da doença depende de um diagnóstico seguro e definitivo.

REFERÊNCIAS

1. **American Thoracic Society.** Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156:S1-S25, 1997.
2. **Anonymous.** Progress toward the elimination of tuberculosis – United States, 1998. *M.M.W.R.*, 48:732-6, 1999.
3. **Azevedo, J. F.** Os desafios da tuberculose. *Medicina*, 126:13-14, 2001.
4. **Barret-Connor, E.** The epidemiology of tuberculosis in physicians. *J. Am. Med. Assoc.*, 241:33-8, 1979.
5. **Bono, M.; Jemmi, T.; Bernasconi, C. et al.** Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:371-3, 1995.
6. **Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde.** Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª ed, Rio de Janeiro, 1994, 115p.
7. **Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde.** Reunião de avaliação operacional e epidemiológica do Programa Nacional de Controle da Tuberculose na década de 80. *Bol. Pneum. Sanit.*, (número especial):1-90, 1993.
8. **Canetti, G.; Rist, N.; Grosset, J.** Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev. Tuberc. Pneumol.*, 27:217-72, 1963.
9. **Conde, M. B.; Figueira, C.; Moraes, R. et al.** Predictive value of the acid fast smear for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a reference center of HIV/AIDS in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94:787-90, 1999.
10. **Foley, N. M.; Miller, R. F.** Tuberculosis and aids, is the white plague up and coming? *J. Infect.*, 26:39-43, 1993.

11. **Frieden, T. R.; Sterling, T.; Pablos-Mendes, A. et al.** The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York city. *N. Engl. J. Med.*, 328:521-26, 1993.
12. **Good, R. C.; Snider, D. E.** Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1980. *J. Infect. Dis.*, 146:829-33, 1982.
13. **Grosset, J.** Current problems with tuberculosis treatment. In: 13th Forum in Microbiology. *Rev. Microbiol.*, 147:10-16, 1996.
14. **Hart, C. A.; Beeching, N. J.; Duerden, B. I.** Tuberculosis into the next century. *J. Med. Microbiol.*, 44:1-34, 1996.
15. **Hass D. W.; Prez, R. M.** *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Principles and Practices of Infectious Disease*. 3th ed. New York, USA: Churchill Livingstone Incorporation; 1995, p2213-43.
16. **Hijjar, M. A.** Controle das doenças endêmicas no Brasil-tuberculose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27:23S-36S, 1994.
17. **Horner, R.; Scherer, J.; Alves, S. H. et al.** Identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, isolados de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). *NewsLab*, 28:1-5, 1998.
18. **Horsburgh, C. R. Jr.; Chin, D. P.; Yajko, D. M. et al.** Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 170:362-7, 1994.
19. **Kent, J. H.** The epidemiology of multidrug resistant tuberculosis in the United States. *Med. Clin. North Am.*, 77:1391-409, 1993.
20. **Kimoto, T.; Matsumoto, H.; Tsuyuguchi, K. et al.** Familial pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Am. J. Respir. Care Med.*, 161:1643-7, 2000.
21. **Kochi, A.** The Global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*, 72:1-6, 1991.
22. **Komijn, R. E.; de Haas, P. E.; Schneider, M. M. E. et al.** Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in the Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1254-9, 1999.
23. **Koneman, E.; Allen, D.; Janda, M. et al.** Diagnostic microbiology. In: **Koneman et al.** *Mycobacteria*. Philadelphia, J. B. Lippincott Company, p.703-755, 1997.
24. **Kritski, A. L.; Marques, M. J. O.; Rabahi, M. F. et al.** Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug resistant tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153:331-5, 1996.
25. **Liard, R.; Harf, R.; Korobaef, M.; Neukirch, F.** HIV infection and tuberculosis: an epidemiological study from a French register. *Tubercle Lung Dis.*, 75:291-6, 1994.
26. **Miller, B.; Schieffelbein, C.** Tuberculosis. *WHO Bull.*, 76:141S-143S, 1998.
27. **Murcia-Aranguren, M. I.; Gómez-Marín, J. E.; Alvarado, F. S. et al.** Frequency of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in HIV infected patients from Bogota, Colombia. *BMC Infect. Dis.*, 1:21-9, 2001.
28. **Myrvang, B.** Mycobacterial infections in Norway. *Scand. J. Infect. Dis.*, 98:12S-4S, 1995.
29. **Oplustil, C. P.; Teixeira, S. R.; Osugui, S. K.; Mendes, C. F.** Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 38:167-73, 2002.
30. **Portaels, F.** Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin. Dermatol.*, 13:207-22, 1995.
31. **Rastogi, N.; David, H. L.** Mode of action of antituberculous drugs and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.*, 144:133-43, 1993.
32. **Romanus, V.** Mycobacterial infections in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.*, 98:15S-6S, 1995.
33. **Rossetti, M. L. R.; Valim, A. R. M.; Silva, M. S. N.; Rodrigues, V. S.** Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev. Saúde Pública*, 36:525-32, 2002.
34. **Spence, D. P.; Hotchkiss, J.; Williams, C. S.; Davies, P. D.** Tuberculosis and poverty. *Br. Med. J.*, 307:759-61, 1993.
35. **Tala, E.; Viljanen, M.** Mycobacterial infections in Finland. *Scand. J. Infect. Dis.*, 98:7S-8S, 1995.
36. **Tortoli, E.; Cichero, P.; Chirillo M. et al.** Multicenter comparison of ESP culture system II with Bactec 460TB and Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. *J. Clin. Microbiol.*, 36:1378-81, 1998.
37. **von Reyn, C. F.; Waddell, R. D.; Eaton, T. et al.** Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J. Clin. Microbiol.*, 31:3227-30, 1993.
38. **Wilson, M. L.; Stone, B. L.; Hildred, M. V.; Reves, R. R.** Comparison of recovery rates for mycobacteria from Bactec 12B vials, Middlebrook 7H11-selective 7H11 biplates, and Lowenstein-Jensen slants in a public health mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 33:2516-8, 1995.
39. **WHO, World Health Organization.** Programa de la OMS contra la Tuberculosis. Marco para el control eficaz de la Tuberculosis. *WHO Bull.*, 179:1-14, 1994.
40. **WHO, World Health Organization.** TB/HIV. A clinical manual. *WHO Bull.*, 200:1-135, 1996.
41. **Yajko, D. M.; Chin, D. P.; Gonzalez, P. C. et al.** *Mycobacterium avium* complex in water, food, and soil samples collected from the environment of HIV-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 9:176-82, 1995.

Endereço para correspondência

Profª Márcia Alves V. Rodrigues

Rua Santa Efigêncina, 343 - Jd. Planalto - 74333-230 - Goiânia - GO

Fax: (0xx62)202-1236

E-mail: malves@iptsp.ufg.br

Diagnóstico precoce de carcinoma de próstata: Antígeno Prostático Específico (PSA) – um marcador quase ideal*

A precocious diagnosis of prostate carcinoma: prostate specific antigen (PSA) – an almost ideal marker

N. A. B. Corrêa; G.F.M. Costa; E. M. Massambani; F. H. Matumoto & M. M. M. Paula

RESUMO – O PSA é um componente do tecido prostático saudável e do líquido seminal, podendo apresentar nível sérico elevado em pacientes com câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. O adenocarcinoma de próstata é atualmente a patologia maligna mais freqüente no sexo masculino nos Estados Unidos da América, sendo a segunda causa de morte por câncer entre os homens desse país. No Brasil é o tipo de câncer que mais aumenta em incidência. Estima-se que cerca de 140.000 novos casos de câncer prostático surjam a cada ano e que, desses, aproximadamente 10.000 resultem em óbito devido a essa patologia. No presente estudo, foram analisados os resultados de 1.160 pacientes, com idade de 34 a 94 anos, no período de novembro de 2000 a junho de 2002, que foram atendidos no serviço de Saúde Pública de Umuarama-Paraná, com dosagens sorológicas de PSA total realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense, através da metodologia de enzimmunoensaio Cobas Core PSA Total EIA II, sendo que 77,93% dos pacientes apresentaram PSA total inferior 4 ng/ml, 13,62% níveis entre 4 e 10 ng/ml e 8,45% superiores a 10 ng/ml. Em casos de resultados entre 4 e 10 ng/ml, é indicado a relação PSA livre/total, pois fornece excelente previsibilidade para diferenciar lesões benignas das malignas. Com base nos resultados obtidos, verificou-se a relevância da realização da pesquisa deste marcador. Entretanto o PSA não apresenta especificidade para detectar o câncer de próstata, pelo fato desta enzima ser órgão específico, mas não doença específica. Sendo, portanto mais conclusiva a sua interpretação quando associado a exames complementares. Este estudo evidencia a importância da utilização do PSA como marcador tumoral no diagnóstico precoce do câncer da próstata, bem como, ressalta a sua contra-indicação como único parâmetro.

PALAVRAS-CHAVE – Antígeno prostático específico, câncer prostático, hiperplasia prostática, antígeno prostático específico livre.

SUMMARY – The PSA is a component of both healthy prostate tissue and seminal liquid and may be present in high serum level in patients with both prostate cancer and benign prostate hyperplasia. The prostate adenocarcinoma is the most frequent malignant pathology on males in the United States nowadays, ranking the second place of death cause. In Brazil, this emerging cancer type is the most incidence disease. It is estimated about 140.000 new cases of prostate cancer each year, and about 10.000 of the patients will come to death. This paper evidences the importance of using PSA as a tumor marker on the precocious diagnosis of prostate cancer, emphasizing its contraindication as an unique parameter. This work analyzed 1160 male patients, from 34 to 94 years old during November 2000 to June 2002. The Public Health Service in the city of Umuarama-PR, Brazil. The enzyme immunoassay Cobas Core I Roche technique was used for this purpose. The data shows that 77.93% of the patients had total PSA under 4 ng/ml, 13.62% from 4 to 10 ng/ml, and the other 8.45% over 10 ng/ml. In the case of the patients from 4 to 10 ng/ml free/total PSA is indicated, since it gives an excellent possibility of foretelling the difference of malignant and benign lesions. Based on these results we observed the importance of looking into the performance of this marker. However, PSA has not shown any specificity to detect prostate cancer, since this enzyme is a particular organ, not of a particular disease. Thus, the interpretation is more conclusive when associated to complementary tests. This work shows the importance of PSA as a marker for early diagnose for prostate cancer, as well as not to use it as the only method.

KEYWORDS – Prostate specific antigen, prostate cancer, benign prostate hyperplasia, free prostate specific antigen.

INTRODUÇÃO

O PSA é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais prostáticas e pelas glândulas periuretrais. Sua atividade esta relacionada com a função de liquefação do coágulo seminal, através da clivagem das principais proteínas formadoras de gel em peptídeos menores que aumentam a mobilidade dos espermatozoides¹. É um componente do tecido prostático saudável e do líquido seminal, podendo apresentar nível sérico elevado em pacientes com câncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HBP)^{2,3}. Embora a elevação de PSA total no soro, não ofereça conclusão diagnóstica de CaP, pelo fato desta enzima ser órgão específico e não doença específica, a sua dosagem tem sido utilizada, eficazmente, como um importante marcador tumoral de CaP, no monitoramento da resposta terapêutica e na avaliação do prognóstico da doença⁴.

O CaP é atualmente a patologia maligna mais freqüente que atinge a população do sexo masculino nos Estados Unidos da América, sendo a segunda causa de morte por câncer entre os homens desse país^{5,6}. No Brasil é o câncer que mais aumenta em incidência. Estima-se que cerca de 140.000 novos casos de câncer prostático surjam a cada ano e que, desses, aproximadamente 10.000 resultem em óbito devido a essa patologia⁷.

Este estudo evidencia a importância da utilização do PSA como marcador tumoral no diagnóstico precoce do câncer da próstata, bem como ressalta a sua contra-indicação como parâmetro único.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo, foram analisados os resultados de 1.160 pacientes do sexo masculino, com idade de 34 a 94 anos, no período de novembro de 2000 a junho de 2002, que foram atendidos no serviço de Saúde Pública

Recebido em 3/1/2003
Aprovado em 20/3/2003

*Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense.

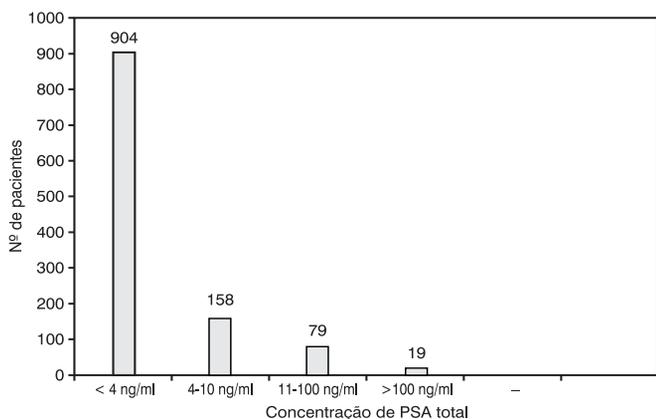


FIG. 1 - Distribuição dos resultados das 1160 sorologias de PSA total analisadas no período de junho de 2000 a novembro de 2002.

de Umuarama-Paraná, com dosagens sorológicas de PSA total realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense através da metodologia de enzima-imunoensaio Cobas Core PSA Total EIA II.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados os resultados de um total de 1.160 pacientes no período de análise do presente estudo. A Figura 1 demonstra a distribuição desses resultados em ng/ml, onde 904 (77,93%) apresentaram PSA total inferior a 4 ng/ml, o que sugere pequenos riscos. Os valores entre 2 e 4 ng/ml necessitam ser acompanhados mais de perto, sendo o nível de detecção inferior a 2 ng/ml o ideal. Vale lembrar que concentrações até 4 ng/ml devem ser interpretadas com cautela, pois diferentemente de uma única leitura, o uso seriado deste marcador, tipicamente uma vez ao ano, com aumento do PSA constante e definido, pode proporcionar a identificação do CaP anos antes das manifestações clínicas⁸. Este procedimento é importante para o diagnóstico de CaP⁹, considerando significativo o aumento de 0,75 ng/ml (20%) ou mais por ano¹⁰, indicando, dessa maneira a necessidade de realizar a biópsia. Isto acrescentou uma nova dimensão à interpretação dos valores.

De acordo com a Tabela I, níveis entre 4 e 10 ng/ml foram observados em 158 (13,62%) dos pacientes, com 51 (4,39%) dos indivíduos na faixa etária superior a 70 anos, seguidos de 39 (3,36%), 66 (5,69%) e 2 (0,17%) nas faixas de 44 a 60 anos, 61 a 70 anos e inferior a 44 anos, respectivamente. Pacientes com PSA total nesses níveis serão beneficiados com a verificação da proporção de PSA livre em relação ao total fornecendo excelente previsibilidade para diferenciar as lesões benignas das malignas¹¹, bem como para evitar biópsias desnecessárias. Visto que a razão PSA livre/PSA total é maior na HPB do que no CaP, pode-se considerar valor de "cut off" de 18%. Não foram encontrados resultados nesta variação em pacientes com idade inferior a 44 anos. Apresentaram sorologias entre 11,0 e 100,0 ng/ml 6,81% (79) pacientes. Entretanto esses valores isolados não são suficientes para determinar o estágio clínico. Resultados superiores a 100,0 ng/ml foram encontrados em 19 (1,63%), que são sugestivos de câncer localizado avançado ou metástase. O maior número de pacientes 439 (37,84%) submetidos ao teste encontra-se na faixa etária de 44 a 60 anos, fato que ressalta a sua indicação na triagem logo no começo desta faixa etária, confirmando, desta maneira, também o uso deste marcador como preventivo. São relatados casos de CaP avançados com PSA normal ou discretamente elevado (falso-negativos), contudo são pouco frequentes^{2,9}. Nestes casos a indicação da dosagem de fosfatase ácida prostática é adequada.

TABELA I
Variação, número, porcentagem de pacientes e a distribuição de PSA Total de acordo com a faixa de concentração e com a faixa etária

Faixa Etária	Nº de pacientes	Porcentagem	Inferior 4 ng/ml	Resultados 4-10 ng/ml	10-100 ng/ml	Superior 100 ng/ml
Inferior 44 anos	66	5,69%	63	2	1	-
44 a 60 anos	439	37,84%	392	39	8	-
61 a 70 anos	381	32,85%	283	66	22	10
Superior 70 anos	274	23,62%	166	51	48	9
Total	1160	100%	904	158	79	19

CONCLUSÃO

A grande maioria dos casos diagnosticados de CaP no Brasil, encontra-se em fase avançada da doença, quando o tumor já deixou de ser limitado à glândula¹², restando como opção somente o tratamento paliativo, aumentando assim a taxa de mortalidade. O prognóstico dos pacientes com CaP é ruim, sendo que a sobrevida média é de 30 meses¹². Assim a realização de rastreamento da população masculina a partir dos 45 anos, sobretudo nas populações com alto risco, parece ser um fator importante e promissor para o controle da patologia. Propõe-se a realização de "screening" com associação da dosagem do PSA Total, quando necessário o PSA livre e o toque retal, como o programa mais adequado, na atualidade, para detecção do câncer de próstata. Salienta-se também a realização do PSA complexado (cPSA)¹³ em pacientes com dosagem intermediária de Psa livre, pois identifica com maior precisão quais pacientes devem ser submetidos à biópsia sendo sua produção mais específica na presença de tumores. Frente a alguma alteração do PSA, do toque retal, ou de ambos, torna-se viável a solicitação de exames complementares pertinentes para a elucidação diagnóstica.

REFERÊNCIAS

- Wang, M. C.; Valenzuela, L. A.; Murphy, G. P.; Chu, T. M. Purification of human prostatic specific antigen. *Invest. urol.* 17:159-63, 1979.
- Garnick, M. B. Prostate cancer: screening, diagnosis and management. *Ann. Intern. Med.* 118: 804-818, 1993.
- Stamey, T. A.; Kabalin, J. E. et al. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients. *J. Urol.* 141:1076,1989 b.
- Yu, H.; Gjai, M.; Diamandis, E. P.; Katsaros, D.; Sutherland, D. J. A.; Levesque, M. A. et al. Prostate-Specific Antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer. Res.* 1995; 55:2104-10.
- Parrer, S. I. et al. Cancer Statistics, 1996. *Ca Cancer J. Clin.* 46:5-27, 1996.
- Armbruster, D. A. Prostate-Specific Antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin. Chem.* 39:181-95, 1993.
- Nixon, R. G.; Brawer, M. K. Enhancing the specificity of prostate-antigen (PSA): an overview of PSA density, velocity and age-specific reference ranges. *Br. J. Urol.* 79 Suppl. 1:61-7, 1997.
- Carter, H. B. et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA.* 267:2215-20, 1992.
- Gerber, G. S. et al. Disease-specific survival following routine prostate cancer screening by digital rectal examination. *JAMA.* 269:61-4, 1993.
- Catalona, W. J. et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl. J. Med.* 324:1156-61, 1991.
- Petterson, K.; Piironen, T.; Seppä, M.; Liukkonen, L.; Christensson, A.; Mäkitäinen, M. T. et al. Free and complexed prostate-specific antigen (PSA): *in vitro* stability, epitope map and development of immunofluorometric assays for specific and sensitive detection of free PSA and PSA-a1-antichymotrypsin complex. *Clin. Chem.* 80:1515, 1995.
- Crawford, E. D.; Eisenberger, M. A.; McLeod, D. G. et al. A controlled trial of leuprolid with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 321: 419-424, 1989.
- Revista Veja, ano 34, nº 26, ed. 1707; p.66.

Endereço para correspondência: E-mail: nelton@unipar.br

Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das infecções por *Clostridium difficile*

Clinical, epidemiological and laboratorial aspects of *Clostridium difficile* infections

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva¹ & Caio Roberto Salvino²

RESUMO – *Clostridium difficile* é responsável por 15-25% dos casos de diarreia associada a antibióticos e por praticamente todos os casos de colite pseudomembranosa. Esta bactéria anaeróbica tem sido identificada como a principal causadora de diarreia infecciosa nosocomial em adultos e pode ser responsável por muitos surtos. As infecções nosocomiais por *C. difficile* resultam em aumento do tempo de internação. Fatores de risco para diarreias associadas à *C. difficile* incluem terapia antibiótica, idade (>65 anos), quimioterapia antineoplásica e tempo de internação. Os pacientes podem ser contaminados por superfícies, instrumentos, mãos do pessoal médico e em quartos contaminados. Uma vez que haja o início do surto, *C. difficile* pode se espalhar rapidamente no ambiente hospitalar, onde os esporos podem persistir por meses. Medidas efetivas na redução da incidência de infecções por *C. difficile* ou infecções cruzadas incluem o diagnóstico rápido, tratamento apropriado, implementação de barreiras para pacientes sintomáticos, cuidados especiais na lavagem das mãos, desinfecção diária do ambiente hospitalar e restrições ao uso de antibióticos. *C. difficile* é uma causa comum de diarreias infecciosas e portanto deve ser sistematicamente investigada em pacientes com diarreia nosocomial, baseado em cultura e detecção de toxinas em espécimes fecais.

PALAVRAS-CHAVE – Infecções por *Clostridium difficile*; diarreia associada a antibióticos; colite pseudomembranosa.

SUMMARY – *Clostridium difficile* is responsible for 15-25% of diarrhea cases and associated with antibiotic for virtually all antibiotic-associated pseudomembranous colitis cases. This anaerobic bacterium has been identified as the leading cause of nosocomial infectious diarrhea in adults and can be responsible for large outbreaks. Nosocomial *C. difficile* infection results in an increased length of stay in hospital. Risk factors for *C. difficile*-associated diarrhea include antimicrobial therapy, older age (>65 years), antineoplastic chemotherapy and length of hospital stay. Patients can be contaminated from environmental surfaces, shared instrumentation, hospital personnel hands and contaminated roommates. Once an outbreak starts, *C. difficile* may be spread rapidly throughout the hospital environment where spores may persist for months. Effective measures in reducing incidence of *C. difficile* infections and cross-infection include an accurate and rapid diagnosis, appropriate treatment, implementation of enteric precautions for symptomatic patients, reinforcement of hand-washing, daily environmental disinfection and restrictive antibiotic policy. *C. difficile* is a common cause of infectious diarrhea and should be therefore systematically investigated in patients with nosocomial diarrhea, based on culture and toxin detection in fecal specimens.

KEYWORDS – *Clostridium difficile* infections; antibiotic-associated diarrhea; pseudomembranous colitis.

INTRODUÇÃO

O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbico, formador de esporos, que foi isolado pela primeira vez de fezes de neonatos em 1935. Quarenta anos mais tarde, esta bactéria foi reconhecida como a principal causa da colite pseudomembranosa e diarreia associada a antibióticos.

O relato histórico do primeiro caso de colite pseudomembranosa descrevendo uma mulher jovem que evoluiu com diarreia hemorrágica, 10 dias após uma cirurgia gástrica e autópsia, revelando “colite difterítica”, ilustra a importância da cirurgia abdominal, a hospitalização e a diminuição da motilidade intestinal na patogênese do processo.

Manifestações clínicas

As manifestações clínicas causadas pelo *C. difficile* variam de uma leve diarreia à colite pseudomembranosa, com surgimento de megacólon e possível perfuração intestinal. A toxina-B do *C. difficile* tem sido isolada das fezes de mais de 95% dos casos de colite pseudomembranosa e de 15-25% dos casos de diarreia associada a antibióticos. Durante os últimos 20 anos, *C. difficile* toxigênico tem emergido como a maior causa de diarreia nosocomial, sendo responsável por muitos surtos intra-hospitalares^{1,9}. Em muitos hospitais, *C. difficile* é o enteropatógeno mais comum isolado em culturas de fezes. Entretanto, o isolamento de *C. difficile* deve ser interpretado com cautela, uma vez que o estado de por-

Recebido em 7/6/2002

Aprovado em 10/7/2002

¹Farmacêutico-Bioquímico-Microbiologista. Professor de Microbiologia da FAESA. Microbiologista do Marcos Daniel Laboratório (Vitória/ES);

²Farmacêutico-Bioquímico-Microbiologista. Microbiologista do Hospital Nossa Senhora dos Prazeres/Laboratório Saldanha (Lages/SC).

tador assintomático pode ocorrer em até 3% da população adulta sadia. O maior índice de portadores assintomáticos ocorre em pacientes com hospitalização prévia ou em pacientes que receberam terapia antibiótica recentemente². Não se sabe ao certo se o estado de portador assintomático representa colonização transitória ou se as bactérias são componentes da microbiota estável.

Além da diarreia, os principais sinais e sintomas são: febre (30 a 50% dos casos), leucocitose (50 a 60%) e dor abdominal (20 a 33%). Mais raramente, o paciente pode evoluir com quadros de colite sem diarreia, com apresentação da síndrome de abdômen agudo ou megacólon tóxico^{13,11,16}.

Recorrências podem ocorrer em até 50% dos casos. Perfuração colônica e enteropatia com grande perda de proteínas são duas das complicações que podem ocorrer.

Raramente surgem lesões fora do intestino, já tendo sido descritos casos de bacteremias concomitantes (por outras bactérias da microbiota intestinal), abscesso esplênico e osteomielite (ou mesmo artrite e/ou tenosinovite reacional) pelo *C. difficile*^{9,13} (Figura 1).

Patogênese

Mais de 90% das infecções por *C. difficile* ocorrem após ou durante a terapia antibiótica. Os antibióticos agem desestabilizando a microbiota normal do cólon, permitindo ao *C. difficile*, de origem endógena ou exógena, se estabelecer e proliferar nesta região. Duas toxinas produzidas por esta bactéria são reconhecidas atualmente: toxina-A (uma enterotoxina) e a toxina-B (uma citotoxina)³. Caso a cepa em questão seja toxigênica, as toxinas A e B são produzidas simultaneamente em quase todos os casos (apesar de nem todas as cepas de *C. difficile* produzirem estas toxinas, especialmente aquelas de portadores assintomáticos), causando secreção de fluidos, inflamação e dano à mucosa, levando à diarreia ou colite pseudomembranosa. As razões pelas quais pacientes podem apresentar tanto uma leve diarreia como uma colite pseudomembranosa continuam não totalmente esclarecidos mas os efeitos clínicos provavelmente dependem de outros fatores de virulência como adesão ou secreção de enzimas hidrolíticas, além de fatores do hospedeiro⁷.

Como demonstrado em recentes estudos, é extremamente importante o nível da resposta imune em termos de circulação de anticorpos IgG (séricos) ou IgA (local) contra a toxina-A. Pacientes com sintomas severos possuem níveis significativamente mais baixos de anticorpos séricos e nas fezes do que pacientes com sintomas leves ou moderados. Além disso, uma resposta de anticorpo sérico contra a toxina-A durante um episódio inicial de diarreia associada a *C. difficile* está ligada com a proteção contra recorrências. Também foi demonstrado que, após a colonização de um paciente pelo *C. diffi-*

cile, há uma associação entre uma resposta sistêmica à toxina-A (como evidenciado pelo aumento de níveis séricos de IgA contra a toxina-A) e portadores assintomáticos de *C. difficile*¹⁶.

A maioria das cepas toxigênicas produz ambas as toxinas. Em resumo, seus modos de ação são similares: elas são englobadas pela célula intestinal e, no seu interior, afetam o citoesqueleto de actina, resultando em morte celular. Elas também induzem a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas pró-inflamatórias (IL), as quais contribuem para a resposta inflamatória associada e a formação de pseudomembrana. A toxina-A causa necrose, aumento da permeabilidade intestinal e inibição da síntese de proteínas. Esta toxina também afeta a fosfolipase A2, estimulando a produção de prostaglandinas e leucotrienos. A toxina-A causa dano nas microvilosidades intestinais, podendo ocorrer completa erosão da mucosa. É produzido então um fluido viscoso e sanguinolento em resposta ao dano tecidual. Entretanto, no caso da toxina-B, não há relato de atividade enterotóxica, mas alguns estudos demonstraram sua ação letal em células *in vitro*^{20,21}.

As toxinas A e B são 50% idênticas no que se refere à seqüência de seus aminoácidos, possuindo estruturas primárias similares. A atividade enzimática e a citotoxicidade da toxina-B é encontrada no terminal NH₂, o qual, também, é encontrado na toxina-A. A seção mediana de ambas as toxinas inclui um domínio transmembrana, o qual é responsável pela translocação da toxina para o citosol da célula intestinal. O terminal COOH compreende o domínio de ligação ao receptor e é constituído de elementos peptídicos repetidos^{1,4,6}.

O terminal carboxi da toxina-A forma o domínio de ligação às estruturas glicídicas presentes na superfície das células epiteliais, ao passo que a toxina-B se liga às células que não são cobertas por uma matriz glicídica. Elas então entram na célula por endocitose. Ambas as toxinas necessitam passar através de um compartimento ácido intracelular para causar a intoxicação das células. Acredita-se que as toxinas A e B sejam englobadas em lisossomas e então lançadas para dentro do citosol⁶ (Figura 2).

Os maiores efeitos das toxinas A e B são a ruptura do citoesqueleto de actina. As células intoxicadas por estas proteínas demonstram uma retração do processo celular e uma circularização do corpo celular. Isso ocorre devido a desmontagem dos filamentos F de actina e um aumento de actina-G antes da circularização da célula. Poucas moléculas de toxina são necessárias para produzir esta circularização⁴. Tem sido proposto que as toxinas do *C. difficile* agem enzimaticamente dentro das células, modificando proteínas que regulam a polimerização da actina e a montagem das fibras celulares^{12,17}.

No estado de doença ativa, o epitélio do cólon é o maior alvo das toxinas do *C. difficile*. Elas causam a ruptura da barreira celular abrindo as junções interce-

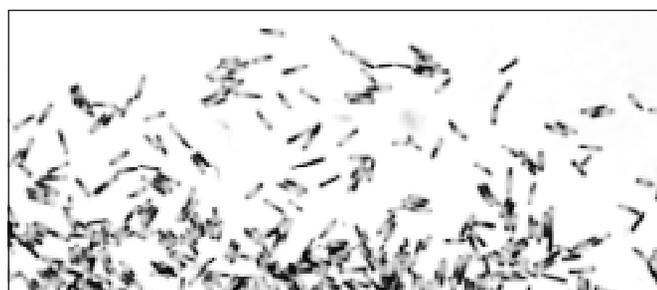


FIG. 1 - *Clostridium difficile* (microscopia corada pelo método de Gram).

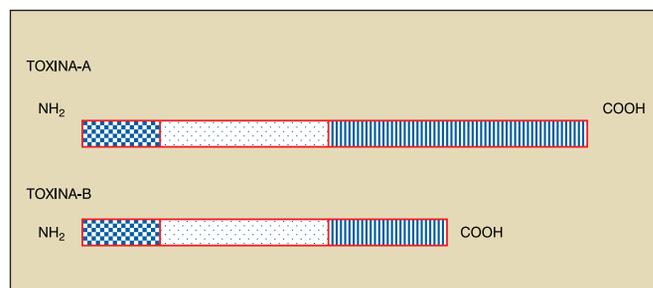


FIG. 2 - Estrutura das toxinas A e B de *C. difficile*.

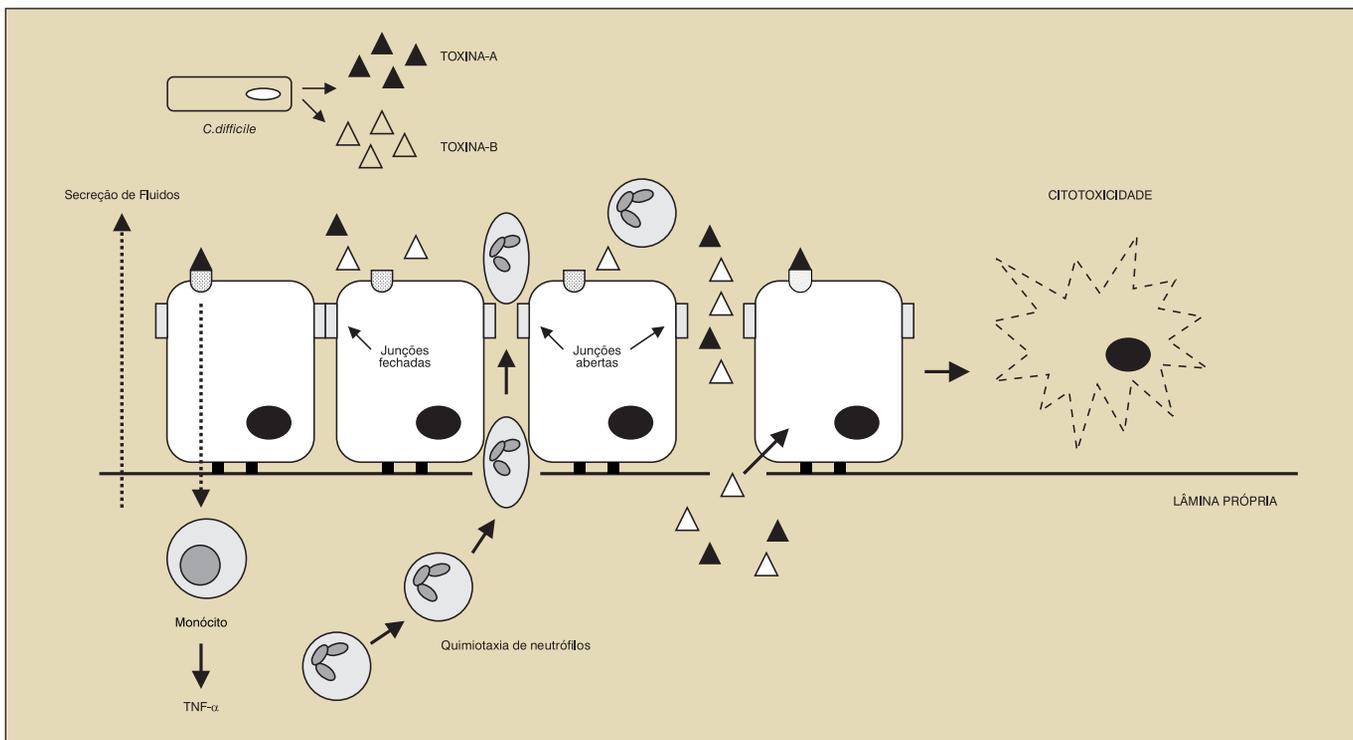


FIG. 3 - Ações das toxinas A e B de *C.difficile* no epitélio intestinal.

lulares. Este efeito aumenta a permeabilidade do cólon, levando a diarreia aquosa, a qual é um sintoma característico da diarreia associada a *C. difficile*^{16,18,22}. (Figura 3).

Para causar a colite pseudomembranosa, ambas as toxinas são normalmente necessárias. As toxinas agrirem linhagens de culturas celulares pelo mesmo mecanismo mas em comparação à potência, a toxina-B é cerca de 1.000 vezes mais potente que a toxina-A. A toxina-B tem pelo menos 100 vezes mais atividade enzimática que a toxina-A e isto leva-nos a acreditar ser este o fator determinante na diferença no potencial citotóxico^{2,6}.

A colite é caracterizada por um grande influxo de neutrófilos dentro da mucosa do cólon e na colite pseudomembranosa há um infiltrado inflamatório agudo com microabscessos e pseudomembranas ricas em neutrófilos. O movimento dos neutrófilos da circulação sanguínea para o sítio de injúria é um evento crucial durante o processo inflamatório. IL-1, IL-8, TNF e leucotrieno B4 são produtos de células residentes e sabe-se que estão envolvidos nas infiltrações de neutrófilos para dentro do sítio inflamado^{9,13,22}.

Ambas as toxinas estimulam a liberação de TNF- α pelos monócitos. A toxina-B realiza este processo com uma potência mais de 1.000 vezes maior que a toxina-A. Ambas também ativam os monócitos e macrófagos na lâmina própria para que eles liberem IL-8. Este evento causa o extravasamento de neutrófilos e a inflamação tecidual pela geração de um gradiente quimiotático que induz a migração de neutrófilos para o sítio da inflamação na mucosa^{10,15,20}.

Provavelmente a melhor defesa contra o *C. difficile* é a microbiota intestinal intacta, prevenindo o estabelecimento e a colonização resistente do *C. difficile*. A motilidade intestinal normal e a barreira gástrica também são de extrema importância como fatores de proteção do hospedeiro^{6,9}. Experiências com *hamsters* sugerem que anticorpos IgG contra a toxina-A induzidos por vacinação pode ter certo grau de proteção e que a pro-

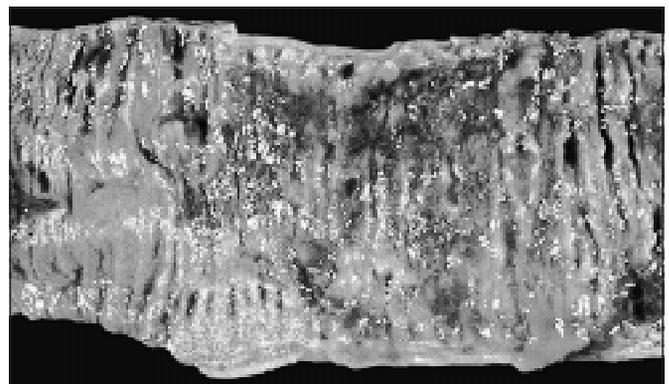


FIG. 4 - Colite pseudomembranosa (espécime post-mortem).

dução de IgA secretora contra as toxinas A e B demonstraram moderado grau de proteção em *hamsters* quando estes anticorpos eram transmitidos pelo leite. Entretanto, estes aspectos continuam em estudo para a possibilidade de uso em humanos^{17,20} (Figura 4).

Fatores de risco

Quase todos os antibióticos, exceto os aminoglicosídeos endovenosos, tem sido relacionados com o desenvolvimento de diarreia por *C. difficile*. Estudos recentes a partir de revisões sistemáticas da literatura permitiu conhecer os antibióticos mais comumente relacionados ao risco de infecção por *C. difficile*. Os antibióticos mais implicados foram os de amplo espectro que possuem um largo impacto na microbiota intestinal normal, particularmente quando administrados por via oral. Estes incluem as penicilinas, penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamase, cefalosporinas e clindamicina^{4,9}. Uma combinação de antibióticos ou a longa duração da terapia aumenta o risco de desenvolvimento da doença. A diarreia também pode ser induzida por anti-

bióticos, aos quais o *C. difficile* é susceptível *in vitro*. Este paradoxo continua incerto mas pode ser parcialmente explicado pelo supercrescimento de *C. difficile* a partir de esporos persistentes ocorrer mais rápido do que a volta da microbiota normal do cólon^{9,17,23,28}.

Fatores que têm sido significativamente associados à diarreia por *C. difficile*, em diversos estudos em todo o mundo, incluem pacientes com alteração da motilidade intestinal, idade superior a 65 anos ou com doenças subjacentes severas, cirurgias gastrointestinais, procedimentos gastrointestinais não cirúrgicos, como a presença de tubo nasogástrico e medicações anti-úlceras. Muitos destes fatores de risco têm a característica comum de interferir na barreira exercida pela microbiota normal estável do intestino^{11,16,28}. Outros fatores como a internação em unidades de terapia intensiva ou a duração da estadia no hospital podem sinalizar para uma grande exposição ao *C. difficile*. A administração de antineoplásicos, mesmo na ausência de administração concomitante com antibióticos, pode precipitar os episódios de diarreia por *C. difficile*^{3,11,16}.

Incidência das infecções por *C. difficile*

A maioria dos estudos abordando infecções por *C. difficile* tem sido realizadas em indivíduos hospitalizados. Pouca atenção tem sido dada ao papel do *C. difficile* como uma causa potencial de diarreia comunitária. A incidência de infecções por *C. difficile* na comunidade tem sido estimada em 8/100.000 pacientes por ano mas este resultado pode ser muito diferente principalmente pela ausência de estudos multicêntricos de rastreamento desta bactéria na comunidade.

Em 3 a 8% dos adultos saudáveis há presença do *C. difficile* no trato gastrointestinal^{1,7}. Em até 20% dos pacientes hospitalizados, principalmente entre aqueles que usam antimicrobianos, o bacilo pode ser isolado⁹.

Um recente estudo prospectivo na França avaliou 260 adultos em uso de antibioticoterapia e foi observado que o desenvolvimento de diarreia durante o tratamento era comum, observado em 17,5% dos pacientes. Dentre estes pacientes, cepas toxigênicas de *C. difficile* foram encontradas em 8,7% dos casos, comparado a somente 1,4% em pacientes sem episódios de diarreia^{14,16}.

A incidência de diarreia por *C. difficile* em pacientes hospitalizados varia consideravelmente, normalmente atingindo faixas de 0,1 a 2%. Estes índices incluem pacientes com diarreia severa associada a *C. difficile*, os quais requereram hospitalização, e pacientes com infecções nosocomiais por *C. difficile*^{9,22}.

Portadores e índices de contaminação

Se a incidência de infecções por *C. difficile* parece relativamente baixa em hospitais, o estado de portador e os índices de contaminação são muito maiores¹. Muitos autores têm demonstrado os índices de transmissão de *C. difficile* através de estudos prospectivos nos quais incluíram a pesquisa do bacilo em pacientes logo no momento da internação e posteriormente, uma ou duas vezes semanalmente^{9,14,16,22,28}. Nestes estudos, os índices de portadores no momento da admissão variaram entre 5,9 e 11%. Estes índices são muitos maiores do que os 3% reportados em adultos saudáveis e pode refletir a prévia administração de antibióticos ou a aquisição nosocomial de *C. difficile* durante hospitalizações prévias. Os índices de aquisição de *C. difficile* variaram com a população estudada, o uso de antibióticos e a presença de um surto na ala estudada. Na ausência

de surto, a aquisição foi estimada em 4-21%, demonstrando índices de ausência de sintomatologia em mais de 63% dos casos. Estes resultados ilustram o enorme potencial de disseminação do *C. difficile* em ambientes hospitalares. Uma vez introduzido por um paciente com diarreia, a bactéria pode ser a responsável por surtos em alas onde há pacientes susceptíveis. A transmissão de *C. difficile* de paciente a paciente tem sido confirmada por métodos de tipagem molecular^{4,30}.

C. difficile como principal agente de diarreia nosocomial

Diferentes estudos demonstram que *C. difficile* é o principal agente de diarreias nosocomiais em pacientes adultos^{9,7,11,16,28}.

C. difficile ou suas toxinas são evidenciados de 8-10% das diarreias hospitalares, enquanto que outros patógenos comuns como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. são pouco implicados neste tipo de infecção. Estes resultados levaram a Sociedade Americana de Microbiologia em conjunto com a Associação Médica Americana a recomendar a solicitação de culturas de fezes em pacientes internados. A coprocultura para patógenos entéricos comuns não deve ser realizada em pacientes hospitalizados por mais de 3 dias a menos que haja evidências clínicas ou epidemiológicas plausíveis para isso. Por outro lado, testes para *C. difficile* devem ser sistematicamente solicitados para tais pacientes^{17,22,24}.

Poucos dados estão disponíveis demonstrando o custo do tratamento das infecções por *C. difficile* em pacientes hospitalizados. O estudo mais atual, realizado em um hospital de Cambridge, Inglaterra, apontou para um custo adicional de 6.520 Euros/caso²⁸.

Reservatórios, fontes e transmissão do *C. difficile*

Os maiores reservatórios de *C. difficile* em ambientes hospitalares são os pacientes com diarreia ou portadores assintomáticos desta bactéria^{2,3}. Pacientes sintomáticos contaminam com extrema facilidade o ambiente hospitalar e os esporos podem persistir por vários meses nas superfícies. Estudos comparativos de índices de contaminação ambiental realizados em quartos de pacientes com diarreia associada a *C. difficile* e em quartos de pacientes portadores assintomáticos de *C. difficile* demonstraram que a contaminação ambiental é significativamente maior nos quartos dos pacientes com diarreia em comparação aos quartos dos pacientes portadores assintomáticos (49% versus 29%, respectivamente)^{9,14,17,21}. Estes estudos também analisaram a contaminação em quartos sem pacientes com *C. difficile* e encontraram índices de contaminação próximos a 8%, demonstrando que os esporos do bacilo podem persistir, caso não seja realizada rotina criteriosa de desinfecção dos quartos.

Sabe-se que a transmissão do *C. difficile* ocorre na maioria das vezes por via fecal-oral. Surtos em hospitais e a tipagem das cepas isoladas sugerem que a transmissão é mais freqüente através das mãos do *staff* do hospital. Um estudo multicêntrico demonstrou culturas de mãos positivas para *C. difficile* em 59% do *staff* hospitalar (particularmente médicos e enfermeiros)^{10,13}. A transmissão também pode ocorrer pelo contato direto com superfícies contaminadas. Alguns estudos também sugerem a transmissão via inoculação direta no intestino via materiais contaminados durante procedimentos cirúrgicos. Fatores que podem explicar a facilidade de transmissão incluem a resistência dos esporos aos de-

sinfetantes e antissépticos mais comuns e à pressão seletiva pelo uso de antibióticos em pacientes hospitalizados.

Diagnóstico

Muitos autores descrevem a necessidade de se testar amostras fecais à procura dos bacilos e/ou suas toxinas em casos de diarreia com duração de mais de 3 dias em pacientes hospitalizados^{8,10,11,20}.

O diagnóstico clínico da diarreia associada a *C. difficile* pode ser feito por retoscopia ou colonoscopia. A apresentação de colite pseudomembranosa também pode ser diagnosticada por visualização direta ou através da biópsia das pseudomembranas por retossigmoidoscopia ou colonoscopia. As lesões características são esbranquiçadas ou amareladas, com 2-10mm de diâmetro e elevadas, com áreas subjacentes de mucosa intestinal evidenciando mais freqüentemente aspecto inteiramente normal. Com a progressão da doença as placas aumentam, podendo coalescer. A doença pode acometer todo o cólon, mas na maioria dos casos é mais pronunciada no retossigmóide. Quando da suspeita de colite pseudomembranosa, deverá haver confirmação laboratorial^{19,23,27}.

O diagnóstico laboratorial convencional é baseado no isolamento do *C. difficile* em espécimes fecais através de cultura e pela detecção de toxinas^{2,3,6,9,22}. Outros testes indiretos têm sido propostos, tais como a cromatografia gasosa em espécimes fecais, aglutinação em látex ou tomografia computadorizada, mas estes métodos não possuem suficiente sensibilidade e especificidade para serem aceitos a menos que sejam usados em adição aos testes convencionais^{7,9,11}.

Para um diagnóstico laboratorial de excelência, somente fezes líquidas devem ser aceitas, com exceção dos casos sob investigação epidemiológica. Devido à rápida perda de atividade da citotoxina, somente espécimes frescos devem ser processados e estes devem ser estocados a 4°C ou menos, nos casos onde os testes não puderem ser realizados rapidamente. Estudos reportam a completa inativação da citotoxina em cerca de 20% das amostras enviadas pelo correio, no caso de laboratórios que utilizam serviços terceirizados. Por outro lado, as culturas de *C. difficile* não são afetadas pela estocagem em ambiente devido à resistência dos seus esporos^{2,26,29,30}.

a) Cultura

Logo após o descobrimento do potencial patogênico de *C. difficile*, foi proposto um meio de cultura seletivo chamado CCFA (cicloserina-cefoxitina-frutose ágar) para o isolamento desta bactéria a partir de amostras fecais. Este meio ainda é extremamente útil na maioria dos laboratórios²⁹. Os agentes seletivos são a cicloserina (500mg/L) e a cefoxitina (16mg/L). Estas concentrações foram diminuídas para 250mg/L e 8mg/L, respectivamente, em alguns estudos, com a finalidade de melhor recuperação, principalmente de algumas células de *C. difficile* estressadas. A formulação original incluía gema de ovo, a qual pode ser substituída por sangue. O meio está disponível comercialmente através de diversas empresas do setor de diagnóstico microbiológico. Os swabs retais não são adequados para este método, devendo ser sempre colhidas as fezes líquidas. A amostra fecal é inoculada diretamente e as placas incubadas em anaerobiose por 48 horas. A pré-incubação das placas não semeadas em anaerobiose pode aumentar a taxa de isolamento bacteriano. Muitas modificações têm sido propostas para aumentar a sensibilidade da cultura^{25,27}.

A adição de taurocolato de sódio ou colato puro em concentrações de 1g/L permite uma melhor germinação dos esporos e é recomendado para amostras ambientais ou em casos de cultura negativa com teste de citotoxina positivo²⁹. O sal sódico do ácido cólico é tão efetivo quanto o taurocolato na estimulação da germinação dos esporos e tem um custo menor. O pré-tratamento das fezes com etanol (igual volume de etanol e fezes, homogeneizadas por 1 hora antes da inoculação) têm demonstrado aumento na sensibilidade da cultura^{2,7,26,29}. No entanto, é importante ressaltar que o uso do meio tradicional e com as técnicas convencionais de semeadura tem-se um diagnóstico satisfatório. A cultura é o método mais sensível, mas não é muito específica devido à possibilidade de isolamento de cepas não toxigênicas. As cepas isoladas devem ser testadas quanto à toxigenicidade. Entretanto, a cultura é o único meio para a obtenção de dados concretos em investigações epidemiológicas. As colônias de *C. difficile* são facilmente reconhecidas no meio CCFA devido à sua morfologia típica (aparência de "vidro quebrado"), especialmente quando observadas com lupa ou microscópio estereoscópico. Fluorescência amarelo-esverdeada sob luz ultravioleta é uma outra característica das colônias mas que pode variar com o meio de cultura utilizado^{3,20,29}. O odor típico (de "estrupe de cavalo") também é útil na identificação²⁹. A cromatografia gasosa feita com pedaços de ágar retirado próximo das colônias suspeitas é o melhor método para a confirmação da identificação. *C. difficile* possui um perfil típico na cromatografia gasosa demonstrando a produção de grandes quantidades de ácidos butírico e iso-capróico^{23,25,27}. Tal equipamento, entretanto, somente está disponível em poucos laboratórios. Testes bioquímicos individuais ou painéis anaeróbicos em equipamentos de automação podem ser usados com grande eficiência, bem como testes de látex na pesquisa de antígenos somáticos. Reações cruzadas, no entanto, têm sido documentadas no uso destes últimos^{3,7,11,16}. Enzaimunoenensaio direto para a toxina-A também pode ser usado nas colônias, mas obviamente, somente evidenciará isolados toxigênicos.

b) Detecção de toxinas em cultura de células

A detecção de citotoxinas é frequentemente considerada como padrão para o diagnóstico das infecções por *C. difficile*. Este método consiste na inoculação de filtrado de uma suspensão de fezes em cultura de células e pela observação de efeito citopático como uma consequência da ruptura do citoesqueleto celular, o que resulta da deformação das linhagens celulares utilizadas^{2,8,13}. Estes efeitos ocorrem principalmente devido à toxina-B, a qual é 1.000 vezes mais citotóxica que a toxina-A. Quase todas as linhagens celulares usadas em laboratórios de microbiologia clínica podem ser usadas, tais como Vero, Hep2, fibroblastos, CHO ou HeLa. Entretanto, as células Vero são consideradas por muitos autores como a linhagem mais sensível. Uma suspensão 1:5 da amostra fecal é feita em tampão salina-fosfato e, após centrifugação, o sobrenadante é filtrado através de uma membrana com poro de 0,22µm. O filtrado é então inoculado na monocamada celular e a presença ou ausência de efeito citotóxico é observada dentro de 24-48 horas. Nos casos clínicos mais severos, estes efeitos podem surgir após 4-6 horas. A confirmação da especificidade é obtida pela repetição do teste com a adição de um antisoro específico direcionado contra *C. difficile* ou contra *C. sordellii* (pois ambos compartilham os mesmos antígenos). O método possui muitas vantagens. É sensível e específico e pode detectar outras to-

xinas. Por outro lado, é um método relativamente mais demorado em comparação com o teste imunoenzimático. Além disso, efeitos citopáticos não específicos (não neutralizados pelo antisoro) podem ser observados em cerca de 2% dos casos, levando à impossibilidade de qualquer interpretação. A necessidade de manutenção das linhagens celulares, a qual consome tempo e moderado investimento, é outra desvantagem, especialmente se somente um pequeno número de espécimes é processado pelo laboratório^{2,8,17,28,30}.

c) Detecção de toxinas por enzimaensaio

Nos últimos 10 anos, muitos testes de enzimaensaio foram lançados no mercado. A maioria utiliza anticorpos monoclonais antitoxina-A, enquanto poucos são desenvolvidos para detectar ambas as toxinas. Finalmente, em um dos últimos kits lançados, a detecção da toxina-A é acompanhada pela detecção da glutamato-desidrogenase, uma enzima específica de *C. difficile* encontrada em isolados toxigênicos e não toxigênicos. A razão do lançamento dos kits que detectam ambas as toxinas se baseia no fato de alguns isolados clínicos produzirem somente a toxina-B. Alguns testes de enzimaensaio são apresentados individualmente, outros em microplacas com 96 orifícios. Uma das maiores vantagens desta metodologia é a possibilidade de se obter resultados em cerca de 20 minutos em média. Há inúmeras publicações demonstrando a performance de diferentes kits^{2,4,9,11,17,22,25,30}. Quando comparados à detecção de citotoxinas em culturas de células, os diferentes testes de enzimaensaio são somente pouco menos sensíveis. Apesar disso, a principal vantagem desta metodologia é a possibilidade de realizar um *screening* rápido das amostras suspeitas. No entanto, estes testes devem ser sempre realizados paralelamente à cultura e, quando o teste de enzimaensaio for negativo e a cultura positiva, o teste deve ser refeito, testando-se as colônias isoladas no meio de cultura^{9,13,16}.

d) Métodos moleculares

Os métodos moleculares para o diagnóstico das diarreias associadas a *C. difficile*, têm sido alvo de menos

estudos do que aqueles usados para o diagnóstico de outras doenças infecciosas^{4,17,30}. Isto se dá provavelmente devido a resultados satisfatórios obtidos através dos métodos clássicos, além da dificuldade de aplicação em espécimes fecais, conhecidos por interferir com procedimentos de amplificação. Muitos métodos baseados em amplificação de parte do gen da toxina-A tem sido efetivos para a distinção de isolados toxigênicos dos não toxigênicos, mas os dados comprovam que há poucas vantagens sobre os métodos laboratoriais de rotina^{2,7,11,24,29} (Figuras 5 e 6).

Prevenção da infecção cruzada

Entre as medidas a serem adotadas para a prevenção das infecções por *C. difficile*, o uso restritivo de antibióticos, especialmente aqueles considerados de alto risco para manifestação da infecção, torna-se absolutamente necessário^{13,24}. Esta tem sido a medida mais efetiva para a diminuição da incidência das infecções por esta bactéria.

Outras medidas, como o uso de luvas de vinil ou o isolamento de pacientes com diarreia associada a *C. difficile*, além do uso de materiais esterilizados e de hipoclorito para a desinfecção ambiental têm sido efetivas no controle de surtos ou diminuição das infecções por *C. difficile*^{9,21,24}.

O tratamento dos portadores assintomáticos não é recomendado. Inúmeros estudos comprovam a ineficácia do uso profilático de metronidazol na erradicação de *C. difficile* em portadores assintomáticos^{7,9,21}.

C. difficile é o patógeno entérico mais comum em pacientes hospitalizados. A transmissão paciente a paciente é muito fácil e os esporos tem um papel importante na infecção cruzada pelo fato de poderem sobreviver por muitos meses no ambiente. Medidas de controle incluem o uso criterioso de antibióticos, diagnóstico realizado com rapidez, isolamento do paciente, tratamento dos pacientes infectados e implementação de precauções mais rígidas de desinfecção de superfícies^{11,20,21}.

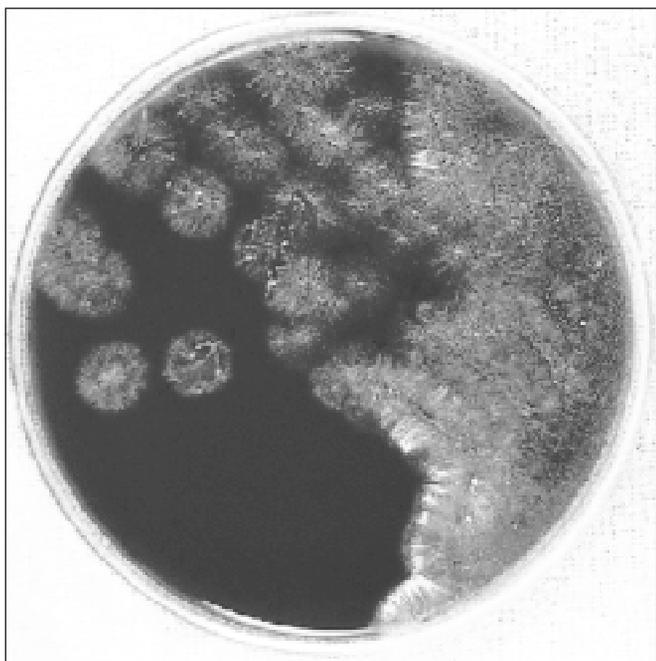


FIG. 5 - Colônias características de *Clostridium difficile* em ágar CCFA.

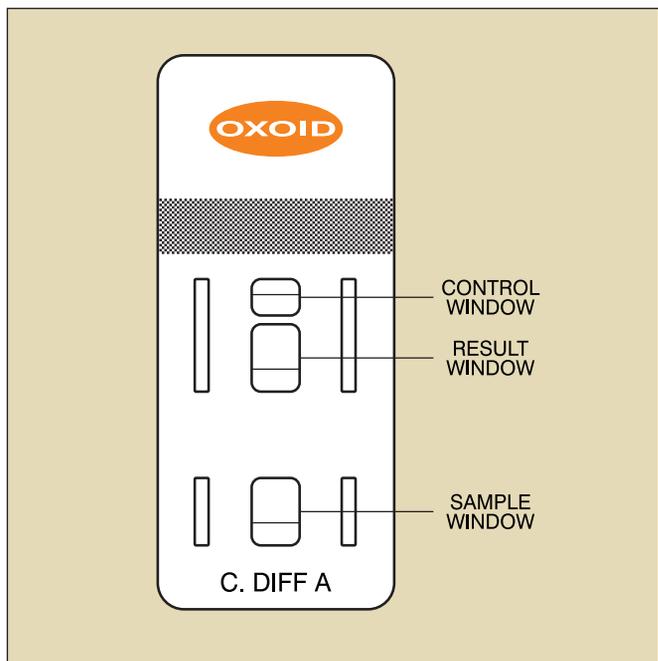


FIG. 6 - Enzimaensaio para detecção de toxina-A de *C. difficile*.

O tratamento dos casos de doença por *C. difficile* é variável na dependência da apresentação clínica. Medidas gerais, como a suspensão do agente causal e a reposição de fluidos, podem ser eficazes sem a necessidade de tratamento específico^{1,9,21,24}.

Diversos autores indicam o metronidazol, na dose de 250mg de 6/6 horas por 10 dias, como a droga de primeira escolha para formas leves e os quadros de recorrências^{21,24,27,28}. Esta medida visa principalmente a redução do uso da vancomicina como forma de prevenção de resistência em enterococos (VRE) e estafilococos, (GISA) associados com o seu uso indiscriminado. Em casos graves deve ser empregada a vancomicina por apresentar resposta mais favorável. A vancomicina também deve ser usada nos casos que não respondem, são resistentes ou nos quais o metronidazol não é tolerado ou deve ser evitado (gravidez, por exemplo). Como não existe a apresentação para administração oral no Brasil, habitualmente é utilizada a apresentação injetável por via oral na dose de 500mg a cada 6 horas. A administração da vancomicina por via oral deve-se ao fato da pobre concentração da droga no cólon quando administrada pela via endovenosa. São desaconselhados empregos de inibidores de peristaltismo (atropina-difenoxilato) e opiáceos, uma vez que podem mascarar os sintomas e causar acúmulo de fluidos carregados de toxinas no cólon^{7,9}.

A intervenção cirúrgica está indicada nos quadros de megacólon tóxico ou perfuração do cólon⁹.

Frente a um caso de diarreia em pacientes hospitalizados e em uso de antimicrobianos, a investigação diagnóstica deve ser realizada com a pesquisa de toxina em duas amostras de fezes consecutivas. Nos casos fortemente suspeitos com pesquisa negativa de toxina e nos pacientes em que não há obtenção de fezes, a investigação não é possível e deve ser completada com a retossigmoidoscopia^{1,19,23,24}.

Estima-se que de 2 semanas a 3 meses após o término do tratamento podem ser detectadas recorrências em até 20% dos pacientes. As recidivas moderadas podem resolver-se espontaneamente, porém, nos pacientes com colite, diarreia grave ou persistente, há a necessidade de tratamento. Uma vez confirmada a recorrência, deve-se cessar a administração dos medicamentos que possam favorecer a diarreia^{4,5,8}.

Tem sido demonstrada a utilização de diversas preparações (administradas por via oral e retal) destinadas a restaurar a microbiota intestinal e torná-la mais resistente à colonização pelo *C. difficile*, sendo, portanto terapias adicionais a antibioticoterapia. O uso de *Lactobacillus rhamnosus* [cepa GG] (1g 6/6 horas durante 3 semanas) tem demonstrado resultados favoráveis em casos graves e parece ter efeito sensivelmente superior do que o uso de *yogurte* ou outros lactobacilos^{6,9,11,15}.

Os pacientes com diagnóstico de doença por *C. difficile* devem permanecer em precauções de contato, o que inclui o uso de luvas e capote durante qualquer manipulação do paciente. Estudos das mãos de profissionais de saúde cuidando de pacientes com doença por *C. difficile* evidenciaram a presença do bacilo em mais da metade dos profissionais^{14,17,21}.

A lavagem de mãos dos profissionais de saúde deve ser realizada com solução degermante (PVP-I ou clorexidina), e o piso e superfícies horizontais (mesas, cadeiras, camas) devem sofrer desinfecção diária, principalmente em pacientes incontinentes, que devem permanecer em quarto separado, evitando assim a disseminação nosocomial deste importante microrganismo^{2,14,24}.

REFERÊNCIAS

1. Al-Barrak, A.; Embil, J.; Dyck, B. et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. *Can. Commun. Dis. Rep.* 25:65-9. 1999.
2. Alfa, M. J.; Kabani, A.; Lyerly, D. et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38:2706-14. 2000.
3. Anand, A.; Glatt, A. E. *Clostridium difficile* infection induced by cancer chemotherapy: a review. *Clin. Infect. Dis.* 142:333-5. 1993.
4. Arzese, A.; Trani, G.; Riul, L.; Botta, G. A. Rapid polymerase chain reaction method for specific detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:716-19. 1995.
5. Barbut, F.; Kajzer, C.; Planas, N.; Petit, J. C. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 31:963-7. 1993.
6. Barbut, F.; Lalande, V.; Daprey, G. et al. Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19:481-4. 2000.
7. Barbut, F.; Leluan, P.; Antonioti, G.; Collignon, A. Value of routine stool culture in hospitalized patients with diarrhea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:10-3. 1995.
8. Barbut, F.; Macé, M.; Lalande, V.; Petit, J. C. Rapid detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens. *Clin. Microbiol. Infect.* 3:480-3. 1997.
9. Barc, M. C.; Depitre, C.; Corthier, G.; Bourlioux, P. Effects of antibiotics and other drugs on toxin production in *Clostridium difficile* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1332-5. 1992.
10. Bentley, A. H.; Patel, N. B.; Sidorczuk, M. et al. Multicentre evaluation of a commercial test for the rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-mediated antibiotic-associated diarrhea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:788-90. 1998.
11. Bignardi, G. E. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J. Hospital Infect.* 40:1-15. 1998.
12. Brazier, J. S. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. *Clin. Infect. Dis. Suppl.* 4S228-33. 1993.
13. Cartmill, T. D. I.; Panigrahi, H.; Worsley, M. A.; Keith, E. Management and control of a large outbreak of diarrhoea due to *Clostridium difficile*. *J. Hospital Infect.* 27:1-15. 1994.
14. Clabots, C. R.; Johnson, S.; Olson, M. M.; Gerding, D. L. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J. Infect. Dis.* 166:561-7. 1992.
15. Fan, K.; Morris, A. J.; Reller, L. B. Application of rejection criteria for stool cultures for bacterial enteric pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 31:2233-5. 1993.
16. Gerding, D. N.; Johnson, S.; Peterson, L. R.; Silva, J. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 16:459-77. 1995.
17. Green, G. A.; Riot, B.; Monteil, H. Evaluation of an oligonucleotide probe and an immunological test for direct detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 13:576-81. 1994.
18. Gumerlock, P. H.; Tang, Y. J.; Weiss, J. B.; Silva, J. Specific detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 31:507-11. 1993.
19. Kyne, L.; Warny, M.; Qamar, A.; Kelly, C. P. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet.* 357:189-93. 2001.
20. Kyne, L.; Warny, M.; Qamar, A.; Kelly, C. P. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin. *N. Engl. J. Med.* 342:390-7. 2000.
21. Mayfield, J. L. I.; Leet, T.; Miller, J.; Mundy, M. M. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 31:995-1000. 2000.
22. Peterson, L. R.; Kelly, P. J.; Nordbrock, H. A. Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 330-6. 1996.
23. Spencer, R. C. Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile*-associated disease. *J. Antimicrobial Chemother.* 41 (Suppl. C):5-12. 1998.
24. Silva, C. H. P. M. *Bacteriologia, um texto ilustrado*. Rio de Janeiro: Ed. Eventos, 1999.
25. Staneck, J. L.; Weckbach, L. S.; Allen, S. D. et al. Multicenter evaluation of four methods for *Clostridium difficile*, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 34:2718-21. 1996.
26. Thibault, A.; Miller, M. A.; Gaese, C. Risk factors for the development of *Clostridium difficile*-associated diarrhea during a hospital outbreak. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 12:345-8. 1991.
27. Vanpoucke, H.; De Baere, T.; Claeys, G.; Vershraegen, G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens. *Clin. Microbiol. Infect.* 7:55-64. 2001.
28. Wilcox, M. H.; Cunniffe, J. G.; Trundle, C.; Redpath, C. Financial burden of hospital acquired *Clostridium difficile* infection. *J. Hospital Infect.* 34:23-30. 2000.
29. Wilson, K. H.; Kennedy, M. J.; Fekety, R. F. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 15:443-6. 1982.
30. Wolfhagen, M. J.; Fluit, A. C.; Torensma, R.; Verhoef, J. Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* in fecal samples by magnetic immuno-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 32:1629-33. 1994.

Endereço para correspondência

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva

Rua Fortunato Ramos, 123 - Santa Lúcia - 29055-290 - Vitória, ES

E-mail: chpmstrz@terra.com.br

Adaptação dos métodos da contagem na gota e da alça calibrada para a contagem de lactobacilos e estreptococos do grupo mutans da saliva*

Adaptation of drop-plate and calibrated loop methods for enumerating lactobacilli and mutans streptococci group of saliva

Celso Luíz Cardoso¹; Andréia Guerra²; Márcio Guilhermetti³; Maria Cristina Bronharo Tognim¹ & Lourdes Botelho Garcia¹

RESUMO – Apesar de se encontrar amplamente reconhecido a importância do emprego dos testes de contagem de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva para avaliar o risco de pacientes à cárie dentária, no Brasil, por fatores técnicos e econômicos estes testes são pouco utilizados na prática odontológica e também pouco divulgados junto aos laboratórios de análises clínicas. Com objetivo de investigar uma técnica simplificada para quantificar estes microrganismos na saliva, comparamos as adaptações das técnicas da contagem na gota e da alça calibrada com os métodos padrões de contagem de lactobacilos e estreptococos do grupo mutans. Foram analisados 30 espécimes de saliva estimulada, obtidos de 30 indivíduos que apresentaram alto ($n = 20$), médio ($n = 6$) e baixo ($n = 4$) risco de cárie. Não houve diferenças significativas entre os resultados das contagens ($P > 0,05$), indicando que as adaptações das técnicas da contagem na gota e da alça calibrada descritas em nosso estudo podem ser empregadas no laboratório de análises clínicas como uma alternativa simplificada e de baixo custo para a contagem de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva.

PALAVRAS-CHAVE – Saliva, lactobacilos, estreptococos do grupo mutans, cárie dentária.

SUMMARY – Counting of lactobacilli and mutans streptococci group from saliva to evaluate the patients' caries risk is currently very important. In Brazil these tests are little used in odontological practice and clinical laboratory for economical and technical factors. We compared the adaptations of drop-plate and calibrated-loop techniques with standard methods of counting of lactobacilli and mutans streptococci group from saliva to investigate a simplified technique for counting these microorganisms from saliva. Thirty saliva specimens collected from 30 individuals with high ($n = 20$), medium ($n = 6$) and low ($n = 4$) caries risk were analysed. Since there are no significant differences in counts ($P > .05$), adaptations of drop-plate and calibrated-loop techniques described in our study may be used in clinical laboratory as a simplified and low cost technique for quantification of lactobacilli and mutans streptococci group from saliva.

KEYWORDS – Saliva, lactobacilli, mutans streptococci group, dental caries.

INTRODUÇÃO

Atualmente, encontra-se amplamente reconhecida a importância do emprego dos testes de contagem de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva para avaliar o risco de pacientes à cárie dentária^{3,5,7,13,15,17,18,22}. Entretanto, no Brasil, por fatores técnicos e econômicos estes testes são pouco utilizados na prática odontológica e também pouco divulgados junto aos laboratórios de análises clínicas.

O método clássico para a quantificação de lactobacilos da saliva, descrito por Rogosa *et al.*¹⁶, envolve o preparo de diluições 10^0 a 10^{-2} da amostra de saliva, semeadura por técnica de "pour-plate" em ágar Rogosa, incubação na estufa em aerobiose a 37°C durante 72 horas e contagem de colônias. A confirmação das colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Lactobacillus* é feita pela coloração de Gram.

A técnica de contagem de estreptococos do grupo mutans da saliva foi originalmente proposta por Gold *et al.*⁶ Neste método, diluições 10^0 a 10^{-3} da saliva são semeadas na superfície de placas contendo ágar *mitis salivarius* adicionado de 15% de sacarose e de 0,2 unidades/mL de bacitracina. A contagem das colônias é feita após incubação das placas em anaerobiose, na estufa a 37°C , durante 48 horas.

Com objetivo de investigar uma técnica simplificada e de baixo custo para a quantificação de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva, de forma a estimular o uso destas técnicas no laboratório de análises clínicas, comparamos no presente estudo adaptações das técnicas da contagem na gota e da alça calibrada com os métodos clássicos de contagem padrão de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras. Foram analisadas 30 amostras de saliva obtidas de 30 pacientes atendidos na Clínica Odontológica da Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá, PR, incluindo pacientes de alto ($n = 20$), médio ($n = 6$) e baixo ($n = 4$) risco de cárie. A idade dos pacientes variou de 6 a 56 anos, sendo 15 indivíduos do sexo masculino e 15 do sexo feminino.

Coleta da saliva estimulada. Foi realizada por mastigação de um pedaço de parafina estéril (cubos com aproximadamente 1,5g), durante 5 minutos,²² observando-se, para todos os pacientes, o intervalo de duas horas após a última ingestão de alimentos para a coleta da amostra da saliva¹⁹.

Recebido em 9/12/2002

Aprovado em 18/2/2003

*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia, Sala 116, Bloco I-90, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá (UEM);

¹Professor do Departamento de Análises Clínicas da UEM; ²Acadêmica do curso de Farmácia da UEM. Bolsista PIBIC/CNPq-UEM;

³Farmacêutico-Bioquímico do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

Experimento I

Contagem de lactobacilos

Como método de referência para a contagem de lactobacilos foi utilizada, em duplicata, a técnica de "pour plate" descrita por Rogosa *et al.*¹⁶ A amostra da saliva foi homogeneizada, durante 30 segundos, em agitador de tubos tipo "mixer" (Donner mod. AD8850; Donner Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, SP), sendo a seguir preparadas diluições decimais seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) a partir da mistura de 0,2 ml da saliva com 1,8 ml de solução de cloreto de sódio 0,85% (solução salina). Volumes de 0,1 ml da saliva pura e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram, respectivamente, depositados em 3 placas de Petri 100 x 15 mm e adicionados de 20 ml de ágar SL Rogosa⁴ (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) liquefeito e resfriado a 45-50°C. Após homogeneização e solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas em aerobiose na estufa a 37°C, por 72 horas, selecionando-se para contagem as placas contendo 30 a 300 unidades formadoras de colônias (UFC). Em paralelo, foram testadas as adaptações das técnicas:

- i) *Contagem na gota.* Foi feita com base nos trabalhos de Miles *et al.*¹⁴ e de Westergren & Krasse,²¹ semeando-se 2 gotas de 0,02 ml da saliva pura e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} na superfície de 10 ml de ágar SL Rogosa distribuídos em placas de Petri 100 x 15 mm;
- ii) *Alça calibrada.* Foi realizada com base nas recomendações de Hoeprich⁸ e de Westergren & Krasse²¹, adotando-se o seguinte procedimento: com auxílio de alça calibrada de 1 µl, a amostra da saliva foi semeada, em duplicata, na metade da superfície de uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 10 ml de ágar SL Rogosa. A semeadura foi feita 4 vezes, sem recarregar ou flambar a alça, inoculando-se por estrias nos planos paralelo, perpendicular, diagonais direito e esquerdo em relação ao diâmetro da placa. Esta operação foi repetida em outra placa usando-se alça de 10 µl. Em ambas as técnicas testadas, após a secagem do inóculo, adicionou-se a cada placa uma camada de 10 ml de ágar SL Rogosa liquefeito e resfriado a 45-50°C. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em aerobiose, na estufa a 37°C, por 72 horas, selecionando-se para contagem as gotas contendo 6 a 60 UFC e as placas semeadas com alça que apresentaram 15 a 150 UFC. A confirmação dos lactobacilos foi feita pela observação das características morfológicas (coloração de Gram¹) de 1 a 2 colônias representativas por placa. Os resultados foram expressos pelo \log_{10} do número de UFC por mililitro de saliva.

Experimento II

Contagem de *Streptococcus mutans*

Como método de referência para a contagem de *S. mutans* foi empregado, em duplicata, a técnica padrão de contagem em placas, utilizando-se ágar *mitis salivarius*⁴ adicionado de 0,2 UI/ml de bacitracina (Bik Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP) e de 15% de sacarose (Difco), denominado de ágar *mitis salivarius* bacitracina (MSB), conforme descrito por Gold *et al.*⁶ Volumes de 0,1 ml das diluições 10^{-1} a 10^{-3} , preparadas com solução salina, foram semeados em duplicata na superfície de 20 ml de ágar MSB distribuídos

em placa de Petri 100 x 15 mm. A semeadura foi realizada com pipeta, inoculando-se por estrias, nos planos paralelo, perpendicular e diagonal ao diâmetro da placa. O material foi colocado em jarra de anaerobiose, lavado 3 vezes com nitrogênio e adicionado da mistura de 80% de nitrogênio, 10% de gás carbônico e 10% de hidrogênio (Aga S. A., Rio de Janeiro, RJ) e incubado na estufa a 37°C por 48 horas, selecionando-se para contagem as placas com 30 a 300 UFC. Em paralelo foram testadas as adaptações das técnicas:

- i) *Contagem na gota.* Foi feito com base nos trabalhos de Miles *et al.*¹⁴ e de Westergren & Krasse²¹, semeando-se 2 gotas de 0,02 ml das diluições 10^{-1} a 10^{-3} na superfície de 20 ml de ágar MSB;
- ii) *Alça calibrada.* Foi feita com base nas técnicas descritas por Hoeprich⁸ e Westergren & Krasse,²¹ utilizando-se o seguinte procedimento: com auxílio de alça calibrada de 1 µl, a amostra da saliva foi semeada, em duplicata, na metade da superfície de uma placa de Petri 100 x 15mm contendo 20 ml de ágar MSB. A semeadura foi feita 4 vezes, sem recarregar ou flambar a alça, inoculando-se por estrias nos planos: paralelo, perpendicular e diagonais direito e esquerdo em relação ao diâmetro da placa. Esta operação foi repetida em outra placa, empregando-se a diluição 10^{-1} da saliva. Em ambas as técnicas testadas, após a secagem do inóculo, as placas foram incubadas em condições idênticas àquelas descritas no método de referência, selecionando-se para contagem as gotas com 6 a 60 UFC e as placas, semeadas com alça que apresentaram entre 15 a 150 UFC. Os resultados foram expressos pelo \log_{10} do número de UFC por mililitro de saliva.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo emprego do teste "t-student" com nível de significância de 5% e pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r), utilizando-se o programa "Statistica", Windows, versão 2.3, 1993 (State Soft Inc., Tulsa, Okla, USA).

RESULTADOS

Os resultados das contagens de lactobacilos, expressos pelo \log_{10} da média de duas determinações das 30 amostras de saliva analisadas, foram os seguintes: $3,70 \pm 1,43$ (método padrão), $3,65 \pm 1,36$ (contagem na gota) e $3,72 \pm 1,37$ (alça calibrada). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens ($P < 0,05$). Conforme mostrado na Figura 1, as contagens de lactobacilos obtidas com as adaptações das técnicas da contagem na gota ($r = 0,98$) e da alça calibrada ($r = 0,99$) apresentaram excelente correlação com a técnica de "pour plate" que foi usada como o método padrão de contagem.

A determinação do número de estreptococos do grupo mutans da saliva, expressos pelo \log_{10} da média de duas contagens das 30 amostras de saliva examinadas, foi de $4,85 \pm 0,60$ para o método padrão, $4,60 \pm 0,58$ para a técnica da contagem na gota modificada e de $4,79 \pm 0,57$ para a adaptação da técnica da alça calibrada, não sendo estas diferenças estatisticamente significativas em nível de 5%. Os resultados encontrados com os métodos da contagem na gota ($r = 0,78$) e da alça calibrada ($r = 80$) apresentaram boa correlação com aquele obtido pela técnica de contagem padrão, usada como método de referência (Figura 2).

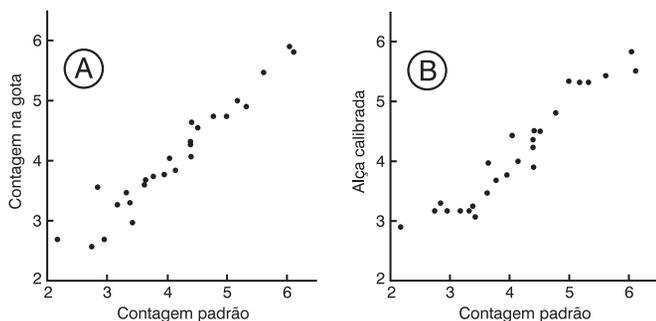


FIG. 1 - Correlação entre os resultados das contagens de viáveis de lactobacilos da saliva obtidos com o método de referência (abscissa) e as técnicas adaptadas (ordenada): (A) Contagem na gota, $r = 0,99$; (B) Alça calibrada, $r = 0,98$. Valores expressos em Log_{10} da média de duas contagens.

DISCUSSÃO

Entre os métodos preconizados para a determinação do número de células viáveis de uma população microbiana, a técnica da contagem na gota destaca-se por sua precisão e reprodutibilidade. Esta técnica foi originalmente descrita em 1938 por Miles *et al.*¹⁴ em um estudo que tinha por objetivo estimar o poder bactericida do sangue humano em amostras de *Staphylococcus aureus*. A técnica consiste basicamente em semear, com auxílio de pipeta, seis gotas de 0,02 ml de cada diluição decimal seriada da suspensão bacteriana a ser quantificada, na superfície de placas contendo ágar nutriente. Em 1973, Bousfield *et al.*² propuseram a substituição das pipetas convencionais usadas na técnica da contagem na gota por pipetas semi-automáticas. Com base nestes estudos Westergren & Krasse²¹ desenvolveram em 1978 um micrométodo para a contagem de lactobacilos e de *Streptococcus mutans* da saliva.

A técnica da alça calibrada foi introduzida na prática bacteriológica em 1960 por Hoeprich,⁸ como uma alternativa simplificada e de baixo custo à clássica técnica de diluição e semeadura por "pour plate" utilizada para a quantificação de bactérias em culturas de urina. A adaptação desta técnica para a contagem de lactobacilos e de *Streptococcus mutans* da saliva, pelo menos em nosso conhecimento, não é descrito na literatura.

No experimento I (lactobacilos), os resultados obtidos com a técnica da contagem na gota foram comparáveis àqueles descritos no micrométodo proposto por Westergren & Krasse²¹ no qual os autores preconizam o uso de pipetas semi-automáticas. A vantagem do emprego de pipetas convencionais em relação às semi-automáticas é que elas proporcionaram um maior diâmetro das áreas semeadas, facilitando as contagens. Em nosso estudo, na leitura das placas observamos gotas com diâmetros de aproximadamente 15-20 mm contra diâmetros de 10 mm descritos no micrométodo²¹.

Indivíduos pertencentes ao grupo de alto risco de cárie apresentam contagens de lactobacilos na saliva iguais ou superiores a 100.000 UFC/ml²³. Em nosso estudo, pacientes com 100.000 UFC/ml de lactobacilos na saliva proporcionaram contagens de 20 UFC na diluição 10^{-2} (método da gota) e de 100 UFC na placa semeada com alça de 1 μl . Aqueles classificados no grupo de médio risco de cárie, i.e., indivíduos com contagens salivares de 10.000 a 50.000 UFC/ml de lactobacilos²³, foram detectados nas diluições 10^{-1} ou 10^0 da saliva na técnica da gota e na placa semeada com alça de 10 μl .

Com base nos resultados encontrados no experimento I, sugerimos o seguinte procedimento para efetuar a

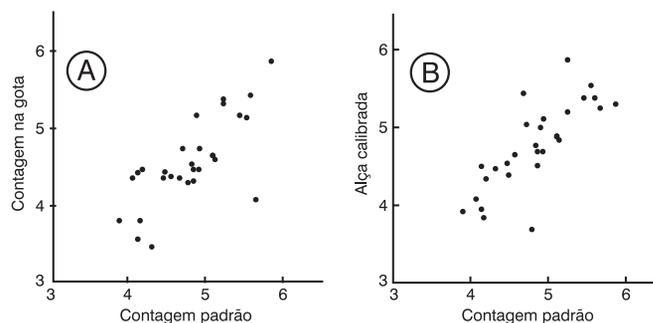


FIG. 2 - Correlação entre os resultados das contagens de viáveis de estreptococos do grupo mutans da saliva obtidos com o método de referência (abscissa) e as técnicas adaptadas (ordenada): (A) Contagem na gota, $r = 0,78$; (B) Alça calibrada, $r = 0,80$. Valores expressos em Log_{10} da média de duas contagens.

contagem dos lactobacilos a partir da amostra de saliva estimulada:

- i) *Técnica da contagem na gota* - usar para cada teste uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 10 ml de ágar SL Rogosa. Dividir o fundo externo da placa em três partes. Homogeneizar a amostra de saliva estimulada durante 30 segundos em agitador de tubos ("mixer") e semear duas gotas de 0,02 ml na primeira parte da placa. Repetir o procedimento semeando duas gotas de 0,02 ml da diluição 10^{-1} na segunda parte e 0,02 ml da diluição 10^{-2} na terceira parte da placa. Para usar apenas uma pipeta, iniciar a semeadura da placa pela diluição 10^{-2} . Após a secagem do inóculo, adicionar 10 ml de ágar SL Rogosa, liqüefeito e resfriado a 45-50°C. Após a solidificação do meio, incubar a placa em aerobiose, na estufa a 37°C, durante 72 horas. Efetuar a leitura da placa conforme descrito anteriormente no experimento I;
- ii) *Técnica da alça calibrada* - empregar, para cada amostra de saliva estimulada, uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 10 ml de ágar SL Rogosa. Dividir o fundo externo da placa ao meio. Homogeneizar a amostra da saliva em "mixer" por 30 segundos. Com auxílio de alça de 1 ml semear a metade da placa em quatro planos, conforme descrito no experimento I. Repetir esta operação na outra metade da placa utilizando alça de 10 ml. Após a secagem do inóculo, adicionar 10 ml de ágar SL Rogosa, liqüefeito e resfriado a 45-50°C. Após a solidificação do meio, incubar a placa em aerobiose, na estufa a 37°C e realizar a leitura conforme descrito no experimento I.

A exemplo do experimento I, os resultados obtidos com a técnica da contagem na gota no experimento II (estreptococos do grupo mutans) foram semelhantes àqueles descritos por Westergren & Krasse.²¹ Indivíduos com contagens salivares de estreptococos do grupo mutans na faixa de 250.000 a 1.000.000 de UFC/ml são considerados como pertencentes ao grupo de alto risco de cárie^{10,23,24}. Amostras de saliva nesta faixa de contagem de estreptococos do grupo mutans, foram detectadas em nosso estudo na diluição 10^{-3} (5-20 UFC) pela contagem na gota e na placa semeada com a diluição 10^{-1} (25-100 UFC) na técnica da alça calibrada.

Considerando os resultados obtidos no experimento II, sugerimos as seguintes técnicas para realizar a contagem de estreptococos do grupo mutans de amostras da saliva estimulada:

- i) *Técnica da contagem na gota* - utilizar para cada amostra da saliva uma placa de Petri 100 x 15mm contendo 20 ml de ágar mitis salivarius bacitracina (MSB). Dividir o fundo externo da placa em três partes. Homogeneizar a amostra da saliva durante 30 segundos em agitador de tubos ("mixer") e semear duas gotas de 0,02 ml da diluição 10^{-3} , preparada com solução salina, na primeira parte da placa. Repetir esta operação semeando duas gotas de 0,02 ml da diluição 10^{-2} na segunda parte e duas gotas de 0,02 ml da diluição 10^{-1} na terceira parte da placa. Após a secagem do inóculo, incubar as placas em anaerobiose, na estufa a 37°C, durante 48 horas e efetuar a leitura conforme descrito no experimento II;
- ii) *Técnica da alça calibrada* - empregar, para cada teste, uma placa de Petri 100 x 15 mm contendo 20 ml de ágar MSB. Dividir o fundo externo da placa ao meio. Homogeneizar a amostra da saliva em "mixer" durante 30 segundos. Com auxílio de alça de 1 µl semear a metade da placa em quatro planos, conforme descrito no experimento II. Repetir este procedimento na outra metade da placa, utilizando, porém a diluição 10^{-1} da amostra da saliva, preparada em solução salina. Após a secagem do inóculo, incubar a placa em anaerobiose, na estufa a 37°C, durante 48 horas. Realizar a leitura conforme descrito no experimento II. Uma alternativa para diminuir o custo da técnica de contagem de estreptococos do grupo mutans da saliva é substituir a atmosfera de anaerobiose pela de microaerofilia, obtida pelo tradicional método da vela²⁰ ou pelo ar expirado em saco plástico¹¹.

A complexidade de execução dos métodos clássicos de contagem de lactobacilos¹⁶ e de estreptococos do grupo mutans⁹ da saliva, restringe sua utilização ao laboratório de microbiologia. Várias modificações destes testes têm sido propostas, com objetivo de facilitar sua execução e adequá-los ao uso rotineiro no consultório odontológico. Para a contagem de lactobacilos merece destaque a técnica em lâmina, tipo "dip slide", proposta por Larmas¹², cujo "kit" é comercializado com o nome de "Dentocult-LB®" (Orion Diagnostica, Helsinki, Finlândia). Uma metodologia semelhante para a contagem de estreptococos do grupo mutans da saliva foi desenvolvida por Jordan *et al.*,⁹ sendo também encontrada no comércio sob a denominação "Caricscreen SM®" (APO Diagnostic Inc., Toronto, Canadá).

No Brasil, ao contrário do que ocorre em países do primeiro mundo como a Suécia, por exemplo, a falta de divulgação das técnicas de contagem dos lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva junto aos microbiologistas não estimula a inclusão destes testes na rotina dos laboratórios de Análises Clínicas de modo a atender a demanda da classe odontológica.²³ Entretanto, acreditamos que as adaptações das técnicas descritas no presente estudo podem contribuir no sentido de chamar a atenção dos laboratórios sobre este assunto.

Um aspecto que deve ser salientado em nosso estudo foi à redução de 2/3 da quantidade do meio de cultura empregado em cada teste, considerando-se as três placas de ágar SL Rogosa ou de ágar MSB usadas, respectivamente, nos métodos padrões de "pour plate" ou de semeadura em superfície, contra uma placa utilizada nas adaptações das técnicas propostas. A técnica da alça calibrada apresentou ainda como vantagem,

em relação à técnica da contagem na gota, a inoculação direta do material não havendo necessidade do preparo das diluições da amostra da saliva.

Em resumo, os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que em relação ao clássico método padrão de contagem em placas, as adaptações das técnicas da contagem na gota e da alça calibrada podem ser utilizadas no laboratório de Análises Clínicas como uma alternativa simplificada e de baixo custo para a quantificação de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à professora Renata Correa Pascotto, do Departamento de Odontologia, da Universidade Estadual de Maringá, pela avaliação clínica dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Bier, O. *Microbiologia e Imunologia*. 23ª ed., São Paulo, Melhoramentos, p.919-998, 1984.
2. Bousfield, I. J.; Smith, G. L.; Trueman, R. W. The use of semi-automatic pipettes in the viable counting of bacteria. *J. Appl. Bact.*, 36:297-299, 1973.
3. Brathall, D.; Carlsson, J. Estado atual dos testes de atividade de cárie, p.239-257. In: Thylstrup, A.; Fejerskov, O., *Tratado de Cariologia*, Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1988.
4. Difco Manual. *Dehydrated culture media and reagents for microbiology*, 10ª ed., Detroit, Difco Laboratories, p.574-576, 748-749, 1984.
5. Gábris, K.; Nagy, G.; Madléna, M.; Dénes, Z.; Márton, S.; Keszthelyi, G.; Bánóczy, J. Association between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res.*, 33:191-195, 1999.
6. Gold, O. G.; Jordan, H. V.; Van Houte, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, 18:1357-1364, 1973.
7. Granath, L.; Cleaton-Jones, P.; Fatti, L. P.; Grossman, E. S. Prevalence of dental caries in 4- to 5- year-old children partly explained by presence of salivary mutans streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 31:66-70, 1993.
8. Hoepflich, P. D. Culture of urine. *J. Lab. Clin. Med.*, 56:899-907, 1960.
9. Jordan, H. V.; Laraway, R.; Snirch, R.; Marmel, M. A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 66:57-61, 1987.
10. Klock, B.; Krasse, B. Effect of caries-preventive measures in children with high numbers of *S. mutans* and lactobacilli. *Scand. J. Dent. Res.*, 86:221-230, 1978.
11. Kohler, B.; Brathall, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, 9:584-588, 1979.
12. Larmas, M. A new dip-slide method for the counting of salivary lactobacilli. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, 71: 31-35, 1975.
13. Mayer, M. P. A. Avaliação do risco de cárie. *ABOPREV*. 1:5-11, 1991.
14. Miles, A. A.; Misra, S. S.; Irwin, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.*, 38:732-749, 1938.
15. Pardo, G. I.; Sreebny, L. M. Management for the highly caries susceptible patient. *J. Prosthet. Dent.*, 67:637-644, 1992.
16. Rogosa, M.; Mitchell, J. A.; Wiseman, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J. D. Res.*, 30:682-689, 1951.
17. Rosa, O. P. S. Níveis salivares de estreptococos mutans e lactobacilos e susceptibilidade à cárie dentária. *CECADE News*, 2(1):15-26, 1994.
18. Samaranyake, L. P. *Essential Microbiology for Dentistry*. 2ª ed., Edinburgh, Churchill-Livingstone, p.217-223, 2002.
19. Silver, J. G.; Krasse, B. Treatment of dental caries monitored by microbial methods: report of two cases. *J. Canad. Dent. Assn.*, 51:211-215, 1985.
20. Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F.; Candeias, J. A. N. *Microbiologia*. 3ª ed., São Paulo, Atheneu, p.131-141, 2002.
21. Westergren, G.; Krasse, B. Evaluation of a micromethod for determination of *S. mutans* and *Lactobacillus* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 7(1):82-83, 1978.
22. Weyne, S. Estudo da cárie (V): O diagnóstico da atividade de cárie. A descoberta de pacientes de alto risco. *Rev. Bras. Odont.*, 43:36-49, 1986.
23. Weyne, S. Cariologia. p.1-42. In: Baratieri, L. N.; Andrada M. A. C.; Monteiro Jr., S.; Cardoso, A. C.; Polidoro, J. S.; Andrada, R. C.; *Dentística. Procedimentos preventivos e restauradores*. 2ª ed., Rio de Janeiro, Quintessence, Livraria e Editora Santos, 1992.
24. Zickert, I.; Emilson, C. G.; Krasse, B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, 27:861-868, 1982.

Endereço para correspondência

Celso Luiz Cardoso

Rua Arthur Thomas 129, Apto. 101 - Zona 1 - 87013-250 - Maringá - PR

Fone: (0xx44)269-7336

E-mail: deres@maringa.com.br

Infecções urinárias por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes cateterizados na Clínica Urológica da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – Ceará*

Urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* through catheter in patients from the urology clinic of Santa Casa de Misericórdia Hospital at Fortaleza - Ceará

Everardo Albuquerque Menezes¹; Joquibede dos Santos Brasil¹; Maria Valdenir Abreu de Paula Rocha²; Maria do Socorro de Sena Andrade²; Maria Neuman Ricarte Monteiro¹; Márcio de Souza Cavalcante¹ & Francisco Afrânio Cunha¹

RESUMO – O objetivo deste estudo foi verificar a frequência de *Pseudomonas aeruginosa* em infecções urinárias em pacientes cateterizados na clínica urológica da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza - Ceará. Foram realizadas 30 culturas de urina de pacientes que se submeteram à cirurgia urológica e que utilizaram cateter urinário e tinham sintomas de infecção. As urinas foram semeadas no ágar CLED e incubadas a 35°C por 24 horas; após o crescimento, foi realizado o exame quantitativo e qualitativo. Foi feita a prova da oxidase e a identificação da bactéria pelo método Bac-Tray. Das 30 amostras, todas foram positivas com incontáveis colônias. As bactérias mais frequentes foram a *Klebsiella pneumoniae* e a *Pseudomonas aeruginosa*. Este trabalho ressalta a importância da urinocultura em pacientes hospitalizados que são submetidos a processo invasivo pelo uso de cateteres, sendo uma excelente ferramenta para elucidação de infecções hospitalares.

PALAVRAS-CHAVE – *Pseudomonas aeruginosa*, infecções urinárias, cirurgias urológicas e infecções hospitalares.

SUMMARY – The objective of this study was to verify the frequency of *Pseudomonas aeruginosa*' urinary tract infection by catheter in patients from the urology clinic of Santa Casa de Misericórdia Hospital, at Fortaleza - Ceará. It was made 30 urine cultures from patients who made urology surgery and used urinary catheter and had infections symptoms. The urine were yielded in CLED agar, incubated at 35°C for 24 hours. After the growth it was made the counting and bacteria identification, as well as oxidase test by Bac-Tray method. All the 30 samples were positives in several colonies. The most frequent were the *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. This study emphasize the importance of the urine culture from patients that used urinary catheters, who has been an excellent tool to show the nosocomial infections.

KEYWORDS – *Pseudomonas aeruginosa*, urinary tract infection, urology surgery and nosocomial infections.

INTRODUÇÃO

As bactérias responsáveis pelas infecções hospitalares originam-se de fonte exógena (hospitalar) e endógena (do paciente). A fonte de infecção exógena inclui equipamentos médicos e farmacêuticos que servem como vetores transitórios; contudo, a principal transmissão deve-se à passagem da bactéria de pessoa para pessoa através do contato pelas mãos infectadas dos profissionais, falhas técnicas em procedimentos cirúrgicos, falhas no processo de esterilização e desinfecção e transmissão de paciente para paciente².

Para que medidas efetivas de controle de surtos de infecção hospitalar possam ser tomadas é fundamen-

tal que se conheçam as fontes e vias de transmissão das bactérias responsáveis por estes surtos⁴.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma importante bactéria oportunista bacilo gram-negativo, não esporulada, capsulada e móvel. Além da sua versatilidade nutricional, a *Pseudomonas aeruginosa* resiste à altas concentrações de sal, corantes, muitos anti-sépticos e aos antibióticos mais comumente usados. Estas propriedades ajudam a explicar a sua natureza ubíqua e contribuem para sua alta incidência em infecções nosocomiais^{3,6,11}.

O gênero *Pseudomonas* tornou-se o quarto patógeno nosocomial mais isolado nos últimos anos, sendo a causa de cerca de 10% de todas as infecções contraí-

Recebido em 16/4/2002

Aprovado em 18/4/2002

*Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

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

²Farmacêutica Bioquímica do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

das em hospital. Apesar de não ser considerada potencialmente patogênica para pessoas saudáveis, assume importante papel em diversas infecções em pacientes hospitalizados, debilitados por doenças crônicas ou sob tratamento prolongado com quimioterápicos. Atualmente, o gênero *Pseudomonas* (principalmente a *Pseudomonas aeruginosa*) tem sido causa de septicemia e óbitos associados ao uso de cateteres, principalmente em UTI^{3,9,15}.

A *Pseudomonas aeruginosa* é resistente a muitos agentes antimicrobianos e, por conseguinte, tornam-se dominantes e importantes quando bactérias mais susceptíveis da microbiota normal são suprimidas¹¹.

A infecção urinária causada por *Pseudomonas aeruginosa* ocorre, principalmente, após a introdução de cateteres. Na clínica urológica é comum o paciente, após a cirurgia, usar cateter, ocorrendo aí um processo invasivo para o paciente. Esta bactéria tem sido muito associada com septicemias e, atualmente, é responsável por cerca de 15% dos casos das septicemias nas clínicas urológicas¹.

Devido ao exposto acima e também preocupados com as infecções hospitalares, principalmente causadas pela *Pseudomonas aeruginosa* foi realizado este estudo, que teve como objetivo principal verificar a presença de *Pseudomonas aeruginosa* nas infecções urinárias de pacientes internados na clínica urológica da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas 30 urinoculturas de pacientes que tinham realizado cirurgias urológicas na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza e tinham sido cateterizados. Neste estudo foram pesquisados apenas pacientes com sintomas de infecções urinárias e eram todos do sexo masculino.

A coleta da urina foi realizada após a retirada do cateter. As amostras foram colhidas pela manhã, em frascos estéreis; sendo recomendado ao paciente, colher a primeira urina da manhã, após assepsia rigorosa da genitália e colhendo o jato médio da urina.

Todas as amostras de urina trazidas ao laboratório de Patologia Dr. Edilson Gurgel foram processadas imediatamente segundo a seguinte metodologia^{3,7,14}:

1. Confecção do esfregaço de urina para coloração de gram. O interesse do estudo eram os bacilos gram (-);
2. Após a constatação de bacilos gram (-), foi semeado 0,001 mL, com uma alça calibrada, em toda a placa de Petri, com meio CLED;
3. A amostra semeada foi colocada em estufa a 35°C por 24 horas;
4. Após 24 horas foi feita a contagem das colônias;
5. Foi realizada também outra coloração de gram para confirmação da presença de bacilos gram (-) e descartar a presença de contaminantes, como os cocos e bacilos gram (+);
6. Foi realizada a prova da oxidase;

7. E, finalmente, foi realizada a identificação dos bacilos gram (-), pelo método Bac-Tray, sendo usados os números I, II para os bacilos oxidase negativa e o III para oxidase positiva.

RESULTADOS

Todas as 30 amostras de urina estudadas foram positivas para bacilos gram (-) e tiveram incontáveis colônias. A Tabela I mostra os resultados das urinoculturas realizadas após a cirurgia em pacientes que fizeram cirurgia urológica e foram cateterizados na Clínica Urológica da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

A Figura 1 mostra a freqüência de bactérias isoladas na urinocultura de pacientes com infecção urinária e que estavam internados na clínica urológica após a cirurgia. A espécie *Klebsiella pneumoniae* foi a mais freqüente com 40,0% das infecções urinárias e a *Pseudomonas aeruginosa* foi a segunda mais freqüente com 26,7%. A *Escherichia coli* que é a bactéria mais comum em infecções urinárias, tanto comunitárias como nosocomiais, teve apenas 4 amostras isoladas (13,3%). A espécie *Enterobacter aerogenes* também teve importância, sendo isolada de 3 amostras (10,0%). A *Serratia marcescens* e o *Citrobacter diversus* foram isoladas uma vez cada. Foi isolada também uma bactéria não identificada, revelando-se contudo não ser fermentadora de açúcares e oxidase positiva.

TABELA I
Resultados das urinoculturas realizadas após a cirurgia em pacientes internados na Clínica de Urologia da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza

Bactérias isoladas	Nº	Positividade
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	40,0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	26,7%
<i>Escherichia coli</i>	4	13,3%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	10,0%
<i>Serratia marcescens</i>	1	3,3%
<i>Citrobacter diversus</i>	1	3,3%
Bacilos gram-negativos não-fermentadores	1	3,3%
Total	30	100%

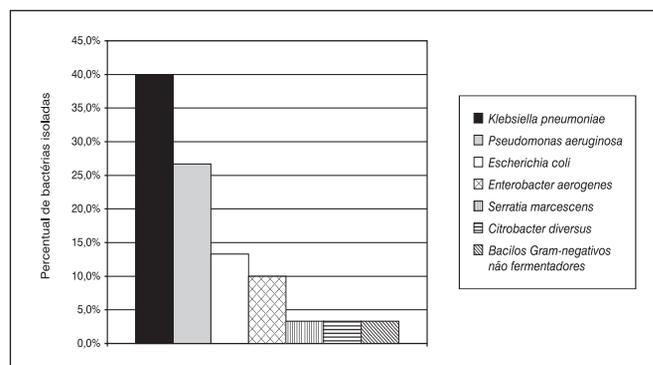


FIG. 1 - Distribuição percentual de bactérias isoladas de urinoculturas positivas pós-cirurgia de pacientes internados na Clínica de Urologia da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

DISCUSSÃO

O interesse para a realização deste trabalho foi devido à preocupação da Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) da Santa Casa, com as infecções hospitalares, principalmente, causadas pela *Pseudomonas* e, também, por ser observado no Laboratório de Patologia Dr. Edilson Gurgel, da Santa Casa, um aumento considerável de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* nos casos de pacientes internados na clínica urológica; estes pacientes sofriam algum tipo de mecanismo invasivo. No caso deste nosso estudo, todos os pacientes foram submetidos à cirurgia e colocação de cateteres.

No nosso estudo, verificamos que todos os pacientes que tinham sintomas de infecções urinárias, tiveram as culturas positivas com incontáveis colônias. Este dado já era esperado pois, a nossa população estudada foi aquela que se submeteu a uma cirurgia e fazia uso de cateter urinário e tinha queixa de infecção.

Em relação à Tabela I e à Figura 1 podemos verificar que a *Klebsiella pneumoniae* foi a mais freqüente com 40,0% dos isolados. Este dado é muito importante, já que a *Escherichia coli*, segundo a literatura¹², é a mais freqüente causadora de infecção urinária após a cirurgia com uso de cateter. No nosso trabalho, mostramos que na Santa Casa, a bactéria mais freqüente foi a *Klebsiella pneumoniae*, mas, como o nosso estudo abrangeu 30 amostras imunoculturas, não podemos contestar a literatura, pois para isto, precisaríamos de mais amostras. A *Escherichia coli* teve uma freqüência de 13,3%, também menor que a *Pseudomonas aeruginosa*.

Podemos observar na Tabela I e na Figura 1 que a *Pseudomonas aeruginosa*, nosso principal objeto de estudo, foi a segunda mais freqüente com 8 isolados (26,7%). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é freqüentemente encontrada, em pequeno número, na microbiota intestinal normal e na pele dos seres humanos. É distribuída amplamente na natureza, sendo comum seu achado em ambientes úmidos nos hospitais⁵. A *Pseudomonas aeruginosa* consegue colonizar seres humanos normais, nos quais é uma saprófita. Entretanto, é capaz de provocar doença em seres humanos cujas defesas estejam alteradas³. Ela só se torna patogênica quando introduzida em áreas desprovidas de defesas normais, por exemplo, quando as mucosas e a pele sofrem lesão tecidual direta, ou quando são utilizados catéteres intravenosos ou urinários^{10,13}. Como foi encontrada *Pseudomonas aeruginosa* em 26,7% das

urinoculturas podemos supor a presença desta bactéria no ambiente hospitalar.

Com os resultados obtidos neste estudo esperamos sensibilizar os profissionais de saúde em relação às infecções hospitalares, principalmente causadas pela *Pseudomonas aeruginosa*, que são resistentes a vários antibióticos usados na clínica médica. E que seja o primeiro de vários trabalhos que poderão ser realizados na cidade de Fortaleza, nesta área.

REFERÊNCIAS

1. Beltrame, R. E.; Silva, C. R.; Tanaka, I. I.; Sornas, A. M. F. *Pseudomonas aeruginosa - antibioticoterapia e perfil de resistência de cepas isoladas das UTIs dos hospitais da Faculdade de Medicina de Marília* [on line]. Disponível na Internet via <http://www.google.com>. Arquivo capturado em 10 de junho de 2000.
2. Darini, A. L. C. *Tipagem fenotípica e genotípica de amostras de Enterobacter cloacae responsáveis por infecção hospitalar*. Tese de doutorado, 135p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 1995.
3. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr, W. C. *Diagnóstico Microbiológico*. São Paulo; 5ª Edição. 2001.
4. Levy, C. E.; Mamezuka, E. M. Métodos clássicos e de biologia molecular aplicados ao estudo epidemiológico de infecção bacteriana de origem hospitalar. *Laes & Haes*. 102:122-140. 1996.
5. Mortágua, P. S.; Lopes, M. M. R.; Germino, R. V.; Campos, A. K. O. *Incidência e perfil de resistência de Pseudomonas isoladas de pacientes do Instituto Lauro de Sousa Lima (ILSL) no período de janeiro/98 a maio/99*. In XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1999.
6. Murray, P. R.; Drew, W. L.; Kobayashi, G. S.; Thompson Jr, J. H. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro-RJ. Editora Guanabara Koogan S.A. 2000.
7. Pilonetto, M.; Pilonetto, D. V. Manual de procedimentos laboratoriais em Microbiologia - POPs em microbiologia. *Microscience*. 1998.
8. Rodrigues, R. R. O.; Uber, A. P.; Yokoo, S.; Garcia, L. B.; Tognim, M. C. B. *Medida quantitativa da aderência "in vitro" da cepas de Acinetobacter baumannii a catéteres intravasculares*. In XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1999.
9. Schaechter, M.; Medoff, G.; Eisenstein, B. L. *Mechanisms of microbial disease*. 2nd edition. 1993.
10. Souza, K. C. M.; Valadão, L. M.; Nojimoto, A. I. T. I. *Ocorrência e perfil de resistência de Pseudomonas aeruginosa isoladas de sítio cirúrgico*. In XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1999.
11. Tavares, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos*. 2ª Edição. São Paulo-SP. Editora Atheneu Editora. 1996.
12. Trablusi, L. R.; Aletherthum, F.; Gompertz, A. F.; Candeias, J. A. N. *Microbiologia*. 3ª edição, Rio de Janeiro-RJ. Livraria Atheneu Editora. 1999.
13. Troillet, N.; Samore, M. H.; Carmeli, Y. Impipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin. Infect. Dis.* v.25, n.1, p.1094-98. 1997.
14. Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P.; Heuck, C. C. *Procedimentos laboratoriais em bacteriologia clínica*. 1ª Ed. Organização Mundial de Saúde - São Paulo. 1994.
15. Veronesi, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8ª edição. Guanabara Koogan. São Paulo. 1991.

Endereço para correspondência

Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes

DACT/FFOE/UFC - E-mail: menezes@ufc.br

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

XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS
IV CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA
6 A 10 DE JUNHO DE 2004
CENTRO DE CONVENÇÕES
SALVADOR • BA

Meningite por *Listeria monocytogenes* em Campina Grande - Paraíba, Brasil: relato de um caso*

Meningitidis by *Listeria monocytogenes* in Campina Grande - Paraíba, Brazil: a case report

Raissa Mayer Ramalho Catão^{1,2}; Wellington Afonso Vigolvinho³; Wellington Torres Andrade⁴ & Ernesto Hofer⁵

RESUMO – Relato do primeiro caso, em Campina Grande-PB, Brasil, de isolamento e identificação laboratorial de *Listeria monocytogenes*, sorovar 1b, em um paciente adulto, do sexo masculino, sem história de comprometimento imunológico e apresentando sintomas clínicos de meningite (febre, cefaléia e rigidez da nuca). O antibiograma realizado pelo método de difusão em discos apresentou sensibilidade para 8 (42,1%) dos 19 antimicrobianos testados. A cepa estudada apresentou-se sensível para: Amicacina, Ceftriaxona, Gentamicina, Lomefloxacina, Netilmicina, Tetraciclina, Tobramicina e Vancomicina. O paciente recebeu alta após 10 dias de antibioticoterapia com ceftriaxona sem apresentar seqüelas.

PALAVRAS-CHAVE – Meningite, listeriose, *Listeria monocytogenes*.

SUMMARY – First case of isolation and identification of the *Listeria monocytogenes* serovar 1b in Campina Grande-PB, Brazil occurred in immunocompetent adult patient. He shows meningitis clinic symptoms (fever, cephalitis and nape rigidity). The antimicrobial disk susceptibility testing showed sensitivity to 8 (42,1%) from 19 researched antibiotics. The sample study showed sensitivity to Amikacin, Ceftriaxon, Gentamycin, Lomefloxacin, Netilmycin, Tetracyclin, Tobramycin and Vancomycin. The patient was discharge from hospital after 10 days by antibiotic therapy with ceftriaxin, without sequels.

KEYWORDS – Meningitidis, listeriosis, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUÇÃO

As meningites bacterianas podem ser causadas por diversas espécies, embora o isolamento e a identificação do agente etiológico nem sempre seja possível, visto que muitos laboratórios clínicos não estão convenientemente preparados, principalmente na ocorrência de microrganismos pouco comuns.

Os sintomas das meningites geralmente são semelhantes, impossibilitando muitas vezes a diferenciação das formas de meningites ou meningo-encefalites. Assim sendo, é fundamental a integração clínico-laboratorial como rotina para o esclarecimento mais imediato do diagnóstico etiológico (Ryser & Marth, 1991). As infecções no sistema nervoso central (SNC) por *Listeria monocytogenes* não fogem a esta regra, determinando uma variedade de sintomas, dependendo de situações como os abscessos cerebrais, meningites e cerebrites parenquimáticas não meningocócicas (Laciar *et al.*, 2000). Os primeiros casos de listeriose humana foram registrados em 1929, nos Estados Unidos da América (Frazier & Westhoff, 1993).

Salienta-se, ainda, que a listeriose humana atinge preferencialmente indivíduos com alterações fisiológicas, imunológicas tais como gestantes, recém-nascidos, idosos e pacientes imunodeprimidos (MIMS *et*

al., 1993). Neste caso, podendo a mortalidade atingir 23% (McLaughlin, 1990), embora registrem-se também na literatura casos envolvendo pessoas imunocompetentes (Hofer, Nascimento & Oliveira, 1998).

A meningite causada por *Listeria monocytogenes* comprovada bacteriologicamente pouco tem sido relatada em nosso meio apesar da sua gravidade (Esper *et al.*, 1978; Leal *et al.*, 1983; Bermudez *et al.*, 1984; Hofer, Nascimento & Oliveira, 1998).

No Brasil, a incidência de listeriose humana é praticamente desconhecida, principalmente devido à semelhança da *L. monocytogenes* com outros microrganismos isolados de materiais clínicos (Heijdein, Devienne & Raddi, 1997). Entretanto, casos esporádicos de listeriose humana foram descritos, sendo o primeiro isolamento de *L. monocytogenes* (listeriose vaginal), relatado por Pacheco, Reis, & Dias (1958), no Rio de Janeiro, onde também foram registrados casos de meningite (Suassuna *et al.*, 1969; Leal *et al.*, 1983; Bermudez *et al.*, 1984), de aborto (Pacheco & Silva, 1972; Sodré, 1981; Nojimoto *et al.*, 1994) e de endocardite (Saraiva *et al.*, 1979).

Hofer, Nascimento & Oliveira (1998), relataram casos mais recentes de meningite provocados por *L. monocytogenes*, no Distrito Federal e Laciar *et al.* (2000) que relaram hidrocefalia sintomática em um

Recebido em 13/11/2002

Aprovado em 9/12/2002

*Trabalho realizado na Diagnose - Clínica de Análises Especializadas Ltda. - Campina Grande, PB;

¹Professora Titular de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Farmácia e Biologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UEPB;

²Diretora Técnica da Diagnose - Clínica de Análises Especializadas Ltda.; ³Bioquímico do Lab. Dr. Bezerra de Carvalho;

⁴Professor Adjunto do Curso de Medicina do Centro de Ciências da Saúde/UFCG; ⁵Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ.

recém-nascido infectado por *L. monocytogenes*, na Argentina.

Muitos casos de listeriose humana são veiculados por alimentos, destacando-se os alimentos crus como leite (de diversos animais), saladas, patês, vegetais, peixes, crustáceos, carnes e derivados (Frazier & Westhoff, 1993). A presença de *Listeria* spp. foi detectada em amostras de carne moída comercializadas em João Pessoa – PB (Catão, Santos & Sousa, 1998).

Este microrganismo pode também ser encontrado em águas residuais (Hofer, 1975; Serafini *et al.*, 1996; Catão, 1999), em adubo orgânico e em fezes de diversos animais, inclusive de humanos (Mims, *et al.*, 1995; Koneman *et al.*, 1997; Nojimoto *et al.*, 1997).

Neste trabalho relata-se a ocorrência em Campina Grande-PB, o primeiro caso de meningite por *Listeria monocytogenes*.

MATERIAL E MÉTODOS

Características demográficas – Paciente adulto, do sexo masculino, internado no Hospital João XXIII em Campina Grande-PB, apresentando sintomas compatíveis com meningite (febre, cefaléia intensa e rigidez da nuca). Portador em dias anteriores de um quadro compatível de gripe associado a sinusite. Não fez uso de antibióticos ou qualquer outro fármaco.

O líquido foi coletado por punção lombar e apresentava-se ligeiramente turvo, sendo encaminhado para o setor de bacteriologia da Diagnose - Clínica de Análises Especializadas e para o Laboratório Dr. Bezerra de Carvalho (pertencente ao próprio hospital), ambos em Campina Grande-PB.

Como procedimentos laboratoriais, foram realizados os exames bioquímicos (proteínas totais e glicose) e citológico (contagem em câmara de Funchs-Rosenthal e determinação de células através de esfregaços corados pelo método de Giemsa).

No procedimento bacteriológico, efetuou-se a bacterioscopia pelo método de Gram, cultura em ágar sangue de carneiro incubado a 37°C/24h. Na identificação do isolado o perfil bioquímico foi de acordo com a orientação de Rocourt *et al.* (1983).

A caracterização antigênica do sorogrupo e sorovar de *L. monocytogenes*, utilizando antissoros policlonais e monovalentes somáticos e flagelares obedeceu às orientações de Seeliger & Höhne (1979).

Na suscetibilidade aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão de discos segundo Kirby-Bauer (NCCLS, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bacteroscopia realizada a partir da centrifugação da amostra, por 5 minutos/3000rpm, evidenciou raros bastonetes curtos Gram-positivos em meio à acentuada reação leucocitária, indicando claramente a existência de um processo infeccioso. A sementeira do material em ágar sangue revelou a presença de pequenas colônias com discreto halo de hemólise total, cujas características morfotintórias indicaram bacilos Gram-positivos. A análise do perfil bioquímico adotado associado ao resultado obtido no sistema API-Listeria (bioMérieux), caracterizou a espécie *L. monocytogenes*.

Na suscetibilidade aos antimicrobianos, os resultados registrados no Tabela I, comprovam a multi-resistência desta cepa e a relevância da realização do antibiograma, visto que comportamentos distintos frente aos antimicrobianos freqüentemente podem ser encontrados.

Segundo Laciari *et al.* (2000), a antibioticoterapia de eleição para a listeriose, geralmente é a associação da ampicilina com gentamicina e em particular, nos casos de meningite a conduta terapêutica de escolha consiste na associação do cloranfenicol com penicilina. Entretanto, em relação a esses antimicrobianos, a cepa analisada neste estudo, apresentou sensibilidade apenas para a gentamicina e comportamento intermediário de sensibilidade para ampicilina e cloranfenicol, de modo que a antibioticoterapia preconizada para este caso foi ceftriaxona (cefalosporina de 3ª geração). Hofer, Nascimento & Oliveira (1998), relataram comportamento semelhante nas cepas analisadas em seus estudos, as quais também apresentaram resistência para: cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, oxacilina, e sulfa + trimetopim.

A avaliação citoquímica do LCR é de fundamental importância e consiste em várias análises, sendo as dosagens de glicose e proteínas as mais solicitadas. Também deve ser observada a contagem celular (total e diferencial), além da avaliação do aspecto físico (cor e turbidez). Os resultados deste caso, obtidos na citometria e na bioquímica, estavam em concordância com os valores citados na literatura (Tabela II).

Apesar destes dados serem relevantes, na presunção da natureza bacteriana das meningites, não devem ser interpretados como resultados absolutos, visto que modelos atípicos podem ocorrer em 10% dos casos de meningite bacteriana na fase inicial (Hofer, Nascimento & Oliveira, 1998).

TABELA I
Apresentação do perfil de sensibilidade da *L. monocytogenes* sorovar 1b frente aos antimicrobianos testados

	Comportamento da cepa		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Antimicrobianos testados	Amicacina	Amoxicilina	Ampicilina
	Ceftriaxona	Aztreonam	Cefalotina
	(Rocefim)	Cefazolina	Cefotaxima
	Gentamicina	Cloranfenicol	Cefoxitina
	Lomefloxacina	Eritromicina	Oxacilina
	Netilmicina		Sulfazotrim
	Tetraciclina		
	Tobramicina		
	Vancomicina		
Nº Total (%) de antimicrobianos testados	8 (42,1%)	5 (26,3%)	6 (31,6%)

TABELA II
Apresentação dos valores encontrados e dos valores citados pela literatura

Parâmetros analisados		
Dosagens bioquímicas	Glicose	Proteínas totais
Valores encontrados	30 mg/dl	75 mg/dl
Valores de referência*	50 – 80 mg/dl	14 – 45 mg/dl

* Fonte: Adaptação de Henry, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Nos adultos, o LCR tem concentrações de proteínas totais mais baixas que o plasma. As proteínas elevadas no LCR (> 65 mg/dl) constituem um achado anormal importante, geralmente na meningite bacteriana, estes valores podem chegar a 100 - 500 mg/dl e a coloração por Gram geralmente é positiva (Henry, 1995).

A diminuição da glicose no LCR está associada à meningite aguda ou crônica, que pode ser bacteriana, tuberculosa, fúngica, amebiana ou parasitária, na sua etiologia. A sensibilidade é de cerca de 50 - 80%, usando 40mg/dl como critério para uma glicose "normal" no LCR. Entretanto, salienta-se que a diminuição da glicose no LCR pode ocorrer em cerca de 25% dos pacientes com meningoencefalite viral (Kjelolsberg, 1986).

A proteína C reativa (PCR) também tem sido sugerida para auxiliar no diagnóstico diferencial das meningites bacteriana e viral, sendo positiva nas bacterianas com 100% de sensibilidade e 94% de especificidade, segundo Martin (1983) e Clarke e Cost (1983). Contudo, outros relatos mostraram uma fraca performance diagnóstica e o valor desta determinação ainda não está bem estabelecido (Henry, 1995).

Entre as informações obtidas na anamnese destaca-se a presença de animais domésticos ou silvestres no domicílio do paciente, o que pode ter alguma importância sob o ponto de vista epidemiológico.

Hofer, Pessoa & Melles (1984), relataram predomínio dos sorotipos 4b (50,7%) e 1/2a (26,19%) em amostras isoladas de processos patológicos e apenas uma cepa 1/2b (1,4%) encontrada em fezes de paciente procedente do Rio de Janeiro. Nojimoto (1993), também comprovou a participação dos sorotipos 1/2a e 4b em casos clínicos de aborto repetitivo ocorridos em Goiânia (GO).

Segundo Heijden, Devienne & Raddi (1997), poucos são os trabalhos que relatam a prevalência dos sorotipos de *L. monocytogenes* no Brasil. Estes autores documentaram o sorotipo 1/2b isolado de amostras fecais de 2 pacientes em Araraquara (SP).

Assim em relação aos sorovares mais citados em processos patológicos invasivos, observa-se que existe diversidade entre eles destacando-se a predominância do sorovar 4b (Hofer, Nascimento & Oliveira, 1998). Entretanto neste trabalho, deve-se ressaltar que foi caracterizado o sorovar 1b fato incomum em relatos de casos de listeriose humana.

CONCLUSÃO

- Foi caracterizada fenotipicamente ocorrência na Paraíba de meningite por *Listeria monocytogenes* sorovar 1b.
- Destaca-se a presença de animais domésticos e/ou silvestres no domicílio no paciente.
- A antibioticoterapia de eleição para a listeriose geralmente é a associação da ampicilina com gentamicina e em particular, nos casos de meningite, a conduta terapêutica de escolha consiste na associação do cloranfenicol com penicilina. Entretanto, em relação a estes antimicrobianos, a cepa analisada apresentou sensibilidade apenas para a gentamicina.
- Neste caso o paciente fez uso de ceftriaxona, recebendo alta após 10 dias de antibioticoterapia.

1. Bermudez, L. E.; Velasco, E.; Carriço, M. K. S.; Panza, M. E.; Vidal, E. Meningite por *Listeria monocytogenes* em um caso de doença de Hodgkin. *Rev. Bras. Cancerol.*, 30(3):29-32, 1984.
2. Catão, R. M. R.; Santos, H. B.; Sousa, S. Pesquisa de *Listeria* spp. em amostras de carne moída comercializadas na cidade de João Pessoa, PB. *Anais*. vol. 2:974-977. Rio de Janeiro, RJ, 1998.
3. Catão, R. M. R. *Freqüência de Listeria spp. e de microrganismos indicadores de contaminação fecal no leite cru e pasteurizado e no esgoto de uma indústria de laticínios em Campina Grande, PB*. Dissertação (mestrado) CT/UFPP - João Pessoa. 98p, 1999.
4. Clarke, D.; Cost, K. Use of C-reactive protein in differentiating septic from aseptic meningitides in children. *J. Pediatr.*, 102:718, 1983.
5. Esper, N. R.; Pessoa, G. V. A.; Hofer, E.; Lee, I. M. L.; Melles, C. E. A.; Sakataa, E. E.; Calzada, C. T. Meningite por *Listeria monocytogenes*, em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 38:37-41, 1978.
6. Frazier, W. C.; Westhoff, D. C. *Microbiologia de los alimentos*. 4ª ed., ACRIBIA: Zaragoza, España. 681p., 1993.
7. Heijden, I. M. V. D.; Devienne, K. F.; Raddi, M. S. G. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Araraquara, SP - Brasil. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 29(4):210-212, 1997.
8. Henry, J. B. *Diagnósticos clínicos & tratamento por métodos laboratoriais*. 18ª ed. Manole. São Paulo, 1995.
9. Hofer, E. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em água de esgoto. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 73(1/2):31-38, 1975.
10. Hofer, E.; Nascimento, R. S.; Oliveira, M. A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes no Distrito Federal. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.* v.31, n.2, 1998.
11. Hofer, E.; Pessoa, G. V. A.; Melles, C. E. A. Listeriose humana. Prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. *Rev. Adolfo Lutz*, 44:125-131, 1984.
12. Kjelolsberg, C. R.; Knight, J. A. *Body Fluids*. Chicago, American Society of Clinical Pathologists Press, 1986.
13. Koneman, E. K.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr., W. C. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5ª Ed. Lippincott, NY, 1395p., 1997.
14. Laciari, A. L.; Hasuoka, R. P.; Correa, S. M.; Miranda, A. M.; Centorbi, O. N. P. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31(1):9-11, 2000.
15. Leal, N. C.; Hofer, E.; Costa, M. F.; Sá, A. T. Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano, em Recife, PE. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 14(4):290-291, 1983.
16. Martin, W. J. Rapid and reliable techniques for laboratory detection of bacterial meningitis. *Am. J. Med.*, 75(Suppl. 1B):119, 1983.
17. Mclauchlin, J. *Listeria Workshop DMRQ*. Central Public Health Service, 1988. In: *Oxoid Manual*. 6ª Ed. England, 1990.
18. Mims, C. A.; Playfair, J. H. L.; Roitt, I. M.; Williams, R. *Microbiologia Médica*. Manole. São Paulo, 1995.
19. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Approved Standard - Performance standard for antimicrobial disk susceptibility testing*, 1999.
20. Nojimoto, I. T. I. *Listeria sp em gestantes com clínica de aborto repetitivo: isolamento, identificação, susceptibilidade in vitro aos antimicrobianos*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 145p., 1993.
21. Nojimoto, I. T. I.; Centeno, A. J.; Yanaguita, R. M.; Watanabe, K.; Kamamoto, M.; Machado, M. R. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Listeria* spp. isoladas de pacientes com aborto repetitivo. *Rev. Bras. Anal. Clín.*, 26(3):71-74, 1994.
22. Nojimoto, I. T. I.; Souza, S. R.; Valadão, L. M. Ocorrência de *Listeria* spp. em crianças da cidade de Goiânia-Goiás. *Rev. Bras. Anal. Clín.*, 29(2):73-74, 1997.
23. Pacheco, G.; Silva, D. S. Listeriose no aborto habitual. *Gin. Bras.*, 42(2):48-54, 1972.
24. Rocourt, J.; Schrettenbrunner, A.; Seeliger, H. P. R. Différenciation biochimique des groupes génomiques des *Listeria monocytogenes* (Sensu Lato). *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*. 134A:65-71, 1983.
25. Ryser, E. T.; Marth, E. H. *Listeria, listeriosis and food safety*. New York: Marcel Dekker. 632p., 1991.
26. Saraiva, L. R.; Montenegro, D.; Marcelo, P.; Vitor, E. G. Endocardite infecciosa por *Listeria monocytogenes*: a propósito de um caso. *Arq. Bras. Cardiol.*, 33(3):193-195, 1979.
27. Seeliger, H. P. R.; Höhne, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan T.; Norris, J. R. E. H. *Ed. methods in microbiology*. New York, Academic Press, 13:31-49, 1979.
28. Serafini, A. B.; Caixeta, E. R.; Barbosa, A. J.; Vieira, J. D. G. Isolamento de *Listeria* spp. de amostras de águas residuais de indústrias de laticínios, localizadas nas cidades de Goiânia e Anápolis, Goiás. *Hig. Alim.*, 10(46):48-50, 1996.
29. Sodrê, F. C. *Listeria monocytogenes*: caso em gestantes. *Rev. Bras. Gynec. Obstetr.*, 3(2):99-100, 1981.
30. Suassuna, I.; Santos, L. C.; Suassuna, I. R.; Pinheiro, J. Listeriose do sistema nervoso no estado da Guanabara. *Anais Microbiol.*, 16:161, 1969.

Endereço para correspondência

Raíssa Mayer Ramalho Catão

Av. Floriano Peixoto, 776 - Campina Grande, PB - 58.100-001

Fone: (0xx83)321-0087 - Fax: (0xx83)322-8834

E-mail: almircatiao@uol.com.br

Relação entre a ocorrência de parasitas intestinais e sintomatologia observada em crianças de uma comunidade carente de Cidade Nova, em Natal - Rio Grande do Norte, Brasil*

Relation observed between the occurrence of intestinal parasites and symptomatology in children from Cidade Nova community wanting in Natal city - Rio Grande do Norte State, Brazil

Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino; Júlia Fernandes de Lima Nunes & Edna Marques de Araújo Silva

RESUMO – A prevalência das enteroparasitoses e sintomatologia apresentada foram observadas em 100 crianças de 1 a 5 anos, moradoras de uma comunidade carente localizada no bairro de Cidade Nova, em Natal, RN, Brasil. As amostras fecais foram analisadas pelos métodos de Hoffman, Pons & Janer e Faust *et al.* (Amato Neto & Corrêa, 1980). Os resultados demonstram 76,0% de positividade, onde destes, 24,0% apresentaram sinais e sintomas característicos de enteroparasitoses, sendo a diarreia e manchas na pele os mais frequentes. Os parasitas mais prevalentes foram: *Ascaris lumbricoides* (41,7%), *Trichuris trichiura* (40,5%), *Ancilostomideo* (8,3%), *Giardia lamblia* (20,7%) e *Entamoeba histolytica* (15,3%). Diante do resultado obtido foi constatado uma alta prevalência de enteroparasitas, e indivíduos com mais de uma espécie parasitária, associada ou não a presença de sinais e sintomas característicos de parasitoses intestinais, ficando claro, portanto, a necessidade de um programa com medidas sanitárias de combate às parasitoses, enfocando a facilidade da disseminação entre as crianças.

PALAVRAS-CHAVE – Parasitoses intestinais; crianças; sintomatologia; prevalência.

SUMMARY – Intestinal parasites and symptomatology prevalence were investigated in 100 children from one to five years old, from Cidade Nova community wanting in Natal, RN, Brazil. The samples were analyzed by the Hoffman, Pons & Janer and Faust *et al.* methods (Amato Neto & Corrêa, 1980). The results showed 76.0% of intestinal parasites, with 24.0% positivity to signal and symptom, where the most frequent was diarrhea and stain in skin. The most prevalent parasites were: *Ascaris lumbricoides* (41.7%), *Trichuris trichiura* (40.5%), *Ancilostomideo* (8.3%), *Giardia lamblia* (20.7%) and *Entamoeba histolytica* (15.3%). These results showed the high prevalence of enteroparasites and people with more than one parasite species, associate or not with characteristic signal and symptom of intestinal parasites, concluding that is necessary some degrees to combat, trying to avoid the spreads in the children.

KEYWORDS – Intestinal parasites; children; symptom; prevalence.

INTRODUÇÃO

A frequência de parasitas intestinais, apresenta ampla distribuição geográfica, no Brasil e demais países em desenvolvimento, sofrendo variações de acordo com as condições de saneamento básico, nível sócio-econômico, grau de escolaridade, idade e hábitos de higiene, entre outras variáveis (Machado *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2000).

Apesar dos esforços dos profissionais de saúde, várias pesquisas demonstram que não tem ocorrido alteração na prevalência de parasitoses no Brasil, que persiste em ser bastante elevada (Costa *et al.*, 1990). Um estudo multicêntrico, em crianças de 7 a 14 anos realizado em 10 estados brasileiros, mostrou uma positividade de 55,3% para algum tipo de parasitose, onde a ascariíase, tricuriíase e a giardiase apresentaram uma distribuição mais regular (Campos *et al.*, 1988). Estima-se que 12,3% e 11,4% de todas as doenças que atingem meninos e meninas, respectivamente, tem como causa básica a infecção helmíntica, em países subdesenvolvidos (World Bank, 1993; Prado *et al.*, 2001).

No Brasil, a frequência de infecção por enteroparasitas varia de acordo com a região estudada e com a população, onde as taxas em geral não são significativamente elevadas quando comparadas com às da população pe-

diátrica. Quando observada apenas a população infantil, as variações quanto à distribuição entre as faixas etárias é um fato bastante interessante, pois se sabe que crianças em idade pré-escolar são as mais acometidas por parasitoses (Torres *et al.*, 1991). Além dos efeitos patológicos diretos destes parasitas sobre a saúde, as infecções helmínticas exercem importante influência sobre o estado nutricional, crescimento e função cognitiva de escolares em países subdesenvolvidos (Nokes *et al.*, 1992). Apesar das baixas taxas de morbidade, as enteroparasitoses ainda continuam representando um sério problema de saúde pública frente ao grande número de pessoas parasitadas e aos problemas orgânicos que podem provocar, inclusive sobre o estado nutricional (Cooper *et al.*, 1992; Grillo *et al.*, 2000).

A diarreia causada por parasitas intestinais constitui uma das causas de disfunção em crianças menores de 6 anos de idade, e que contribui consideravelmente com as altas taxas de má nutrição, constituindo um problema médico-sanitário de grande importância dentro da saúde pública, especialmente na região Nordeste do Brasil, uma vez que ocorrem com frequência e toma dimensões preponderantes, que concorrem para o bloqueio do desenvolvimento físico e mental destas crianças (Gupta, 1990).

A infecção por giardiase assume um papel de significativa importância em crianças de grupos etários de bai-

Recebido em 4/12/2002
Aprovado em 19/2/2003

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Natal, RN, Brasil

xa idade e/ou subnutridas, reportados por diversos estudos já realizados, tanto por sua ação espoliativa quanto por outros aspectos de sua patogenia, com a possibilidade até mesmo de prejudicar a absorção intestinal (Sawaya *et al.*, 1990).

O presente trabalho procurou, então, caracterizar melhor a prevalência de parasitoses intestinais em crianças de um a 5 anos de uma comunidade carente, de baixas condições sócio-econômicas, da cidade de Natal (RN, Brasil), correlacionando com os principais sinais e sintomas clínicos encontrados, com posterior tratamento e atuação junto à população, visando um melhor dimensionamento na elaboração de medidas de combate e prevenção, através da educação sanitária no ciclo indivíduo-família-comunidade, durante o período de realização do estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

O inquérito coproparasitológico foi realizado em novembro de 1999, em um total de 100 crianças residentes no bairro de Cidade Nova, em Natal, RN, nas comunidades localizadas em áreas de baixa renda.

Através de demanda aleatória foram integrantes deste inquérito, crianças de ambos os sexos, cuja idade estava compreendida entre um a 5 anos.

Após a explicação sobre a finalidade do projeto e devida autorização dos pais ou responsáveis, através de um Termo de Adesão consentindo a participação no inquérito parasitológico, como também, da orientação para que durante o período de coleta das amostras não fossem utilizados antiparasitários, cada criança foi identificada em um questionário com dados pessoais, como data de nascimento, sexo, além de questões sobre os principais sinais e sintomas apresentados que podem ser possivelmente provocados por parasitoses intestinais e, então, cada uma destas crianças recebeu um número de registro além de recipiente para coleta de fezes, devidamente rotulado.

Conforme o combinado com os pais ou responsável, nos dias de coleta das amostras foram proferidas palestras de educação sanitária salientando as principais medidas de combate e de prevenção das enteroparasitoses, bem como, enfatizando os prejuízos trazidos por elas à saúde, através de cartazes e materiais de apoio interativos. Após as palestras, foi solicitado das crianças que demonstrassem por redação e/ou verbalmente o que de mais importante acharam sobre o assunto.

O material fecal então recolhido na comunidade foi encaminhado ao Laboratório de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN, e as amostras foram submetidas a dois métodos simultaneamente, o de Hoffman, Pons & Janer e o de Faust *et al.* (Amato Neto & Corrêa, 1980).

A prevalência de enteroparasitoses foi realizada através de percentuais resultantes de uma análise estatística utilizando o teste Qui-Quadrado com nível de significância de 95,0% (Siegel, 1975), agrupando-os de acordo com a positividade e presença ou não de sinais e sintomas, espécies de helmintos e protozoários, além dos princi-

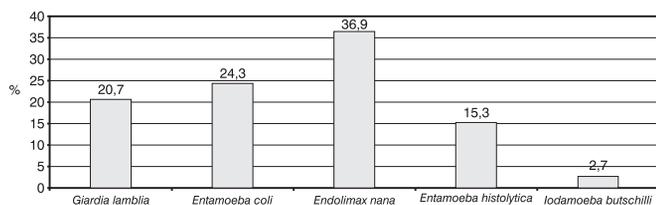


FIG. 1 - Prevalência de protozoários intestinais em 100 crianças de 1 a 5 anos de idade de uma comunidade carente de Cidade Nova, Natal/RN, 1999.

pais sinais e sintomas encontrados nas crianças.

Os resultados foram expedidos em formulários próprios e entregues aos interessados para imediata avaliação e controle médico pelo serviço de saúde local para o tratamento adequado quando fosse necessário.

RESULTADOS

A prevalência geral encontrada para o parasitismo intestinal foi de 76,0% de mono ou poliparasitas, onde foi observada uma positividade de 24,0% para a presença de sinais e sintomas associados juntamente a estes parasitas intestinais nas 100 crianças analisadas (Tabela I).

No presente estudo, a diarreia, dor abdominal, anorexia e manchas na pele foram os sinais e sintomas presentes nas crianças, como mostra a Tabela II, dentre os quais, diarreia e manchas na pele foram os mais relatados e encontrados nas crianças de 1 a 5 anos examinadas. Todavia, ressaltamos que existem outros fatores que também provocam sinais e sintomas semelhantes e o fato da ausência destes também não exclui necessariamente as infecções parasitárias, como foi observado no percentual de 52,0%.

Analisando a Figura 1, verifica-se a distribuição de protozoários intestinais com a prevalência de 23 (20,7%) casos positivos de *Giardia lamblia* e 17 (15,3%) casos de *Entamoeba histolytica*, além dos protozoários não-patogênicos com a frequência de 27 (24,3%) casos de *Entamoeba coli*, 41 (36,9%) de *Endolimax nana* e em 3 (2,7%) casos de *Iodamoeba butschilli*.

A Figura 2 retrata a ocorrência das espécies de helmintos nas crianças estudadas, onde foi observado 35 (41,7%) casos positivos de *Ascaris lumbricoides* e 34 (40,5%) de *Trichuris trichiura* como os helmintos mais fre-

TABELA I
Ocorrência de enteroparasitoses em 100 crianças de 1 a 5 anos de idade de uma comunidade carente de Cidade Nova, Natal/RN, 1999

Sinais e sintomas	Positivo %	Negativo %
Presente	24,0	4,0
Ausente	52,0	20,0
Total	76,0	24,0

TABELA II
Sinais e sintomas relatados em 100 crianças de 1 a 5 anos de idade de uma comunidade carente de Cidade Nova, Natal/RN, 1999

Sinais e sintomas	Positividade de parasitas intestinais	
	n	%
Manchas na pele	5	20,8
Diarreia	17	70,8
Dor abdominal	1	4,2
Anorexia	1	4,2
Total	24	100,0

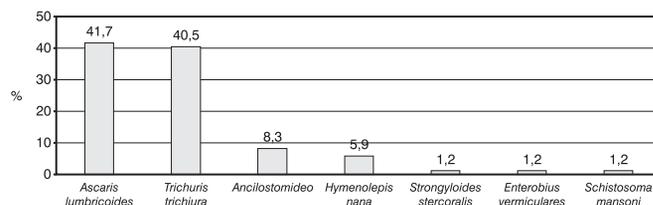


FIG. 2 - Prevalência de infecção por helmintos em 100 crianças de 1 a 5 anos de idade de uma comunidade carente de Cidade Nova, Natal/RN, 1999.

qüentes, além de 7 (8,3%) casos de *Ancilostomideo*, 5 (5,9%) de *Hymenolepis nana*, e *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis* e *Schistosoma mansoni* que apresentaram positividade em 1 (1,2%) caso.

DISCUSSÃO

A prevalência de enteroparasitoses foi significativamente elevada nas crianças em estudo (76,0%), evidenciando que tanto a idade quanto o nível sócio-econômico são determinantes para estes achados, concordando com os dados consultados na literatura (Torres *et al.*, 1991; Machado *et al.*, 1999; Coelho *et al.*, 2001).

Prado *et al.* (2001) encontraram uma positividade de 66,1% para parasitas intestinais em escolares na cidade de Salvador (BA, Brasil), enfocando que níveis sócio-econômicos e culturais são fatores essenciais para a melhoria das condições de higiene pessoal e para o cuidado com a água e os alimentos, sendo estes elementos determinantes para a diminuição da prevalência de enteroparasitoses nas populações. A infestação por enteroparasitas é claramente relacionada com a pobreza e a precariedade das condições de higiene e saneamento (Tavares-Dias & Grandini, 1999).

É muito comum entre crianças o aparecimento de alterações cutâneas, como manchas claras circulares disseminadas pelo rosto, tronco e membros superiores, associados aos casos de parasitoses intestinais. Algumas observações sugerem uma relação entre manchas cutâneas e ascaridíases (Gupta, 1990).

Quanto aos protozoários intestinais encontrados nas crianças, optou-se por descrever os enterocomensais *E. nana*, *E. coli* e *I. butschilii* junto aos outros protozoários intestinais patogênicos como *E. histolytica* e *G. lamblia*, uma vez que eles têm o mesmo mecanismo de transmissão e podem servir como um bom indicador das condições sócio-sanitárias facilitando um melhor entendimento da epidemiologia das parasitoses, como também foi observado por Rocha *et al.* (2000). Vários estudos em crianças infectadas com parasitas tais como *G. lamblia* e *E. histolytica* têm demonstrado uma redução de crescimento, má-absorção de nutrientes e danos à mucosa intestinal (Sawaya *et al.*, 1990).

No que se refere aos casos de helmintíases, vale salientar que neste estudo não foi empregado o método específico (swab-anal) para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*, devendo-se provavelmente ao baixo percentual de casos positivos. Segundo Santos *et al.* (1993), de acordo com a OMS, de cada 4 habitantes do planeta, um está parasitado por algum tipo de helminto. Outro fato interessante quanto aos helmintos e que também é demonstrado em outros trabalhos (Gioia, 1992; Santos *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 1995), foi que, dentre estes parasitas há um destaque para o *A. lumbricoides* e o *T. trichiura* como vermes de elevada frequência na população pediátrica. Não é raro o *A. lumbricoides* co-existir com o *T. trichiura*, uma vez que as condições exigidas para o desenvolvimento de seus ovos são semelhantes, principalmente quando se encontram em áreas de clima quente e regiões com saneamento básico precário (Costa-Macedo *et al.*, 1998).

O que agrava este quadro de alta frequência das enteroparasitoses é que estas formas parasitárias desenvolvem patogenias que são quase sempre negligenciadas e esquecidas, já que os sintomas clínicos são inespecíficos ou confundidos com os de outras doenças, ficando os indivíduos assim, parasitados por longos anos de forma silenciosa e inaparente, causando danos, principalmente às crianças.

A prevenção é possível e o tratamento costuma ser muito eficaz. O problema ainda é o diagnóstico, onde independente da classe social e da presença ou não de sintomas, o exame parasitológico de fezes deve ser realizado pelo menos uma vez por ano.

Deste modo, é imprescindível sensibilizar os órgãos competentes, a fim de incentivar melhorias nas condições de vida das crianças, principalmente com base em inquéritos epidemiológicos como o deste estudo, devendo ser inserido nos sistemas públicos de saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à comunidade pertencente ao bairro de Cidade Nova, Natal, RN, pela colaboração; às crianças, pais ou responsáveis, além dos agentes comunitários que orientaram na escolha desta comunidade carente.

REFERÊNCIAS

1. Amato Neto, V.; Corrêa, L. L. *Exames parasitológicos de fezes*. 4ª edição, São Paulo: Editora Savier, 1980.
2. Campos, R.; Brigues, W.; Belda Neto, M.; Souza, J. M.; Katz, N.; Salata, E.; Dacal, A. R. G.; Dourado, H.; Castanho, R. E. P.; Gurvitz, R.; Zingano, A.; Pereira, G. J. M.; Ferrioli Filho, F.; Camilo-Coura, L.; Faria, J. A. S.; Cimerman, B.; Siqueira Filho, J. B.; Prata, A. *Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil*. Rhodia - Grupo Rhône-Poulenc, 1988.
3. Cardoso, G. S.; Santana, A. D. C.; Aguiar, C. P. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracaju, SE, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28:25-31, 1995.
4. Coelho, L. M. D. P. S.; Oliveira, S. M.; Milman, M. H. S. A.; Karasawa, K. A.; Santos, R. P. Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34:479-482, 2001.
5. Cooper, E. S.; Whyte-Alleng, C. A. M.; Finzi-Smith, J. S. Intestinal nematode infections in children: the pathophysiological price paid. *Parasitology*, 104:s91-s103, 1992.
6. Costa, M. S. G.; Nunes, M. P. P.; Nunes, J. F. L. Ocorrência de parasitoses intestinais em escolares pertencentes ao grupo escolar Vilagram Cabrita, Natal-RN. *Revista Saúde*, 5:43-46, 1990.
7. Costa-Macedo, L. M.; Machado-Silva, J. R.; Rodrigues-Silva, R.; Oliveira, L. M.; Vianna, M. S. R. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 14:851-855, 1998.
8. Gioia, I. Frequência de parasitoses intestinais entre os usuários do Centro de Saúde do distrito de Souza, Campinas, SP (1986-1990). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25:177-182, 1992.
9. Grillo, L. P.; Carvalho, L. R.; Silva, A. C.; Verreschi, I. T. N.; Sawaya, A. L. Influência das condições sócio-econômicas nas alterações nutricionais e na taxa de metabolismo de repouso em crianças escolares moradoras em favelas no município de São Paulo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46:7-14, 2000.
10. Gupta, M. C. Effect of ascariasis upon nutritional states of children. *Journal of Tropical Pediatrics*, 36:189-191, 1990.
11. Machado, R. C.; Marcarí, E. L.; Cristante, S. F. V.; Carareto, C. M. A. Giardíase e helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:697-704, 1999.
12. Nokes, C.; Grantham-McGregor, S. M.; Sawyer, A. W.; Cooper, E. S.; Robinson, B. A.; Bundy, D. A. Moderate to heavy infections of *Trichuris trichiura* affect cognitive function in Jamaican school children. *Parasitology*, 104:539-547, 1992.
13. Prado, M. S.; Barreto, M. L.; Strina, A.; Faria, J. A. S.; Nobre, A. A.; Jesus, S. R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na Cidade de Salvador (Bahia, Brasil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34:99-101, 2001.
14. Rocha, R. S.; Silva, J. G.; Peixoto, S. V.; Caldeira, R. L.; Firmo, J. O. A.; Carvalho, O. S.; Katz, N. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33:431-436, 2000.
15. Santos, M. G.; Moreira, M. M.; Malaquias, M. L. G.; Sciall V. T. Educação em saúde em escolas públicas de 1º grau da periferia de Belo Horizonte, MG, Brasil. II. Conhecimentos, opiniões e frequência de helmintíases entre alunos e professores. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35:573-579, 1993.
16. Sawaya, A. L.; Amigo, M. P. H.; Sigulem, D. M. The risk approach in preschool children suffering malnutrition and intestinal parasitic infection in the city of São Paulo, Brasil. *Journal Tropical Pediatrics*, 36:184-188, 1990.
17. Siegel, S. *Estatística não paramétrica*. São Paulo: Mc Graw Hill, 1975.
18. Tavares-Dias, M.; Grandini, A. E. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:63-65, 1999.
19. Torres, D. A. G. V.; Chieffi, P. P.; Costa, W. A.; Kudzielics, E. Giardíase em creches mantidas pela prefeitura do município de São Paulo, 1982/1983. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33:137-142, 1991.
20. World Bank (World Development Report). *Investing in health New York*. Oxford University Press, 1993.

Endereço para correspondência

Ana Conceição Ribeiro Dantas Saturnino
Av. Bernardo Vieira, 4.114, apto. 404 - 59051-005 - Lagoa Nova - Natal, RN
Tel.: (0xx84)221-1002
Email: sassuana@bol.com.br

Adesinas, hemolisinas e hemaglutininas em amostras uropatogênicas de *Escherichia coli*

Adhesins, hemolysins and hemagglutinins in *Escherichia coli* uropathogenic samples

Rosália Rubel¹ & Ana Lúcia Nicastrí²

RESUMO – Foram analisadas 30 amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas, isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com sintomas de infecção urinária. Nessas amostras foram pesquisados três fatores de virulência: expressão de hemaglutininas, expressão de hemolisinas e adesão celular a células epiteliais. A pesquisa de hemaglutininas revelou a seguinte expressão fenotípica entre os isolados clínicos: 40% aglutinaram eritrócitos de cobaia na ausência de D-manose (amostras manose-sensíveis - MS); 13,3% aglutinaram eritrócitos humanos na presença de D-manose (amostras manose-resistentes - MR); 30% das amostras apresentaram os dois padrões de hemaglutinação (amostras MR MS) e 16,6% das amostras não expressaram as hemaglutininas pesquisadas. A produção de hemolisina ocorreu em 26,6% das amostras e sempre foi acompanhada da expressão de hemaglutininas MS. Todas as amostras com fenótipo MR MS aderiram à linhagem celular, enquanto que amostras MS e amostras MR aderiram em menor grau, e as amostras não hemaglutinantes, praticamente, não aderiram. Esses resultados sugerem uma possível relação entre hemaglutinação e virulência bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE – Infecção urinária, adesão bacteriana, *Escherichia coli* uropatogênica.

SUMMARY – Thirty uropathogenic samples of *Escherichia coli* were analyzed, isolated from patients presenting urinary infection symptoms admitted to the University Hospital of the Federal University of Paraná. The virulence factors were investigated in those samples: the hemagglutinin expression, the hemolysin expression, and the adhesion to epithelial cells. The hemagglutinins analysis revealed phenotypical expression among the clinical isolates: 40% agglutinated red blood cells of guinea pigs in the absence of D-mannose (mannose-sensitive samples - MS); 13.3% agglutinated human red blood cells in the presence of D-mannose (mannose-resistant samples - MR); 30% of the samples showed both hemagglutination patterns (MR MS samples) and 16.6% of the samples did not express the hemagglutinins under study. The presence of hemolysin occurred in 26.6% of the samples and was always accompanied by the expression of MS hemagglutinins. All samples with MR MS phenotype adhered to the cell lineage, whereas samples with either MS or MR hemagglutinin presented a lower degree of adherence, and the non-agglutinating samples did not adhere at all. The results suggested a possible relationship between hemagglutination and bacterial virulence.

KEYWORDS – Urinary infection, bacterial adhesion, uropathogenic *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

A maioria dos casos de infecção urinária tem como principal agente etiológico a bactéria *E. coli*. A resistência do hospedeiro à bacteriúria tem sido atribuída à ação de lavagem do fluxo urinário e às defesas imunológicas inespecíficas. Os processos infecciosos são deflagrados quando a bactéria é capaz de expressar fatores de virulência que sobrepujam esses mecanismos de defesa^{2,4}. Dentre os fatores de virulência bacterianos, a adesão celular, a hemaglutinação e a hemólise são aqueles relacionados com patogenicidade *in vivo*¹⁶. O fenômeno de hemaglutinação com eritrócitos de cobaia, quando é inibido na presença de D-manose, caracteriza as hemaglutininas bacterianas manose-sensíveis (MS). Essas hemaglutininas MS, frequentemente, são expressas na superfície de organelas adesivas bacterianas denominadas de "fimbria tipo 1". Cepas de *E. coli* causadoras de cistite e de bacteriúria assintomática, em geral, expressão fimbria tipo 1, a qual se liga também a leucócitos e ao muco urinário através da glicoproteína de Tamm-Horsfall, fato que pode contribuir para a sua remoção do trato urinário⁵. Porém, pesquisas têm demonstrado que altas concentrações dessa glicoproteína agem recobrando a bactéria e impedindo a ligação bacteriana a polimorfonu-

cleares, de forma que a expressão de fimbria tipo 1 pode ser mais um artifício bacteriano para se livrar dos mecanismos de defesa do hospedeiro¹. As hemaglutininas manose-resistentes (MR) não sofrem influência da D-manose e não se ligam nem a leucócitos nem a glicoproteína. A hemaglutinação MR caracteriza uma grande família de adesinas fimbriais e afimbriais, entre essas se destaca a fimbria P, assim denominada por se ligar a receptores glicolipídicos de eritrócitos humanos do grupo sanguíneo P e por ser, frequentemente, expressada por cepas de *E. coli* pielonefritogênicas¹⁷. A capacidade de hemaglutinação apresentada pelas bactérias está intimamente relacionada ao seu potencial de adesão às células eucarióticas. Acredita-se que a informação genética para ambas as hemaglutininas (MS e MR) capacita a bactéria a exercer seu poder de adesão, permitindo a expressão simultânea conforme as condições ambientais, através de um mecanismo de variação de fase. Nos estágios iniciais da infecção a expressão de adesinas MS ajudaria a bactéria a vencer a barreira imposta pelo muco urinário. Em estágios avançados da infecção, a expressão de adesinas MR, que se ligam aos receptores glicolipídicos das células uroepiteliais, mas não a polimorfonucleares, garantiria a persistência do microrganismo no trato urinário¹⁷.

Recebido em 30/1/2003
Aprovado em 18/2/2003

¹Farmacêutica-Bioquímica do Serviço de Análises Clínicas – Hospital de Clínicas – Univ. Fed. do Paraná, aluna do curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular – UFPR; ² Professora do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular – Departamento de Biologia Celular – UFPR – Curitiba – PR – Brasil.

Este trabalho teve por objetivo estudar a expressão de hemaglutininas, adesinas e hemolisinas em amostras de *E. coli* uropatogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e identificação das amostras bacterianas

Foram selecionadas 30 amostras de *E. coli* de urina de pacientes com sintomas de infecção urinária. Os pacientes foram orientados para colher amostra de urina proveniente do jato médio em frasco estéril, após assepsia da genitália externa. As urinas foram semeadas em ágar cistina-lactose eletrólito deficiente (Cled - Merck, Alemanha) com alça de cromo-níquel calibrada para dispensar 1mL de amostra. Após incubação por 18 horas a 37°C selecionou-se as amostras que se desenvolveram em cultura pura e com contagens de colônias iguais ou superiores a 10⁵ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia). As amostras de *E. coli* foram identificadas e submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana, através do aparelho Walk-Away Microscan® (Dade Behring - USA).

Pesquisa de hemaglutininas

Seguiu-se a técnica de Duguid, Clegg e Wilson³. Previamente, as amostras foram cultivadas em ágar de infuso de cérebro e coração de boi (BHI - Oxoid, Inglaterra) por 24 horas a 37°C. Foram preparadas suspensões bacterianas de aproximadamente 10⁹ UFC/mL em PBS, 25 mL dessa suspensão foi homogeneizada com 25 mL de suspensão de eritrócitos de cobaia a 2,5% em PBS, sobre lâmina de microscopia e observada por dois minutos. As amostras bacterianas que apresentaram hemaglutinação foram testadas frente à suspensão de eritrócitos de cobaia, seguindo a mesma técnica, porém, na presença de 25 µL de D-manose a 3% em PBS. A ausência de hemaglutinação, nessa segunda fase, revelou a presença de hemaglutininas MS. Hemaglutininas MR foram pesquisadas reagindo-se 25 µL da suspensão bacteriana com 25 µL de uma suspensão de eritrócitos humanos, grupo sanguíneo A, RH positivo, antígeno P₁ positivo, a 2,5%, na presença de 25 µL de D-manose a 3% em PBS. A presença de hemaglutinação, dentro de dois minutos, caracterizou as amostras de *E. coli* com hemaglutininas MR. Para controle das reações, utilizou-se a cepa de *E. coli* portadora da fímbria P - EH824^{11, 14}, a cepa de *E. coli* com fímbria tipo 1 ORN 115¹³ e a amostra afimbriada K12.

Ensaio de aderência celular

Para o ensaio de aderência, adotou-se a técnica proposta por Goluszko *et al.*⁶. Células da linhagem HEP-2 foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM- Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, adicionado de 0,1% de solução de antibióticos (Penicilina, Estreptomomicina e Anfotericina B). A seguir, foi preparada uma suspensão celular em MEM (1,2x10⁵ células/mL) e 0,5 mL dessa suspensão celular foi depositada sobre lamínulas circulares contidas em placas de cultivo celular com 24 concavidades que foram incubadas por 48 horas a 37°C. As monocamadas celulares foram lavadas três vezes com PBS para retirada dos antibióticos. Cada amostra bacteriana foi suspensa em PBS, pH 7,2, em concentração aproximada de 3x10⁷ UFC/mL, ajustada através de culturas quantitativas e leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 625 nm. Foi adicionado 0,5 mL de cada suspensão bacteriana

sobre as monocamadas celulares, desenvolvidas sobre as lamínulas e a placa de cultivo celular foi incubada por 3 horas a 37°C. Terminado o período de infecção, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes em PBS, pH 7,2, fixadas por fixador de Bouin e desidratadas em uma série de solventes orgânicos (acetona e xilol). A seguir, as lamínulas foram coradas por corante de Giemsa 1:20, pH 7,0, por 45 minutos e montadas em lâminas de microscopia, com óleo de montagem. A capacidade adesiva de cada cepa foi avaliada contando-se o número de bactérias aderidas a 50 células epiteliais, em microscópio de luz, aumento de 1000 vezes e calculando-se a média. Também foram feitas suspensões de células HEP-2 em MEM contendo 1% de D-manose e testadas da mesma maneira.

A expressão de hemolisina foi evidenciada por um halo claro em torno do crescimento bacteriano em ágar-sangue de carneiro (5%) após 18 horas a 37°C.

RESULTADOS

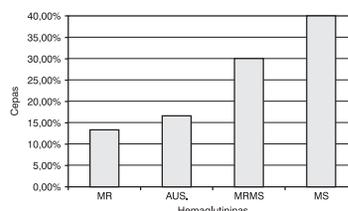
O ensaio de hemaglutinação revelou diferentes fenótipos entre as 30 amostras de *E. coli* em estudo: 25 amostras apresentaram-se hemaglutinantes (83,3%) e 5 amostras não apresentaram hemaglutinação (16,6%). Entre as amostras hemaglutinantes, 12 (40%) expressaram somente hemaglutininas MS, 4 (13,3%) expressaram somente hemaglutininas MR e 9 (30%) expressaram simultaneamente MS e MR (Gráfico 1).

Entre as 21 amostras de *E. coli* que expressaram hemaglutininas MS (12 amostras com fenótipo MS e 9 amostras com fenótipo MR MS), 8 (38%) apresentaram-se hemolíticas (Gráfico 2).

Nos ensaios de adesão bacteriana a células HEP-2 observou-se que as amostras com fenótipo MR MS aderiram em maior número às células (aproximadamente 6,3 bactérias/célula HEP-2). Amostras que expressaram somente hemaglutininas MR apresentaram discreta adesão (aproximadamente 3,8 bactérias/célula HEP-2), enquanto que amostras exclusivamente MS apresentaram baixo poder de aderência celular (aproximadamente 1,3 bactérias/célula HEP-2). Na presença de D-manose, em concentração de aproximadamente 1,2x10⁵ células/mL, as amostras com fenótipo MR MS aderiram à superfície das células HEP-2 de forma difusa, ou em agrupamentos localizados, ou em forma de agregados (Fig. 1).

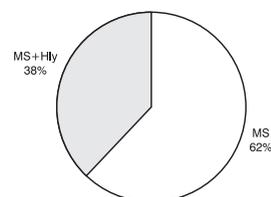
As amostras hemolíticas e com fenótipo MR MS, em concentrações próximas a 6x10⁸ UFC/mL, provocaram descolamento das monocamadas celulares das lamínulas.

Bactérias que não expressaram nenhum dos fatores de virulência em estudo corresponderam a 16,6% dos casos (5 amostras). Porém, deve-se considerar as limitações dos testes empregados e a possibilidade da ocor-



GRÁF. 1 - Distribuição de hemaglutininas Manose-Resistentes (MR) e Manose-Sensíveis (MS) em 30 amostras uropatogênicas de *E. coli*.

Nota: AUS = ausência de hemaglutininas.



GRÁF. 2 - Associação entre expressão de hemaglutininas Manose-Sensíveis (MS) e produção de hemolisina (Hly) em 21 amostras uropatogênicas de *E. coli*.

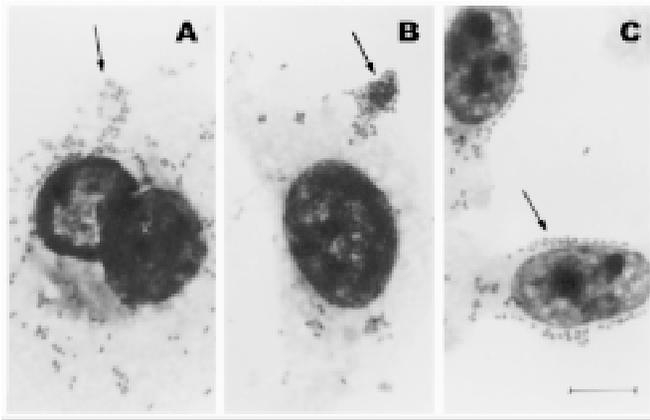


FIG. 1 - Padrões de aderência de amostras uropatogênicas de *E. coli* em células HEp-2. (A) aderência difusa; (B) aderência em agrupamentos localizados; (C) aderência em forma de agregados. Barra: 10 mm; © bactérias (x 1.379,40).

rência de outros tipos de hemaglutininas e adesinas não incluídas nesta pesquisa. Outra hipótese é que condições ambientais de cultivo, armazenagem e as várias passagens bacterianas para meios de conservação podem ter atenuado a expressão desses fatores de virulência, obscurecendo-os¹⁰.

DISCUSSÃO

É conhecida a relação entre a produção de hemolisina por cepas de *E. coli* uropatogênicas com o seu potencial de virulência^{8,9}. Ainda não se sabe exatamente o modo de ação de hemolisinas sobre células nucleadas, porém, pesquisas relatam a ocorrência de danos celulares irreversíveis¹². Considerando que *E. coli* com hemaglutininas MS possuem a capacidade de se ligarem a leucócitos¹, estudos futuros serão necessários para se estabelecer se a associação entre hemaglutinação MS e capacidade hemolítica possa se constituir em mais uma estratégia bacteriana para se livrar do mecanismo de fagocitose.

A linhagem celular HEp-2 tem sido largamente empregada para se avaliar a capacidade adesiva de microrganismos e seus padrões de aderência¹⁵. A adesão celular é considerada o primeiro passo e o mais importante no estabelecimento do processo infeccioso; espera-se portanto, que bactérias com alta capacidade adesiva sejam patógenos mais eficientes. Porém, neste estudo, amostras que expressaram exclusivamente hemaglutininas MS e com baixo poder de aderência *in vitro* representaram 40% do total de isolados. Esses resultados demonstram a efetiva contribuição das hemaglutininas MS ao potencial de virulência das bactérias, embora o seu verdadeiro papel na patogênese das infecções do trato urinário ainda não tenha sido elucidado. O modo como as bactérias aderem às células, ou seja, de forma localizada ou em agregados, ou de forma difusa, são características importantes para a diferenciação de cepas de *E. coli* diarreioigênicas¹⁵. Pesquisas adicionais serão necessárias para verificar se, em cepas uropatogênicas, esses diferentes padrões de aderência celular estão associados ao potencial de virulência. Amostras de *E. coli* diarreioigênicas que causam descolamento de monocamadas celulares das lâminulas, durante ensaios de aderência *in vitro*, pertencem a um grupo distinto de bactérias enteropatogênicas e, frequentemente, expressam simultaneamente hemólise e hemaglutinação MR⁷. Porém, em amostras uropatogênicas esse fenômeno ainda não foi estudado.

Várias condições ambientais afetam a expressão de fatores de virulência *in vitro* e *in vivo*. As pesquisas ainda não são definitivas quanto ao mecanismo que rege o sistema imunológico do hospedeiro, o potencial de virulência dos microrganismos e a relação existente entre ambos. A interpretação dos dados obtidos requer estudos mais aprofundados, para se estabelecer se essas propriedades quando expressadas *in vivo* agem sobre o potencial de virulência bacteriano facultando a colonização ou alterando o curso de uma infecção urinária.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, Departamento de Microbiologia – UNICAMP - pelo fornecimento das cepas-controle de *E. coli* e pela leitura crítica do texto. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Bastos, A. C. S. C.; Santos, L. B.; Tamashiro, W. M. S. C.; Yamada, A. T.; Oliveira, U. M.; Yano, T. Role of Tam-Horsfall protein in the binding and *in vivo* phagocytosis of type 1 fimbriated *Escherichia coli* by mouse peritoneal macrophages. *Braz. J. Med. Bio. Res.*, 34:913-917, 2001.
- Brogden, K. A. Bacterial adherence, colonization, and invasion on mucosal surfaces. In: Roth, J. A.; Bolin, C. A.; Brogden, K. A.; Minion, F. C.; Wannemuehler, M. J. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. 2nd ed. Washington, ASM Press, p.3-33, 1995.
- Duguid, J. P.; Clegg, S.; Wilson, M. I. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 12(2):213-227, 1979.
- Edén, C. S. Bacterial adherence in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 20:81-88, 1986.
- Hagberg, L.; Jodal, U.; Korhonen, T. K.; Lidin-Janson, G.; Lindberg, U.; Edén, C. S. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect. Immun.*, 31(2):564-570, 1981.
- Goluszko, P.; Popov, V.; Selvarangan, R.; Nowicki, S.; Pham, T.; Nowicki, B. J. Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion to HeLa epithelial cell line. *J. Infect. Dis.*, 176:158-167, 1997.
- Gomes, T. A. T.; Abe, C. M.; Marques, L. R. M. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. *J. C. Microbiol.*, 33(12):3364, 1995.
- Green, C. P.; Thomas, V. L. Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis, and asymptomatic bacteriuria. *Infect. Immun.*, 31(1):309-315, 1981.
- Ikäheimo, R.; Shtonen, A.; Kärkkäinen, U.; Mustonen, J.; Heiskanen, T.; Mäkelä, P. H. Community-acquired pyelonephritis in adults: characteristics of *E. coli* isolates in bacteremic and non-bacteremic patients. *Scand. J. Infect. Dis.*, 26:289-296, 1994.
- Kisielius, P. V.; Schwan, W. R.; Amundsen, S. K.; Duncan, J. L.; Schaeffer, A. J. *In vivo* expression and variation of *Escherichia coli* type 1 and P pili in the urine of adults with acute urinary infections. *Infect. Immun.*, 57:1656-1662, 1989.
- Korhonen, T. K.; Virkola, R.; Westerlund, B.; Hothofer, H.; Parkkinen, J. Tissue tropism of *Escherichia coli* adhesions in human extraintestinal infections. *Curr. Top. Microbiol. Immun.*, 151:115-127, 1990.
- Moayeri, M.; Welch, R. Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.*, 62(10):4124-4134, 1994.
- Orndorff, P. E.; Spears, P. A.; Schaver, D.; Falkow, S. Two models of control of pil A, the gene encoding type 1 pilin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 164(1):321-330, 1985.
- Rhen, M.; Knowles, J.; Penttilä, M. E.; Sarvas, M.; Korhonen, T. K. P. fimbriae of *Escherichia coli*: molecular cloning of DNA fragments containing the structural genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 19:267-271, 1983.
- Scaletsky, I. C. A.; Fabbriotti, S. H.; Aranda, K. R.; Moraes, M. B.; Fagundes-neto, U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 40(4):1254-1258, 2002.
- Tullus, K.; Jacobson, S. H.; Katouli, M.; Brauner, A. Relative importance of eight virulence characteristics of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains assessed by multivariate statistical analysis. *J. Urol.*, 146:1153-1155, 1991.
- Warren, J. W. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In: Mobley, H. T.; Warren, J. W. *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. Washington, ASM Press, p.3-27, 1996.

Endereço para correspondência

Dr^a Rosália Rubel

Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas - UFPR

Rua Padre Camargo, 280 - 80000-000 - Curitiba - Paraná

E-mail: r.rubel@terra.com.br

Importância do Fator Antinuclear (FAN) em pacientes com Artrite Reumatóide Juvenil (ARJ)*

Significance of Antinuclear Antibodies (ANA) in Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA)

Leila Monte Pires¹; Adélia Fernandes Vieira de França²; Danielle Folador Guimarães³; Antônio Sérgio da Fonseca⁴; Valéria Soraya de Farias Sales⁵ & Janaina Cristiana de Oliveira Crispim⁶

RESUMO – Amostras de soro de 24 pacientes com Artrite Reumatóide Juvenil (ARJ) foram utilizadas para avaliar a presença do fator antinuclear pela técnica de imunofluorescência indireta-Hep-2. A presença ou não desse auto-anticorpo foi associada com as classificações existentes (pauciarticular, poliarticular ou sistêmica) contribuindo para melhor seguimento da fisiopatologia.

PALAVRAS-CHAVE – Artrite reumatóide juvenil, fator antinuclear, imunofluorescência indireta.

SUMMARY – Sample serum from 24 juvenile rheumatoid arthritis (JRA) children patients were analysed to observe the presence of antinuclear antibodies (ANA), based by indirect immunofluorescence Hep-2 technique. Autoantibodies founded or not were acquainted with classifications (pauciarticular, polyarticular and systemic) contributing to a better following of pathophysiology.

KEYWORDS – Juvenile rheumatoid arthritis (JRA), antinuclear antibodies (ANA), indirect immunofluorescence.

INTRODUÇÃO

Artrite Reumatóide Juvenil (ARJ) ou Artrite Crônica Juvenil é uma doença auto-imune da infância, destrutiva, que se caracteriza por um infiltrado leucocitário e ativação das sinóvias, produção de auto-anticorpos e citocinas pró-inflamatórias, culminando com a destruição das cartilagens e ossos (Hirano, 2002; Maroldo *et al.*, 1997). Além do acometimento das articulações, diversos órgãos podem ser afetados, sendo de melhor prognóstico que a doença seja diagnosticada logo no início (Vilela *et al.*, 1994). Desta forma, a ARJ pode ser classificada em pauciarticular, poliarticular e sistêmica (Maroldo *et al.*, 1997; Skare *et al.*, 2001).

Os auto-anticorpos são conhecidos geralmente como fatores reumatóides e sua presença é usada como um teste auxiliar no diagnóstico para a artrite reumatóide, embora não pareçam ter qualquer papel na patologia articular nem na formação de complexos imunes prejudiciais. Entretanto, a detecção precoce do Fator Antinuclear (FAN) é de grande valia na ARJ, e a presença desse auto-anticorpo, sugere um provável comprometimento visual denominado de uveíte, que é um processo mediado pela deposição de complexos imunes podendo evoluir a sérios danos visuais (Hirschheimer, 2001). Dessa forma, entre os vários métodos para detecção do FAN, destaca-se a técnica da Imunofluorescência Indireta-Hep-2 (Andrade, 2002). Trata-se de um excelente exame de "Screening" para a pesquisa desse auto-anticorpo, pois a sua determinação permite estabelecer o diagnóstico, classificar a doença clinicamente, estabelecer o prognóstico e estado da atividade, auxiliando no tratamento.

O objetivo do nosso trabalho foi investigar crianças com diagnóstico de ARJ e investigar a presença do Fator Antinuclear (FAN).

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Casuística

Foram analisadas amostras de soro de 24 crianças provenientes do HOSPED- UFRN (Hospital Pediátrico da Universidade Federal do Rio Grande do Norte) que receberam o diagnóstico de ARJ de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia.

Parâmetros de inclusão em nosso estudo:

- Idade inferior ou igual a 16 anos;
- Presença de sinais e sintomas superiores a 12 semanas.

METODOLOGIA

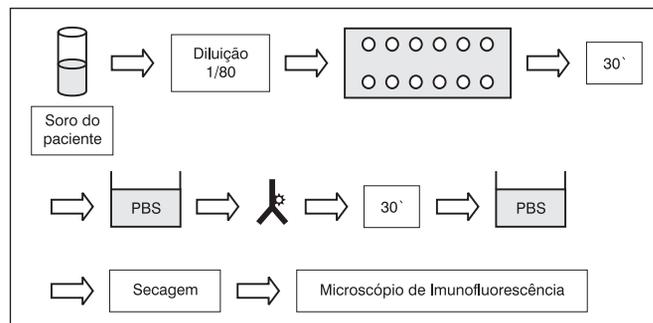


FIG.1 - Pesquisa do Fator Antinuclear (FAN) utilizando células Hep-2 pela técnica de Imunofluorescência Indireta.

Recebido em 27/12/2002

Aprovado em 20/2/2003

*Trabalho desenvolvido na disciplina de imunologia clínica da Fac. de Farmácia Depto. de Análises Clínicas UFRN, projeto desenvolvido pelo CNPQ-PIBIC.

¹Aluna concluinte do XI período de análises clínicas/UFRN e bolsista CNPQ; ²Aluna concluinte do XI período de análises clínicas/UFRN;

³Farmacêutica bioquímica; ⁴Professor mestre e médico reumatologista/Hosped; ⁵Professora doutora da disciplina de imunologia clínica/UFRN;

⁶Professora mestranda da disciplina de imunologia clínica.

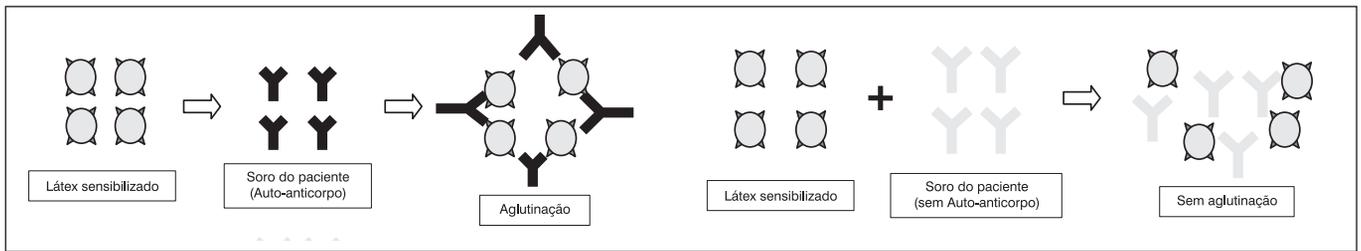
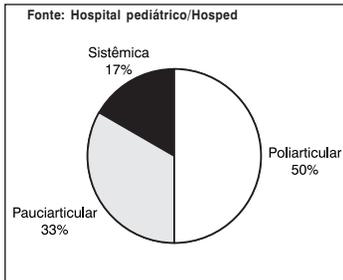
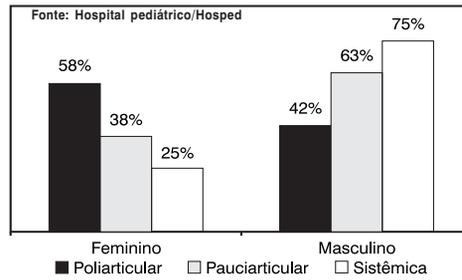


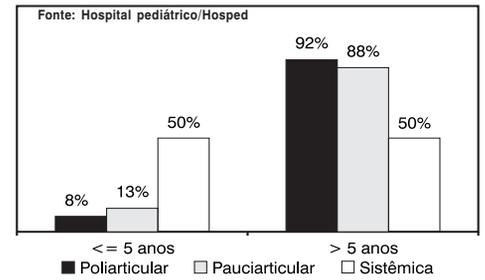
FIG. 2- Pesquisa do Fator Reumatóide (FR) através da técnica de aglutinação indireta em látex.



GRÁF. 1 - Classificações das formas de ARJ



GRÁF. 2 - Formas clínicas da ARJ e a relação com o sexo



GRÁF. 3 - Formas clínicas da ARJ em a relação da faixa etária

Análise estatística

A análise estatística foi apresentada em duas partes: Estatística Descritiva (percentuais, gráficos e tabelas) e Estatística Inferencial (teste não-paramétrico de Fisher).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em nosso trabalho, a forma predominante de apresentação da ARJ foi a Poliartricular (50%), em seguida a Pauciarticular (33%) e a Sistêmica (17%) (Gráfico 1). Esses resultados obtidos foram encontrados nos estudos de Gual *et al.*, 1996.

Dos casos estudados, a idade das crianças analisadas variou de 1 a 15 anos (Média=8,75); (Desvio padrão=3,71). Na forma Poliartricular a faixa etária predominante foi entre 11 e 15 anos, na Pauciarticular entre 6 e 10 anos e na Sistêmica não foram observados casos na faixa de 11 a 15 anos (Gráfico 3). O teste de Fisher demonstrou um nível de significância maior que 5%, ou seja, não existe diferença entre as faixas etárias com relação as formas clínicas de ARJ. Não havendo concordância com os trabalhos anteriores em relação a faixa etária da forma pauciarticular e poliarticular (Gual *et al.*, 1996).

Das 24 crianças, houve maior predominância do sexo masculino na forma Pauciarticular e Sistêmica. O teste de Fisher demonstrou um nível de significância maior que 5%, ou seja, não existe diferença entre os sexos com relação as formas clínicas de ARJ. (Gráfico 2). Esses resultados estão de acordo com Vilela *et al.*, 1994.

Como é visto na literatura de Arnal *et al.*, 1993, havendo diferença entre os sexos quando articulações são os órgãos-alvo mais acometidos, além do aparecimento das manifestações extra-articulares embora em menor intensidade. No acompanhamento clínico da nossa casuística (n = 24 crianças) tiveram acometimentos articulares do joelho (20), do tornozelo (15), nos punhos (8), cotovelos (8), em mercaptofalangeanas (7),

TABELA I
Acometimentos articulares e extra articulares nas formas clínicas de ARJ

Local de articulação	Formas clínicas de ARJ					
	Poliartricular (n=12)		Pauciarticular (n=8)		Sistêmica (n=4)	
	n	%	n	%	n	%
Joelhos	10	83%	7	88%	3	75%
Tornozelos	7	58%	4	50%	4	100%
Punhos	3	25%	2	25%	3	75%
Mãos	3	25%	1	13%	3	75%
Cotovelos	4	33%	3	38%	1	25%
Pés	4	33%	1	13%	1	25%
Coluna Cervical	3	25%	0	0%	0	0%
Ombros	1	8%	0	0%	1	25%
Coxa	2	17%	0	0%	1	25%
Erupção	2	17%	1	13%	1	25%
Esplenomegalia	0	0%	0	0%	1	25%
Hepatomegalia	0	0%	0	0%	1	25%

Fonte: Hospital pediátrico/Hosped

coluna cervical (3) e coxa (3). As características extra-articulares observadas foram o rash cutâneo (4), esplenomegalia (1) e hepatomegalia (1) e irritação ocular (3) (Tabela I).

Segundo Jarvis *et al.*, o FR relaciona-se com a severidade articular de episódios mais graves de sinovite (Jarvis *et al.*, 1991). As células da sinóvia em proliferação expressam antígenos de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) e moléculas co-estimulatórias que ampliam a ativação de células T auxiliares, essas células estimulam os linfócitos B que produzem imunoglobulinas. Dentre as imunoglobulinas está o FR, que é um autoanticorpo que se dirige contra a fração Fc da molécula de imunoglobulina (Hirano, 2002). No nosso estudo, apenas em 5 (23,8%) pacientes o FR encontrou-se positivo.

TABELA II
Exames laboratoriais complementares
nos pacientes com ARJ

n	Sexo	Hb (g/dL)	Hto (%)	VSH (mm)	Leucócitos (mm ³)	Plaquetas (mm ³)
1	f	14	NR	10	5700	NR
2	m	6	NR	46	NR	299000
3	m	NR	NR	32	14900	514000
4	f	12.5	38	NR	5860	NR
5	m	8.24	24.1	66	5000	NR
6	f	13.9	NR	18	8510	28000
7	f	15	NR	19	9238	NR
8	m	NR	NR	NR	NR	NR
9	m	15.6	NR	19	4650	241000
10	f	12.7	12.7	32	5640	NR
11	f	12.6	NR	24	9300	NR
12	m	12	33	14	18000	NR
13	m	12.7	36	14	34800	NR
14	f	11.2	33.3	NR	8371	346000
15	m	14.5	NR	NR	5400	270000
16	f	12.8	NR	NR	5800	250000
17	m	12.3	NR	23	5800	NR
18	m	12.99	37	28	6850	NR
19	m	8.62	26.2	NR	13100	520000
20	f	NR	NR	NR	NR	NR
21	m	14.7	NR	NR	12800	NR
22	m	11.2	33.4	NR	10200	NR
23	f	11.8	NR	NR	6780	347000
24	f	12.8	NR	33	8640	261000

Hb – Hemoglobina Hto – Hematócrito
VSH – Velocidade de Hemossedimentação NR – Não registrado
Valores de referência: Hb: 10,5-13,5g/dL (até 1 ano)
12,0-14,0g/dL (3 a 6 anos)
11,5-14,5g/dL (10 a 12 anos)
Hto: 35% a 37%
VHS: 4-7mm
Leucócitos: 4.000 a 11.000/mm³
Plaquetas: 150.000 a 400.000/mm³

A investigação dos anticorpos antinucleares representa contribuição fundamental no diagnóstico das doenças reumáticas sistêmicas como a ARJ, geralmente a freqüência do FAN é bastante variada, embora, quando presente seja indicativo de uma associação com a uveíte em crianças na faixa etária de pré-escolar (Utiya-

ma *et al.*, 1995). Trabalhos já publicados na literatura encontraram diferentes percentuais de correlação dos achados do FAN com a uveíte. Arnal *et al.*, encontrou um percentual de 1,4%, Schneider *et al.* 5% dos casos de ARJ que apresentaram uveíte tiveram a pesquisa do FAN positivo. Em nossa casuística não foi encontrado nenhum paciente com o FAN positivo e nenhum deles também manifestou uveíte. Sugerindo que a uveíte é mediada pela deposição de auto-anticorpos do tipo anti-fosfolipídeos que geralmente são detectados pela pesquisa do FAN.

Outros parâmetros laboratoriais complementares foram registrados como: contagem de leucócitos, velocidade de hemossedimentação (VHS) e dosagem de hemoglobina. Das 24 crianças investigadas, 14 apresentaram VHS elevado, embora 10 pacientes não tivessem seus dados registrados. A dosagem de hemoglobina foi registrada em 21 pacientes e 5 destes apresentaram seus valores diminuídos. E, em relação ao número de leucócitos 5 crianças das 21 mostraram leucocitose (Tabela II).

REFERÊNCIAS

1. **Andrade, Luís.** Como valorizar os resultados do teste de FAN (anticorpos anti-núcleo) e suas diferentes metodologias. *Revista Sinopse de Reumatologia.* n.1, p.3-9, abr 2002.
2. **Arnal, C. et al.** Polyarticular onset juvenile chronic arthritis: retrospective multicenter analysis. *Revista Espanhola de Reumatologia.* v. 20, p.55, 1993.
3. **Gual, Rosa et al.** Juvenile rheumatoid arthritis: clinical and immunogenetic aspects of a series of brazilian patients. *Revista Brasileira de Reumatologia.* v.36, n.3, p.115-119, maio/jun 1996.
4. **Hirano, Toshio.** Revival of autoantibody model in rheumatoid arthritis. *Nature Immunology.* v.3, n.4 apr, p.342-344, 2002.
5. **Huschheimer, Sônia.** Elementos básicos de diagnóstico na artrite crônica da infância. *Temas de Reumatologia Clínica.* v.2, n.2, jun 2001.
6. **Jarvis, J. N. et al.** Detection of IgM rheumatoid factors by enzyme-linked immunosorbent assay in children with juvenile rheumatoid arthritis. Correlation with articular disease and laboratory abnormalities. *Pediatrics.* v.90, p.945-949, 1992.
7. **Maroldo, Marta et al.** Juvenile rheumatoid arthritis in affect sibpairs. *Arthritis & Rheumatism.* v.40, n.11, p.1962-1966, nov 1997.
8. **Schneider, Rayel et al.** Prognostic indicators of joint destruction in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Pediatrics.* v.120, n.2, part 1, Feb 1992.
9. **Skare, Thelma et al.** O papel do hormônio do crescimento na artrite reumatóide juvenil. *Revista de Pediatria Moderna.* v.37, n.10, p.493-502, out 2001.
10. **Utiyama, Shirley et al.** O uso de diferentes substratos na investigação dos anticorpos antinucleares em doenças reumáticas sistêmicas. *Revista Brasileira de Reumatologia.* v.35, n.1, p.11-16, jan/fev 1995.
11. **Vilela, Rosane et al.** Artrite reumatóide juvenil: estudo retrospectivo de 56 casos. *Revista Brasileira de Reumatologia.* v.3, n.3, p.123-128, 1994.

Endereço para correspondência
Profª Janaina Cristiana de Oliveira Crispim
Rua Monsenhor João da Mota, nº 20 - Lagoa Nova - 59075-020 - Natal - RN
E-mail: janacrispim@hotmail.com

XIX Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2003
XXVI Congresso da Soc. Bras. de Hematologia e Hemoterapia

17 a 20 de maio

Palácio de Convenções do Anhembi
Tels. (0xx11) 3067-1468 /1469/ 1450
E-mail: congres@crfsp.org.br
www.congressocrf.org.br

ITM EXPO – São Paulo
6 a 9 de agosto

Tel. (0xx16)623-9399/3963-9300 r. 9510
E-mail: hematologia@vrfutura.com.br
http://bit.fmrp.usp.br/congresso2003-04-08

XIII Congresso Paulista de Farmacêuticos
V Seminário Internacional de Farmacêuticos
17 a 20 de maio de 2003

Palácio de Convenções do Anhembi, São Paulo, SP
Tel. (0xx11)3067-1468/1469 • E-mail: congres@crfsp.org.br

XV IFCC-FESCC

European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
XXII National Congress of the Spanish Society of Clinical
Biochemistry and Molecular Pathology
1 a 5 de junho de 2003

Catalonia Palace, Barcelona, Espanha
Tel. +39 02 69006444 • Fax +39 02 6686699
E-mail: euromedlab2003@mzcongressi.com

HPV - Relato de um caso clínico

HPV - a case report

C. Filippin¹; F. M. Hamada² & C. L. Vituri³

RESUMO – Relato de caso de paciente de 16 anos de idade, com diagnóstico de infecção cérvico vaginal por Papilomavírus Humano (HPV), sugerido inicialmente através de citologia oncótica pela presença evidente de coilocitos, critério patognomônico para HPV e posteriormente comprovado por Captura Híbrida a presença de HPV de alto potencial oncogênico. Realizou-se também colposcopia, onde se observaram lesões em colo e vulva características do mesmo agente, contudo o estudo histopatológico demonstrou alterações displásicas, sem entretanto caracterizar presença de qualquer agente específico.

PALAVRAS-CHAVE – HPV; exame de Papanicolaou; colposcopia.

SUMMARY – A case report the patient of 16 year-old woman, with vaginal cervix infection diagnostic by Human Papiloma Virus (HPV) and Papanicolaou smear were positive for HPV (koilocyto) as well as detected HPV with high-grade oncogenic potential of molecular biology after that. The colposcopic examination found lesions in cervix and vulva suggesting HPV. However, the histopathologic evaluation showed displasic alterations with no detection of any etiologic agent.

KEYWORDS – HPV; Papanicolaou smear; colposcopic.

INTRODUÇÃO

Historicamente, verrugas genitais são conhecidas em citações de escritos gregos e romanos; menções datadas da idade média também são encontradas (Halbe, 1995).

Ciuffo em 1907, observou que verrugas genitais poderiam ter semelhanças histológicas com verrugas de pele, e que estas inoculadas em outros locais podiam levar ao desenvolvimento de lesões verrucosas planas comuns. Em estudos posteriores em 1949, Strauss, observou através de microscopia eletrônica em material das verrugas, a presença de partículas intranucleares (Halbe, 1995).

Em 1962, Melnik, estudando estas partículas virais agrupou-as na família *Papovaviridae*, reunindo os papilomavírus e os poliomavírus, ambos DNA vírus, com capacidade de provocar crescimento tumoral e características ultra-estruturais similares (Halbe, 1995).

Desde o seu descobrimento até agora a infecção pelo *Papilomavírus humano* (HPV) chama a atenção tanto da paciente quanto do médico, quer pela presença de verrugas como pelas alterações presentes na citologia, como coilocitose, disqueratose, paraceratose e alterações nucleares. A infecção se inicia com a inoculação do vírus em locais de microtraumas no trato genital, freqüentemente durante a relação com um parceiro infectado (Halbe, 1995).

Após a inoculação, em áreas de microtraumatismo envolvendo células parabasais e/ou metaplásicas, o HPV pode penetrar até a camada basal, atravessando a membrana celular e seu genoma pode então ser transportado ao núcleo, onde as partículas virais começam sua replicação, à medida que as células amadurecem, ao se tornarem intermediárias e superficiais.

O processo de replicação do DNA ocorre nos núcleos e as células afetadas que passam a constituir um reservatório viral. Ao que parece, com o aumento das citoqueratinas, aquelas células vão se tornando permissíveis à síntese de capsídeo protéico e virions completos. Inicia-se o período de incubação cuja duração varia de 1 a 8 meses (Oriol, 1971). Neste local de entrada, o DNA viral é então traduzido e transcrito levando à formação de proteínas virais específicas. Em alguns indivíduos esta colonização é seguida por expressão viral ativa, resultando num distúrbio do crescimento e maturação celular (Halbe, 1995, Piatto, 1997).

Entretanto, na maioria dos casos, a infecção permanece latente podendo ter um curso bastante variado, evoluindo como lesão subclínica a clínica no mesmo indivíduo. A infecção ativa pode persistir evidenciada pela presença de lesões ou por sinais cito-histológicos ou colposcópicos, sem evidências de transformação neoplásica. A regressão e completa resolução da infecção também pode ocorrer, embora seja muito difícil, senão impossível, comprovar a completa ausência do vírus ou sua persistência em fase latente. Existem evidências que infecções subclínicas podem fazer parte de um processo evolutivo para a neoplasia intraepitelial, o que geralmente não ocorre nas clinicamente aparentes. (Halbe, 1995).

Em torno de 3 meses após a eclosão da lesão clínica ou subclínica, ocorre uma resposta imune do hospedeiro. O comportamento das lesões reflete a habilidade ou não do sistema imunológico em, efetivamente, eliminar ou suprimir a expressão viral. Determinadas pacientes podem evoluir apresentando remissão (40%) ou persistência (60%), sendo que destas, 15% podem apresentar progressão para neoplasia (Halbe, 1995).

Recebido em 9/12/2002
Aprovado em 18/2/2003

¹Ministério do Exército – Hospital de Guarnição de Florianópolis; ²Ministério do Exército – Hospital de Guarnição de Florianópolis; ³Univ. Fed. de Santa Catarina

Como acontece com toda doença viral, o estado imunológico do portador constitui fator de importância relevante; dessa forma, observamos regressões espontâneas com relativa frequência e, da mesma maneira, pacientes em uso de imunossupressores constituem grupo onde o controle das lesões é extremamente difícil (Piato, 1997).

No entanto, não raramente nos deparamos com mulheres portando lesões recentes, sem contudo possuírem vida sexual ativa há muito mais tempo (Piato, 1997).

Na atualidade, 70 tipos diferentes de HPV já foram caracterizados, sendo que 22 deles apresentavam um maior tropismo pelos órgãos genitais. Estes últimos, por sua vez, são classificados, de acordo com seu potencial oncogênico, em três classes, denominadas de alto, médio e baixo risco. Os tipos 6, 11, 41, 42, 43 e 44 são considerados de baixo potencial oncogênico; em contrapartida, os tipos 16, 18, 45 e 46 freqüentemente encontram-se relacionados às neoplasias intra-epiteliais e invasivas, em especial, aquelas do colo uterino, de acordo com Piato (1997).

De fato, através de metodologia imuno-histoquímica pode-se observar a presença de antígenos virais, principalmente nas camadas mais superficiais dos condilomas. Para De Brux (1983), os vírus assim produzidos, são responsáveis pela infecção das células vizinhas, o que completa o ciclo vicioso (Piato, 1997).

Descrição do caso

Paciente do sexo feminino, solteira, 16 anos de idade, estudante, classe média, compareceu ao hospital para realizar consulta médica e o primeiro exame preventivo de câncer de colo uterino (Papanicolaou), tendo iniciado vida sexual há um ano, relatando corrimento amarelado com cheiro forte sem prurido; paciente não faz uso de anticoncepcional oral.

Ao exame especular observaram-se lesões vulvares verrucosas positivas ao ácido acético e áreas aceto-brancas em colo uterino. Teste de Schiller positivo, iodo negativo por toda lesão. Procedeu-se à coleta de citologia oncótica onde se obteve resultado de quadro sugestivo de Neoplasia Intra-epitelial Cervical Grau I, Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau segundo Bethesda, com efeitos citopáticos compatíveis com Human Papiloma Vírus (HPV) (Figuras 1, 2 e 3).

Procedeu-se em próxima consulta, colposcopia dirigida onde se observaram lesões aceto-brancas em

colo uterino e lesões aceto-brancas e verrucosas na vulva. Realizou-se coleta de histopatológico onde se obteve resultado de Displasia Intra-epitelial Grau I, sem entretanto relatar presença de HPV. Foi solicitado também Captura Híbrida para HPV, obtendo-se o resultado de HPV – DNA para grupo II, nos quais se incluem os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58 e 68, determinados de alto risco ou oncogênicos.

Em conseqüência, iniciou-se tratamento com ácido tricloroacético a 85% em conduta seqüencial.

DISCUSSÃO

No momento atual, o diagnóstico de uma lesão por HPV se concentra, sempre na tríade citologia-colposcopia-histologia.

A infecção vulvar por HPV é a patologia mais prevalente dos genitais externos. A infecção e a neoplasia vulvar se associa a da cérvix e vagina em cerca de 20% dos casos (Jarufe Palou, 1995).

Verificou-se em estudos de Castillo, 1994, que a infecção por HPV é freqüente em mulheres jovens e encontrou-se imagens colposcópicas (epitélio aceto-branco) em 42% na cérvix e mácula condilomatosa em 38% na vulva. Verificou-se uma correlação de imagens colposcópicas características (leucoplasia) com os vários graus de NIC em 50% dos casos. Nas pacientes estudadas verificou-se a multicentricidade do HPV tanto na cérvix quanto na vulva (Herrera, 1997).

Em nosso estudo ao exame físico, observaram-se lesões do HPV sob a forma clínica, a qual correspondem às lesões percebidas pela paciente e/ou diagnosticadas pelo médico, através do exame ginecológico rotineiro. Nessa oportunidade, notou-se a presença de lesões verrucosas com superfície micropapilar e irregular, acometendo intróito vaginal, lábios maiores e menores. Como refere Piato, 1997, costumam ser numerosas e um pouco mais escuras que a pele circunjacente e a paciente apresenta prurido e ardor ao coito. Quando em áreas de mucosa, apresenta-se hiperemiada, tornando-se marcadamente esbranquiçada em contato com o ácido acético a 2–5%. A lesão verrucosa raramente surge no colo uterino; em contrapartida, a vulva constitui-se em sua sede principal.

Ao teste de Schiller, mostram fraca ou nenhuma captação da solução de iodo-iodeturada. Sob a ação do azul de toluidina (teste do Collins) tornam-se ligeiramente azuladas, em decorrência da retenção do corante entre as micropapilas. Segundo Piato, 1997, es-

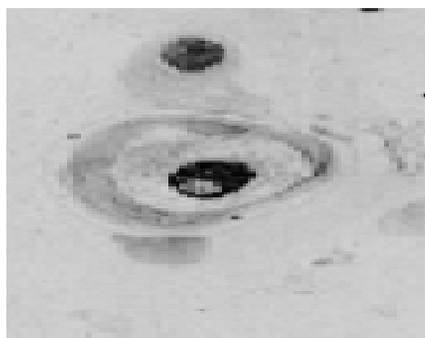


FIG. 1 - Aspectos citológicos do coilócito – célula com núcleo hiper cromático e volumoso halo perinuclear (400 x).



FIG. 2 - Aspectos citológicos do coilócito – célula intermediária com núcleo hiper cromático (400 x).



FIG. 3 - Aspectos citológicos do coilócito – célula intermediária com núcleo hiper cromático e eosinofilia (400 x).

tas lesões são causadas, na maioria das vezes, pelos HPV 6 e 11 de baixo potencial oncogênico, raramente se associam ao surgimento de neoplasias genitais. Entretanto, neste caso, em estudo o HPV tipificado foi um de alto potencial oncogênico.

No caso estudado, o exame colposcópico observou associação de dois tipos de forma clínica, na vulva do tipo Condiloma Acuminado que é usualmente detectado a olho nu e apresenta aspecto típico. A literatura (Zamith, 2001) descreve como superfície irregular, com projeções digitiformes, no centro das quais se nota alça capilar. Pode ser encontrado na vulva, vagina e em toda extensão ectocervical. É quase sempre múltiplo e, habitualmente, acompanhado de outras imagens de infecção pelo HPV, como espessamento epitelial, imagens brancas planas e saliências nas paredes vaginais. É o tipo de lesão mais comumente encontrado na vulva (Zamith, 2001). Esta descrição é concordante com nossos achados.

Entretanto, no colo se observou Condiloma Plano Viral que só é visível após a aplicação de ácido acético. Observamos as imagens planas, leucocitárias e, às vezes, mosaicos e pontilhados. A literatura refere que quando totalmente planos, é impossível ao colposcópico diferenciá-los da neoplasia intra-epitelial. Hiperqueratose também pode estar presente, por vezes, com relevo, exibindo aspecto cerebróide. No condiloma plano viral, a presença de padrão vascular grosseiro faz suspeitar de associação com neoplasia intra-epitelial (Zamith, 2001).

No exame citológico praticado rotineiramente, o sinal característico da presença do vírus é a coilocitose. Trata-se de alteração facilmente identificável, que acomete células intermediárias ou superficiais e que se manifesta pela presença de citoplasma claro, vacuolizado, que circunda núcleo pequeno, irregular e hiper cromático. Sua primeira descrição foi feita por Koss e Durfee (1956), que ressaltam ainda a presença de disqueratose nos esfregaços. Esta última alteração caracteriza-se por forte eosinofilia citoplasmática, observável em células menores que as intermediárias. Descrevem ainda a presença de núcleos densos e hiper cromáticos e multinucleação (Piato, 1997).

Em nosso estudo encontramos citologia positiva, com presença de coilócitos característicos, em número reduzido e, ausência de alteração displásica no material, além dos núcleos coilocitóticos, demonstrando atípicas.

Esses achados citológicos são muito evidentes, especialmente quando a infecção pelo HPV não está associada às neoplasias epiteliais. Nesta associação, os efeitos citopáticos virais diminuem gradativamente, de maneira inversa à gravidade do quadro oncológico (Piato, 1997).

Apesar de a literatura referir que o estudo anatomopatológico mostra alterações celulares semelhantes àquelas da citologia, acrescidas da papilomatose, da hiperplasia da camada basal e da acantose, critérios arquiteturais inerentes ao estudo de preparados histológicos, e o aspecto anatomopatológico que, sem dúvida, define, nos quadros da associação com HPV, a gravidade da lesão neoplásica, (Piato, 1997), em nossa exposição, não foi possível compactuar com esta particularidade.

A análise histopatológica realizada neste caso clínico, não fez menção para HPV desta negatividade, devido à possibilidade de ser a infecção recente, de tal maneira que o agente etiológico tenha comprometido pequeno número de células, permitindo o diagnóstico citológico, sem apresentar, contudo, confirmação histopatológica (Dores, 1991), o que também foi observado em estudos de Bagarelli, 1997, que em revisão histopatológica objetivando o HPV, encontrou coilócitos em 52,67% dos casos estudados. Tem-se observado que as diferenças morfológicas entre a infecção viral e a neoplasia cervical intra-epitelial são mais quantitativas do que qualitativas (Chaves, 1988).

O tratamento eficaz nos casos de infecção pelo HPV não está ainda devidamente protocolado. Um dos métodos mais comumente destacados é o do ácido tricloroacético, está sendo utilizado como conduta terapêutica para este caso.

As pacientes submetidas a qualquer das modalidades terapêuticas devem ser submetidas a controles citológicos e colposcópicos rigorosos, no sentido de se impedir a eclosão de formas invasivas de neoplasia (Piato, 1997).

Recomenda-se incluir a vulvoscopia dentro dos métodos de pesquisa para lesões vulvares induzidas por HPV, como método preventivo e de determinação precoce das displasias vulvares (Bastardo, 1996).

Um aspecto importante, são as evidências que vinculam o HPV ao carcinoma do colo uterino, em especial, ao do tipo epidermóide e, saber que em grande parte, se não totalmente, esta enfermidade pode ser evitada com a realização de apenas um consulta médica acompanhada do exame citológico anual.

Concluimos que, o rastreamento da infecção pelo HPV deve ser baseado no exame citológico, colposcópico e histológico das lesões, além da determinação do tipo viral, a fim de estabelecer o prognóstico e avaliar a necessidade de tratamento mais agressivo.

REFERÊNCIAS

1. Bagarelli, L. B.; Oliani, A. H. Infecção por papilomavírus humano (HPV) e neoplasias do colo uterino. *HB Cient.* n.4, v.1, p.31-49, jan/abr, 1997.
2. Bastardo, R. O.; Ramos Morales, M. *Vulvoscopia en pacientes con infección por virus del papiloma humano.* Caracas. s.n; 23p. nov, 1996.
3. Castillo, A.; Valera, M. Multicentricidad de la infección por V.P.H. en el tracto genital inferior femenino en las pacientes de la consulta de ginecología del Hospital Central Universitario Antonio María Pineda. *Boletim Médico Postgrado.* n.10 v.3, p.164-8, set/dez, 1994.
4. Chaves, E. Lesões condilomatosas de cérvix uterina: estudos histológico e citológico. *Jornal Brasileiro de Ginecologia.* n.98, v.9, p.473-477, set, 1988.
5. Dores, G. B. et al. Diagnóstico da infecção cervico-vaginal por papilomavírus humano. Valor da colposcopia, citologia e da histologia como método diagnóstico. *Revista Paulista de Medicina.* n.109, v.3. mai/jun, 1991.
6. Halbe, H. W. *Tratado de Ginecologia.* V.1, 2ª ed. Roca. São Paulo. 1995.
7. Herrera, G. Vulvoscopia y biopsia dirigida en infección vulvar por papiloma virus humano. *Ginecologia obstetricia.* n.43 v.2, p.116-120, ago, 1997.
8. Jarufe Palao, F. N. Colposcopia y biopsia en el diagnóstico de infección vulvar por Papiloma Virus Humano HRHD, Arequipa-Perú, marzo 94 a febrero 95. Arequipa, *UNSA;* p.48. out, 1995.
9. Naud, P. et al. Correlação entre citologia, colposcopia, histologia e tipagem viral em lesões precursoras de câncer de cérvix uterina na infecção pelo papiloma virus humano (HPV). *Revista AMRIGS,* n.38 v.1, p.18-22, jan-mar, 1994.
10. Piato, S. *Tratado de Ginecologia.* Artes médicas. São Paulo. 1997.
11. Zamith, R.; Lima, G. R. Doenças Sexualmente Transmissíveis. *Revista Compacta. Temas em Ginecologia.* V.1, n.2. jul, 2001.

Endereço para correspondência

Drª Carla Filippin Lopes

Rua Dr. Abel Capela, 337 - Coqueiros, 88080-250, Florianópolis, SC

Presença de ovos de helmintos em hortaliças fertilizadas com lodo de lagoa de estabilização

Presence of the helminths eggs in vegetables fertilized with stabilization lake sludge

João Bezerra de Carvalho¹; Elmiro Rosendo do Nascimento²; Vinicius Rezende Ribeiro³; José Firmino Nogueira Neto⁴; Isabela Sgarbi de Carvalho⁵; Fabiano Sgarbi de Carvalho⁶; Leonardo Sgarbi de Carvalho⁶ & Juliana Sgarbi de Carvalho⁷

RESUMO – Foi verificada a presença de ovos de helmintos parasitas, tais como Ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris sp* e *Enterobius vermicularis*, em hortaliças fertilizadas com lodo de esgoto da Estação de Tratamento Coletivo de Esgoto da Lagoa de Estabilização situada em Sertão do Carangola, no município de Petrópolis, RJ, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE – Helmintos, hortaliças, lodo de esgoto, lagoa de estabilização.

SUMMARY – It was verified the presence of parasites helminths eggs such as Ancylostomides, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris sp* and *Enterobius vermicularis* in vegetables fertilized with sewage sludge from the Stabilization Lake Collective Treatment Station, in Sertão de Carangola, Petrópolis city, Brazil.

KEYWORDS – Helminths, vegetables, sewage sludge, stabilization lake.

INTRODUÇÃO

As helmintoses intestinais ainda representam um importante problema mundial de saúde para o homem, inclusive no Brasil, onde ocorrem níveis elevados de parasitismo em várias regiões e que se relacionam tanto com fatores de saneamento básico e qualidade de vida, quanto com medidas individuais de prevenção e de controle. Sabe-se que seu ciclo de transmissão se desenvolve fundamentalmente através da água, solo, ar, alimentos e objetos contaminados pelas fezes dos portadores destas parasitoses.

Estudos dessas parasitoses no Brasil indicam a maior ocorrência de *Ascaris lumbricoides*, em infecções simples ou mistas, sendo também observados *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Hymenolepis spp*, Ancilostomídeos, *Enterobius vermicularis* e outros, apresentando variadas taxas de prevalência conforme as condições ecológicas para sua sobrevivência dentro e fora do hospedeiro e a interação dos diversos fatores que concorrem para a instalação da doença.

Muitas das parasitoses transmissíveis ao homem provêm dos esgotos domésticos constituídos de águas poluídas que contém matéria fecal e águas de lavagem; uma disposição inadequada da excretas expõe o homem à contaminação, permite acesso aos vetores animados e polui a água e o solo, o que torna imprescindível o atendimento à população com coleta e tratamento de esgotos. Dentre os métodos coletivos utilizados para o tratamento de águas servidas estão o tra-

tamento convencional, valo de oxidação e o filtro biológico, sendo a lagoa de estabilização, o mais comum, devido ao baixo custo e praticidade (Manual de Saneamento, Brasil, MS, 1999).

A fertilização agrícola utilizando resíduos sedimentares produzidos a partir do tratamento de águas servidas tem sido uma recente alternativa para a disposição dos biossólidos, pois se constituem em uma rica e abundante fonte de nutrientes, embora de grande impacto no ambiente e na saúde pública, por sua influência na qualidade sanitária das plantas (Rocha, 2000).

Em algumas regiões do país, independente do método de adubação, foi verificada contaminação dos produtos de horticultura, com a presença de oocistos, ovos e larvas de helmintos e outros agentes nocivos em vegetais comercializados e utilizados para consumo.

A constante preocupação com a saúde pública e sua relação com o saneamento básico e a educação sanitária geraram a necessidade de se ampliar os conhecimentos sobre as helmintoses e suas formas de disseminação. O presente estudo objetivou analisar parasitologicamente as hortaliças produzidas na Estação de Reciclagem de Nutrientes, localizada no distrito de Sertão do Carangola, no município de Petrópolis, RJ.

As parasitoses intestinais, pela sua elevada prevalência e pela diversidade de manifestações clínicas, representam um problema de grande importância em Saúde Pública, particularmente em países em desenvolvimento onde ainda são insatisfatórias as condições de saneamento e de educação das populações, especialmente as classes menos favorecidas (Silva *et al.*,

Recebido em 6/2/2003

Aprovado em 18/2/2003

¹Professor Adjunto, Departamento de Higiene e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ);

²Professor Adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF); ³Professor Adjunto, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia (UFRuralRJ); ⁴Professor, Departamento de Patologia e Laboratórios, Coordenador da Disciplina de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); ⁵Médica da Cooperar Saúde, RJ; ⁶Acadêmico de Medicina da Universidade Gama Filho;

⁷Acadêmica de Odontologia da Universidade do Grande Rio.

1995). Os alimentos consumidos crus e contaminados pelo meio ambiente e por manipuladores infectados contribuem para formar a cadeia de transmissão dessas parasitoses, sendo este fator considerado com um dos mais importantes meios de disseminação (Silva *et al.*, 1995).

Os fatores que concorrem para a ocorrência de doenças parasitárias através da ingestão de frutas e verduras consumidas cruas, oriundas de áreas cultivadas contaminadas por dejetos fecais ou irrigadas com águas poluídas, têm despertado o interesse de pesquisadores de várias partes do mundo, assim como no Brasil (Marzochi, 1978).

Silva *et al.* (1995) consideraram que a gravidade das doenças bacterianas, virais e parasitárias, cujos agentes são eliminados pelas fezes humanas, impõe a necessidade de adoção de métodos práticos, rápidos e sensíveis de monitoramento da poluição fecal do ambiente. A evidência e a identificação dos cistos e ovos dos enteroparasitas humanos no meio ambiente constitui um importante indicador de contaminação fecal do mesmo. Estes mesmos autores avaliaram e constataram, em seu estudo, através de métodos parasitológicos usuais, a contaminação por cistos e ovos de enteroparasitas de 220 amostras de hortaliças que são comercializadas e consumidas cruas nos supermercados do Rio de Janeiro.

Os resultados que Moraes (1998) obteve em seu estudo sobre os efeitos do destino dos excretos humanos/esgotos sanitários sobre as helmintoses intestinais mostram que nos assentamentos com rede simplificada de esgotamento sanitário e com estruturas de drenagem a prevalência de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos, nas crianças estudadas, apresentaram uma significativa diferença quando comparadas com aquelas das crianças residentes em assentamentos com esgotos a céu aberto. Demonstram, deste modo, que as melhorias de disposição de excretos/esgotos sanitários, contribuíram para controlar a transmissão no ambiente de domínio público das helmintoses intestinais estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A fase experimental desta pesquisa foi efetuada no período de março a outubro de 1998 envolvendo coletas de amostras de hortaliças oriundas de Sertão do Carangola. A Estação de Reciclagem de Nutrientes de Sertão do Carangola faz tratamento exclusivo de águas servidas domiciliares atendendo uma pequena comunidade residencial (300 famílias), utiliza o método de Lagoa de Estabilização e o lodo produzido a partir do tratamento das águas residuárias é utilizado na fertilização de hortaliças desta localidade.

As amostras das hortaliças salsa e alface, produzidas e adquiridas nos postos comerciais da região, foram identificadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais. No laboratório, as hortaliças foram lavadas em água destilada e o produto da lavagem, filtrado em gaze e posteriormente deixado em repouso em cálice cônico.

Inicialmente, o sedimento obtido foi analisado ao microscópio, por exame direto. No Laboratório de

Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, as amostras de hortaliças foram submetidas a exame parasitológico qualitativo, através das técnicas de Hoffman e Willis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um total de 62 amostras de hortaliças examinadas, 18 (29,03%) encontravam-se contaminadas e 44 (70,93%) estavam negativas para ovos ou larvas de helmintos. As alfaces encontravam-se mais contaminadas que as salsas, embora a frequência das espécies de parasitas tenha sido a mesma entre as duas hortaliças. Tais resultados podem ser observados na Tabela I.

A presença de Ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris sp.* e *Enterobius vermicularis* nas hortaliças pode ser também atribuída ao fato desses vegetais terem sido fertilizados com lodo de esgoto, oriundo de lagoa de estabilização, onde foi constatada a existência de ovos de tais helmintos, conforme relatado por Carvalho *et al.* (2001).

Os resultados também encaminham para implicações de saúde pública. A transmissão de doenças do ambiente para o público é um problema que requer investimentos em sistemas de disposição de excretas humanas, esgotamento sanitário, de drenagem e de resíduos sólidos, etc. ou regulação (normas e padrões de qualidade de água, proibição por lei de descarga ou lançamento clandestino de resíduos) para preveni-la. Os governos federal, estaduais ou municipais não podem se eximir de suas responsabilidades de proteger os indivíduos dos esgotos, escoando a céu aberto ou extravasando nas ruas, bem como de evitar lançamento de lixo nos sistemas de drenagem e de esgotamento sanitário e, cultivo de hortaliças com lodo de esgoto contaminado (Cairncross *et al.*, 1996).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os ovos de helmintos, particularmente os de nematoda, oferecem um potencial risco à saúde humana quando da reutilização de efluentes na irrigação de áreas agríco-

TABELA I
Exames parasitológicos por tipo de parasita em hortaliças produzidas no distrito de Sertão do Carangola, Petrópolis, RJ

Parasita	Quantidade	Porcentagem
<i>Ascaris</i>	2	11,11
<i>Trichuris</i>	2	11,11
<i>Ancilostomídeos</i>	6	33,33
<i>Enterobius</i>	1	5,56
Larva e <i>Ascaris</i>	2	11,11
<i>Ascaris</i> e <i>Trichuris</i>	2	11,11
<i>Ascaris</i> e <i>Enterobius</i>	1	5,56
<i>Ascaris</i> e <i>Ancilostomídeos</i>	1	5,56
<i>Ascaris</i> , <i>Enterobius</i> , <i>Trichuris</i> e Larva	1	5,56
Total	18	100

las. O lançamento de esgoto sem tratamento prévio nos rios e córregos de abastecimento persiste, após duas décadas de sua proibição legal no Brasil, favorecendo a contaminação de verduras através de suas águas de irrigação (Takayanagui *et al.*, 1995).

A qualidade sanitária das hortaliças consumidas pela população tem sido avaliada por outros autores: Silva *et al.* (1995) detectaram helmintos em 21,4% das amostras, quando analisaram hortaliças comercializadas em supermercados do Rio de Janeiro. Valores mais elevados (29,1%) foram observados no estudo de Oliveira & Germano (1992), quando constataram enteroparasitas em alfaces comercializadas na região metropolitana de São Paulo.

Por outro lado, Rocha (2000) que utilizou biossólidos como fertilizante em cultura de couve, detectou alto grau de contaminação por helmintos no resíduo recém coletado. Entretanto, observou que as amostras das plantas tornaram-se negativas aos 98 e 111 dias de germinação.

Segundo Thomaz Soccol *et al.* (1997), o risco da contaminação do biossólido com parasitas intestinais advém do longo tempo de sobrevivência dos ovos no meio externo e da baixa dose infectante para o hospedeiro, além da alta frequência de helmintos na população. Desta forma, a contaminação do lodo de esgoto utilizado na fertilização das hortaliças deve estar relacionada com o estado sanitário da comunidade. Entretanto, é de se salientar que as fontes de contaminação dos alimentos são muito mais amplas e incluem, desde a presença dos parasitas no solo através das excretas de animais e de humanos (Rey, 1991; Oliveira & Germano, 1992; Takayanagui *et al.*, 1995), das mãos que manipulam estes alimentos (Neves, 2000), e até de forma indireta, através de vetores como artrópodes e roedores (Moraes, 1988), não podendo ser a contaminação das hortaliças atribuída exclusivamente ao tipo de fertilizante.

REFERÊNCIAS

1. Cairncross, S.; Blumenthau, U.; Kolsky, P.; Moraes, L.; Tayeh, A. The public and domestic domains in the transmission of disease. *Tropical Medicine and International Health*, v.1, n.1, p.27-34, 1996.
2. Carvalho, J. B.; Nascimento, E. R.; Silva, H. M. K.; Leite, F. B.; Correia, P. G.; Luca, R. L.; Martins, A. N. Sobrevivência de ovos de helmintos em lodo de lagoa de estabilização. *Revista Bras. Med. Vet.*, v.23, n.2, 2001.
3. FNS - Min. Saúde. *Manual de Saneamento*. 3ª ed., Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1999.
4. Marzochi, M. C. A. Estudo dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas III. Distribuição de alguns enteroparasitas em dois grupos populacionais da cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 20:31-35, 1978.
5. Moraes, L. R. S. Efeitos da disposição dos excretas humanos/esgotos sanitários sobre as helmintoses intestinais. ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. *Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 1998.
6. Moraes, R. G. *Parasitologia e Micologia Humana*. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 720p, 1988.
7. Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu. 240p, 2000.
8. Oliveira, C. A. F.; Germano, P. M. L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo. Pesquisa de helmintos. *Revista de Saúde Pública*, 26:283-289, 1992.
9. Rey, L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 320p, 1991.
10. Rocha, R. E. M. *Utilização de biossólido na cultura da couve*. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro. 60p, 2000.
11. Silva, J. P.; Marzochi, M. C. A.; Camillo-Coura, L.; Messias, A. A.; Marques, S. Estudo da contaminação por endoparasitas em hortaliças comercializadas nos supermercados da cidade do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28(3):237-241, 1995.
12. Takayanagui, O. M.; Febrônio, L. H. P.; Bergamini, A. M.; Okino, M. H. T.; Castro e Silva, A. A. M. C.; Santiago, R.; Catuano, D. M.; Oliveira, M. A.; Takayanagui, A. M. M. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto - SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33:169-174, 1995.
13. Thomaz Soccol, V. T *et al.* Eficácia dos diferentes processos de tratamento do lodo na redução da viabilidade dos ovos de helmintos. *Revista Técnica da Sanepar*, 8(8):24-32, 1997.

Endereço para correspondência
Prof José Firmino Nogueira Neto

Rua Dona Mariana, 181/1108 - Botafogo - Guanabara - Rio de Janeiro - RJ

Especialização em Ciências do Laboratório Clínico

Especialização em Citologia Clínica Pós-graduação *Lato sensu*

Coordenação: Paulo Murillo Neufeld
Faculdade de Farmácia da UFRJ
Inf.: (0xx21)2562-6405/6421

Curso de Especialização em Imuno-Hematologia e em Hematologia

Setor de Hematologia
Faculdade de Farmácia - UFRJ
Informações: Prof. José Carlos Lima
Tel (0xx21)2562-6416
E-mail: jclima@pharma.ufrj.br

Curso de Atualização em Trato Genital Feminino

Laboratório de Citopatologia Clínica
Faculdade de Farmácia - UFRJ
Informações:
Profª Virgínia Frota de Matos
Tel (0xx21)2562-6405
E-mail: vfrota@pharma.ufrj.br

XV Curso de Especialização em Virologia

Pós-graduação *Lato sensu*

Coordenação
Profª Maria Genoveva von Hubinger
Prof. José Nelson dos S. S. Couceiro
Depto. de Virologia
Inst. de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
UFRJ - Rio de Janeiro/RJ
E-mail: jncouceiro@micro.ufrj.br

Curso de Atualização em Hematologia

Laboratório de Hemoglobinas
Faculdade de Farmácia - UFRJ
Informações
Prof. Marcos Fleury
Tel (0xx21)2562-6411
E-mail: fleury@pharma.ufrj.br

Curso teórico-prático de Micologia Laboratorial

Laboratório de Micologia Clínica
Faculdade de Farmácia - UFRJ
Informações
Prof. Paulo Murillo Neufeld
Tel. (0xx21)2562-6421
E-mail: pneufeld@pharma.ufrj.br