ISSN 0370-369x

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

3

VOLUME 35

2003

SUMÁRIO

Análise laboratorial do líquido céfalo-raquidiano (líquor/LCR) 109
Célio Lima de Melo; Alice Maria Costa Martins; René Duarte Martins & Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Clinical laboratory analysis of cerebrospinal fluid (CSF)

Contagem de plaquetas: método manual versus método automatizado 113
Marcelo Carvalho Lasmar; Jônathns B.G. Souto; Mônica de F. Ribeiro Ferreira; Luci Maria Sant'Ana Dusse; Lauro Mello Viana; Geralda Fátima Guerra Lages & Maria das Graças Carvalho
Platelets count: manual versus automated methods

Prêmio CFF
Papilomavírus humano e lesões intra-epiteliais cervicais: estudo colpocitológico retrospectivo 117
Heliana de Araújo Silva; Luiz Mário da Silva Silveira; Vanda Maria Furtado Pinheiro; Ana Paula Sanches Mendes; Wanessa Rocha Ribeiro & Marcírio Ferreira de Souza Júnior
Human Papillomavirus and cervical intraepithelial lesions: retrospective cytologic study

Análise de amostras preservadas para controle de qualidade em hematologia em laboratórios de análises clínicas de Curitiba e Região Metropolitana, PR 123
Aline Borsato Hauser; Caroline Luise Prochaska; Aguinaldo José do Nascimento & Maria Suely Soares Leonart
Preserved samples analysis for hematology quality control in clinical laboratories from Curitiba and Metropolitan area, PR, Brazil

Prêmio Newprov
Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-ß-lactamases isoladas em João Pessoa/PB 127
Lauro Santos Filho; Isabele Beserra Santos; Danilo Elias Xavier & Liana Carballo Menezes
The presence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBLs isolated in João Pessoa, Paraíba, Brazil

Atividade antimicrobiana da Linezolida frente a cocos Gram-positivos isolados no Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS 133
Roberto Christ Vianna Santos; Jairo Luis Hoerlle & Alzira Resende do Carmo Aquino
Antimicrobial activity of Linezolid against Gram-positive cocci isolated in Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS

Prêmio SBAC
Citometria de Fluxo, imunocitoquímica e Western Blot na detecção da expressão da proteína p53 em células tumorais: uma análise comparativa 135
Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc), Marcos Antonio Mauricio Scheiner (MSc), José Gustavo Pugliese de Oliveira, Flavia da Cunha Vasconcelos, Ana Carolina dos Santos Ferreira & Raquel C. Maia (MD, PhD)
Flow cytometry, immunocytochemistry and Western Blot in measurement of p53 protein expression in tumor cells: a comparative analysis

Vantagens da citologia de monocamada em preventivos de câncer de colo de útero 143
Patricia Haas; Rodrigo Ferreira Paludo; Luciane Anita Savi & Marcelo Lehmkuhl Miranda
Monolayer citology advantages in preventive examination from the col cancer of the uterus

Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral 147
Paulo Murillo Neufeld & Maria Inêz de Moura Sarquis
Laboratory preservation of filamentous fungi by mineral oil method

Avaliação citológica da mucosa nasal de portadores de *Staphylococcus aureus* 151
Daniella Marques Tellarolli; Naidileia Cristina Ferreira; Maria Stella Gonçalves Raddi & Christiane Piena Soares
Staphylococcus aureus' carriers nasal mucosal cytologic evaluation

Diversidade e perfil antimicrobiano de cepas de *Listeria* sp. e o comportamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal em um rio poluído do trópico semi-árido (Paraíba) 155
Nícia Stellita da Cruz Soares; Beatriz Susana O. de Ceballos & Raíssa Mayer Ramalho Catão
Antimicrobian and profile diversity of stumps from *Listeria* sp. and indicative bacterias behavior of fecal contamination in a polluted river from semi-arid tropic (Paraíba)

Acompanhamento domiciliar de pacientes chagásicos tratados etiologicamente 159
Aurea Regina Telles Pupulin; Silvana Marques Araújo; Mônica Lucia Gomes; Sandra Vieira da Silva & Ivan Aparecido Carrashi
Patients home attendance with Chagas' disease etiologically treated

Análise laboratorial do líquido céfalo-raquidiano (líquor/LCR)

Clinical laboratory analysis of cerebrospinal fluid (CSF)

Célio Lima de Melo[1,2]; Alice Maria Costa Martins[1]; René Duarte Martins[1] & Maria Goretti Rodrigues de Queiroz[1]

RESUMO – Diversos trabalhos científicos publicados descrevem que, a exemplo do exame sumário de urina, os testes e os resultados do líquor, particularmente a citobioquímica, são realizados e descritos de diferentes formas nos laboratórios clínicos. Certamente, essa situação introduz a possibilidade de erros sistemáticos, provocados ou não pelo analista, além de dificultar a compreensão e a correta interpretação, do resultado por parte dos médicos assistente e/ou solicitante. A padronização de procedimentos é o único meio e, de fundamental importância, para se obter a precisão e a exatidão dos resultados, levando o laboratório a aumentar e melhorar o desempenho, no sentido de executar cada vez melhor sua função social a serviço do usuário. O presente artigo é uma revisão de vários trabalhos, publicados na literatura sobre o assunto, com a intenção de descrever o exame do líquido céfalo-raquidiano quanto às técnicas de coleta da amostra, características físicas, contagens celulares e análises bioquímicas, imunológicas e microbiológicas, bem como, apontar os problemas mais freqüentes nas etapas pré-analítica, analítica e pós-analítica e descrever o quadro característico das meningites, diante do resultado de alguns parâmetros laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE – Líquido céfalo-raquidiano, líquor.

SUMMARY *– Several scientific works demonstrated that urinalysis, as well as, cerebrospinal fluid (CSF) exams were described and assayed differently in distinct clinical laboratories. Consequently, systematic and/or random mistakes were occasionally done misunderstanding interpretations by physicians and assistants data. Standard procedures were the only way to get precision and safety results from the laboratories. They were extremely important to increase its quality and social skills. This article is a large review from several publications concerning this subject. Its describes cell counting and specimens collecting techniques; microbiologic, biochemical and immunologic parameters, as well as detecting the most frequent problems in pre, intra and post analytic steps exams; demonstrating meningitis characteristics according to laboratory exam parameters.*

KEYWORDS *– Cerebrospinal fluid, CSF.*

Coleta da amostra

A boa qualidade de qualquer amostra destinada à análise laboratorial garante a obtenção de resultados confiáveis, caso não haja erros técnicos ou de transcrição. Assim como a urina, o líquor, por conta da sua fragilidade físico-química, deve ser tratado com maiores cuidados desde a coleta até a análise, a fim de que seus constituintes sejam preservados. Vale salientar que a importância clínica do exame é tanto maior quanto mais bem conservados estiverem os componentes do material. O líquido céfalo-raquidiano é normal e freqüentemente colhido por punção entre a 3ª e a 4ª ou entre a 4ª e a 5ª vértebras lombares. As amostras devem ser coletadas em três tubos ou frascos seguramente estéreis e devidamente identificados com os números 1, 2 e 3, na ordem em que são obtidas. A identificação do material deve também conter o nome do paciente, número do exame, data, hora da coleta, etc. A amostra do primeiro recipiente deverá ser usada para a realização das análises bioquímicas e sorológicas. O segundo será utilizado para os exames microbiológicos, enquanto o terceiro, destina-se às contagens celulares devido a menor probabilidade de conter material, particularmente células sangüíneas, introduzido acidentalmente no momento da punção espinhal[1]. A rigor, o material deverá ser enviado para o laboratório o mais rapidamente possível, de preferência em até 30 minutos após a coleta, já que mudanças importantes tais como desintegração ou alterações morfológicas de hemácias, leucócitos e outros tipos celulares, diminuição da glicose, aumento na concentração das proteínas e de bactérias podem ser detectadas depois de transcorridas aproximadamente 2 horas. Caso não seja possível iniciar a análise do LCR no período de tempo recomendado (30 a 60 minutos), a amostra deve ser refrigerada entre 2 e 8ºC[2,3,4].

Obs.: *Considerar qualquer amostra como um material potencialmente infectante que deve ser manipulado com extrema precaução.*

Exame físico

Cor – a observação inicial e cuidadosa da aparência do LCR pode fornecer importantes informações diagnósticas. O líquido céfalo-raquidiano, dependendo do quadro clínico, assume diferentes tipos de coloração:

a) Incolor (como água de rocha) – líquor normal.

b) Xantocrômico – qualquer vestígio da tonalidade amarela ou laranja devido a presença de hemoglobina (hemólise) e concentrações elevadas de proteínas ou bilirrubina. Considerar também a possibilidade da existência de outras substâncias, tais como: mertiolate, iodo, caroteno, melanina, etc[1,4]. Em caso de dúvida, na observação segura da xantocromia, comparar o tubo da amostra após centrifugação com um tubo contendo água destilada em ambiente com boa luminosidade.

c) Sangüinolento – tonalidade francamente vermelha, causada por níveis muito aumentados de hemoglobina ou presença de grande quantidade de hemácias.

Recebido em 15/4/2003
Aprovado em 30/7/2003

[1]Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas-DACT, Fac. de Farmácia, Odontologia e Enfermagem-FFOE, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza-CE, Brasil;
[2]Laboratório Antonio Prudente/Hospital Antonio Prudente, Fortaleza-CE, Brasil.

Evidentemente, outras tonalidades devem ser descritas como se apresentam.

Aspecto – assim como a cor, este item é parte importante do exame inicial e deve ser observado com toda a atenção em ambiente com boa luminosidade. O aspecto do material será descrito como:

a) Límpido – líquor normal. Porém não devemos esquecer que a presença de até 200 leucócitos ou 400 hemácias/µL pode não modificar esta característica da amostra clínica. A dúvida certamente será eliminada através do exame microscópico[5].

b) Levemente turvo – turvação pode ser observada devido à presença de células sangüíneas, microrganismos (bactérias, fungos) e taxas elevadas de proteínas ou lipídios. Em caso de dúvida na observação segura da turvação, comparar o tubo da amostra previamente homogeneizada e não centrifugada com um tubo contendo água destilada em ambiente com boa luminosidade.

c) Turvo – ver item anterior, levando em conta que a turvação é diretamente proporcional à quantidade de substâncias ou elementos sólidos contidos na amostra.

d) Turvo-leitoso – neste caso, o material apresenta-se intensamente turvo em virtude da presença de numerosas células (leucócitos), bactérias, fungos e níveis muito elevados de proteínas ou lipídios.

Contagens celulares

A contagem celular total (leucócitos e hemácias conjuntamente) somente merece confiabilidade quando o material apresenta-se límpido e incolor ou o número de células é extremamente baixo. Ao contrário, isto é, quando a amostra contém grande número de células, se traduz em perda de tempo, além de evitar a introdução do erro laboratorial. Porquanto existem técnicas de contagens para cada um dos tipos celulares acima mencionados.

Material necessário:

• Câmara ou hemocitômetro de Neubauer aperfeiçoada, com lamínula;

• Pipetadores automáticos de boa procedência e ponteiras descartáveis;

• Soluções diluentes específicas (se necessário);

• Em amostras límpidas e incolores, a contagem das hemácias e leucócitos deve ser feita sem diluição em amostra previamente homogeneizada. As células serão contadas simultaneamente nos 4 quadrantes externos e no quadrante central em ambos os lados do hemocitômetro (10 quadrantes). Nesse caso, o resultado será descrito da seguinte forma:

Leucócitos/µL = nº de células co ntadas nos 10 quadrantes
Hemácias/µL = nº de células contadas nos 10 quadrantes

• Em amostras turvas e/ou sangüinolentas deve-se adotar as técnicas abaixo descritas:

a) Contagem das hemácias – após homogeneização, diluir o material em tubo de ensaio 12x75mm 1:10, 1:20, 1:50 ou 1:100, conforme a necessidade, com solução de Gower (ver modo de preparar). Misturar, preencher os dois lados da câmara, aguardar cerca de 1 minuto e proceder a contagem como acima referida. O resultado será calculado da seguinte maneira:

Hemácias/µL = nº de células contadas nos 10 quadrantes x fator de diluição

Solução de Gower: *em um balão volumétrico de 100 mL com tampa, colocar 50 mL de água reagente e 16,5 mL de Ácido Acético puro. Misturar e adicionar 6,25 g de Sulfato de Sódio Anidro. Misturar novamente até dissolução total e completar o volume com água reagente. Misturar e armazenar em frasco de vidro âmbar na geladeira.*

b) Contagem dos leucócitos – após homogeneização, diluir o material em tubo de ensaio 12x75 mm 1:10, 1:20, 1:50 ou 1:100, conforme a necessidade, com solução de Turk (ver modo de preparar). Misturar, preencher os dois lados da câmara, aguardar cerca de um minuto e proceder a contagem como acima referido.

O resultado será calculado da seguinte maneira:

Leucócitos/µL = nº de células contadas nos 10 quadrantes x fator de diluição

Solução de Turk: *em um balão volumétrico de 100 mL com tampa, colocar 50 mL de água reagente e 2 mL de Ácido Acético puro. Misturar e adicionar 1 mL da solução de Violeta de Genciana 1%. Misturar novamente e completar o volume com água reagente. Misturar e armazenar em frasco de vidro âmbar na geladeira. Esta solução deve ser mantida sob refrigeração e, periodicamente, filtrada para eliminar a possível presença de bactérias, fungos ou grânulos do corante.*

Obs.: *O volume preparado das soluções de Gower e de Turk pode ser aumentado ou diminuído conforme a necessidade do laboratório. Antes de usar, as soluções devem permanecer pelo menos 10 minutos fora da geladeira*[1].

c) Citocentrífuga – Com o objetivo de garantir um número suficiente de células para o exame do líquor é necessário, utilizando-se qualquer técnica apropriada, que o material seja previamente concentrado. Em laboratórios clínicos que possuem esse equipamento algumas vantagens são obtidas durante a fase de processamento da amostra, quais sejam: maior rendimento celular, melhor preservação da morfologia dos leucócitos, hemácias e outras células, pequeno volume de amostra e aparelho de fácil manuseio[6]. Caso contrário, o material deverá ser centrifugado a 1.500 rpm, durante 5 minutos e o sobrenadante mantido em geladeira para outros exames. Preparar o esfregaço com o sedimento obtido.

d) Correção das contagens celulares – A presença de sangue no líquido céfalo-raquidiano é um indicador importante para o diagnóstico da hemorragia intracraniana. No entanto, o médico assistente e o analista clínico devem também considerar a possibilidade de que o sangue presente na amostra pode ter sido acidentalmente introduzido no momento da coleta por punção ventricular, sub-occipital ou lombar. Ambas as situações são responsáveis pelo aparecimento da xantocromia ou do aspecto sangüinolento do líquor, provocando por um determinado período, confusão na análise laboratorial, na interpretação do resultado e conseqüentemente na conduta terapêutica. Entretanto, o laboratório dispõe de um artifício razoavelmente confiável para promover a correção das contagens celulares em caso de coleta traumática, embora alguns estudos demonstrem a grande incidência de erro na correção das contagens celulares de líquidos corporais que contenham numerosas hemácias[6].

$$\text{Leucócitos introduzidos} = \frac{\text{Leucócitos (Sangue)} \times \text{Hemácias(LCR)}}{\text{Hemácias (Sangue)}}$$

O resultado real é calculado pela fórmula:

Leucócitos/µL = Leucócitos Totais – Leucócitos Introduzidos

Obs.: *Caso o número de leucócitos e hemácias do sangue se encontre dentro dos valores de referência a correção pode ser feita subtraindo-se 1 leucócito para cada 750 hemácias presentes no LCR*[7].

e) Resumo técnico

Para as contagens celulares:

• Homogeneizar a amostra;

• Colocar o material não centrifugado (diluído ou não) na câmara de Neubauer para a contagem total conforme recomendações acima mencionadas;

• Centrifugar a amostra e preparar o esfregaço para a contagem diferencial (May Grünwald-Giemsa ou similar). Contar 100 células, identificar e registrar os resultados em percentagem.

Para os exames bioquímicos e imunológicos:

• Homogeneizar e centrifugar a amostra;

• Realizar as análises padronizadas e/ou solicitadas no sobrenadante;

Exames bioquímicos: proteínas totais, albumina (líquor/soro), glicose, cloretos, lactato desidrogenase (LD/LDH), lactato, glutamina, uréia, reação de Pandy, reação de Takata-Ara, eletroforese, etc.

Exames imunológicos: VDRL, FTA-ABS, cisticercose, antígenos bacterianos e fúngicos, enzimaimunoensaio, contraimunoeletroforese, imunofluorescência, IgG (líquor/soro), testes de aglutinação em látex, etc.

Para os exames microscópicos padronizados e/ou solicitados (pesquisa de microrganismos e células neoplásicas):

• Homogeneizar e centrifugar o material;

• Preparar os esfregaços corados (sedimento) para a identificação das características morfológicas e tintoriais de cada tipo de microrganismo solicitado (Gram, Ziehl-Neelsen, Kinyoun, Tinta da China, etc) ou de células neoplásicas (May Grünwald-Giemsa, Wright, Papanicolaou, etc);

Para os exames microbiológicos solicitados (manual ou automatizado):

• Homogeneizar e centrifugar o material;

• Semear o material (sedimento) em meios de cultura apropriados e de boa qualidade (agar-sangue, agar-chocolate, MacConkey, etc);

• TSA (teste de sensibilidade a antimicrobianos);

Problemas evidenciados no laboratório

Todo o pessoal envolvido no desenvolvimento das etapas abaixo referidas deve ter conhecimento técnico, responsabilidade e compromisso suficientes para adotar procedimentos que identifiquem precocemente a existência de quaisquer não conformidades para que estas sejam imediatamente corrigidas no sentido de evitar o erro laboratorial, o descrédito e o constrangimento para o usuário do laboratório.

Etapa pré-analítica

1) Erro no cadastro do paciente (nome e/ou iniciais, número do exame, tipo de amostra, análises solicitadas, leito, apto, enfermaria, suspeita clínica, etc);

2) Punção traumática – observar cuidadosamente o aspecto dos recipientes que contêm a amostra, pois a maior quantidade de células estará concentrada no tubo 1, diminuindo gradativamente nos tubos 2 e 3 o que causa visível distribuição desigual do sangue. É freqüente, nesse caso, o encontro de coágulos nos tubos ou frascos coletores em virtude da presença de fibrinogênio[1,4];

3) Quantidade insuficiente de material;

4) Armazenamento da amostra (tubos e/ou frascos de coleta inadequados);

5) Contaminação da amostra com soluções antissépticas (mertiolate, iodo, etc);

6) Conservação inadequada, no caso de não ser possível iniciar a análise imediata do LCR;

7) Demora no processamento do material (destruição celular, alterações morfológicas, proliferações bacteriana e fúngica, aumento (↑ proteínas) ou diminuição (↓ glicose) de alguns constituintes bioquímicos, etc);

8) Processamento inadequado (homogeneização, centrifugação, confecção do esfregaço, coloração, etc);

9) Erro na diluição do material – usar sempre as mesmas pipetas automáticas;

10) Quantidade desigual da amostra colocada nos retículos da câmara de Neubauer (usar sempre a mesma pipeta automática de 20 µL);

Etapa analítica

1) Equipamentos e materiais apresentando más condições de uso;

2) Uso de reagentes de baixa qualidade, adulterados ou fora do prazo de validade;

3) Troca de reagentes e/ou amostras;

4) Pipetagem incorreta;

5) Identificação incorreta, durante o exame bacterioscópico, de microrganismos por desconhecimento da morfologia;

6) Coloração inadequada da lâmina (grânulos do corante podem ser confundidos com bactérias ou fungos e deficiente ou excessiva descoloração, etc);

7) Uso inadequado do microscópio (focalização, luminosidade deficiente ou excessiva)

8) Uso de meios de cultura impróprios;

9) Imperfeição na semeadura do material;

Etapa pós-analítica

1) Letra ilegível no registro dos resultados;

2) Erro no registro dos resultados;

3) Troca de resultados durante o registro;

4) Cálculos incorretos;

5) Fator de diluição não utilizado por esquecimento;

6) Erro de transcrição dos resultados (digitação);

Quadro laboratorial das meningites

As doenças do sistema nervoso central (SNC) que provocam o quadro de meningoencefalites são causadas por diversos agentes etiológicos (vírus, bactérias, fungos, parasitas), endocrinopatias (neuropatia diabética, mixedema), alterações metabólicas (uremia, hipercalcemia), processos obstrutivos (tumores, abcessos), aumento da produção de IgG e da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Guillain-Barré, colagenoses) e apresentam algumas características tais como febre, náusea, vômitos, cefaléia, irritação das meninges e alterações físicas, químicas e laboratoriais do líquor.

Neste item do trabalho serão descritos alguns achados laboratoriais presentes nos diversos tipos de meningites.

a) Tipos de células predominantes

• **Neutrófilos –** meningites bacterianas, e quadro inicial das meningites viral, fúngica, tuberculosa e amebiana, abcessos cerebrais, hemorragias cerebrais.

• **Linfócitos –** meningites viral, fúngica, tuberculosa, neurossífilis, parasitárias, esclerose múltipla, Guillain-Barré, colagenoses, drogas.

• **Monócitos –** meningites viral, fúngica, tuberculosa e bacteriana crônica.

• **Eosinófilos –** meningites parasitárias, fúngicas, afecções causadas por ricketsias, mielografia (material estranho).

• **Macrófagos –** meningites viral e tuberculosa, contrastes radiográficos. Observar também a possível presença de hemácias fagocitadas.

• **Plasmócitos –** meningites viral e tuberculosa, esclerose múltipla, neurossífilis, síndrome de Guillain-Barré.

• **Células ependimárias e do plexo coróide –** embora não sejam consideradas como tendo importância clínica, estão presentes em casos de traumatismo.

• **Células neoplásicas -** carcinomas metastáticos.

b) Proteínas – aumento da concentração pode ser detectado nos seguintes casos:

• Aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica – meningites bacteriana, viral, fúngica e tuberculosa;

• Hemorragias subaracnóide e intracerebral;

• Aumento da síntese de imunoglobulinas (IgG) no sistema nervoso central – meningite viral, síndrome de Guillain-Barré, colagenoses (lupus eritematoso), esclerose múltipla, neurossífilis;

• Redução da depuração das proteínas normais do líquor;

• Degeneração do tecido neural;

c) Glicose – as condições que provocam redução nos níveis deste analito são: transporte inadequado, aumento da atividade glicolítica e consumo pelos leucócitos e microrganismos. Hipoglicorraquia é encontrada nas meningites bacterianas, tuberculosa e viral, podendo nesta apresentar também valores normais. Entretanto, a literatura médica afirma que a principal causa de diminuição no teor de glicose do LCR é determinada por alterações nos mecanismos de transporte através da barreira hematoencefálica e utilização pelas células encefálicas[8].

d) Cloretos – distúrbios da osmolaridade do líquido extracelular (LEC) e perturbações do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-base são os principais fatores de variações na concentração liqüórica destes íons.

e) Glutamina – aminoácido não essencial sintetizado no SNC a partir da amônia e do alfa-cetoglutarato. É o meio pelo qual o organismo retira a amônia (produto extremamente tóxico) do líquido céfalorraquidiano. Portanto, a determinação da glutamina no LCR tem utilidade clínico-laboratorial por revelar indiretamente a concentração de amônia, particularmente de pacientes em coma. Níveis aumentados de glutamina são responsáveis pelos distúrbios da consciência e aparecimento do coma.

f) Lactato – nas meningites bacteriana, tuberculosa e fúngica os níveis deste constituinte do metabolismo da glicose aumentam significativamente.

Tem especificidade e sensibilidade maiores que a glicose e propicia ao médico informações mais seguras, especialmente nas situações em que o diagnóstico apresenta dificuldades. O retorno dos seus níveis aos valores de referência ou diminuição rápida são indicadores precoces da eficácia da antibioticoterapia.

Lembrar que a obtenção de resultados falsamente elevados pode ser conseqüência do alto teor de lactato existente no interior dos eritrócitos quando a amostra apresenta-se hemolisada.

g) VDRL e FTA-ABS – testes úteis no diagnóstico da neurossífilis cujos resultados devem ser correlacionados com os obtidos no soro sangüíneo[9,10].

h) Eletroforese em gel de agarose – técnica utilizada quando há suspeita clínica de esclerose múltipla. O perfil eletroforético apresenta uma banda monoclonal na região das gamaglobulinas em até 95% dos pacientes portadores da doença[11].

i) Contraimunoeletroforese, ELISA e testes rápidos de aglutinação em látex - metodologias utilizadas na detecção de antígenos bacterianos e fúngicos[12]. Lembrar que é possível ocorrer reações cruzadas entre os vários tipos de microrganismos.

j) Cultura e microscopia – a utilização de meios de cultura apropriados e esfregaços adequadamente confeccionados e corados são úteis na identificação de bactérias e fungos.

Controle de Qualidade (CQ)

A utilização de amostras-controle em todos os setores do laboratório clínico deve ser obrigatoriamente prática de rotina no sentido de checar diariamente os equipamentos, reagentes, metodologias e os recursos humanos. Os objetivos do CQ são vários, mas dentre eles podemos destacar: obtenção da precisão e exatidão dos resultados, diminuição das repetições e do erro laboratorial e redução dos custos operacionais. Para tanto, é necessário que todo o pessoal (recepcionistas, coletadores, digitadores, técnicos e outros) seja conscientizado da importância da adoção de atitudes e procedimentos padronizados os quais devem estar documentados nos manuais e meios eletrônicos pertencentes a cada setor do laboratório.

Filiar-se a um programa de controle de qualidade idôneo, como é o caso do PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade) sob a responsabilidade da SBAC (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas) é indispensável para a aquisição da credibilidade moral não sendo compreensível que o laboratório esteja dele desvinculado.

AGRADECIMENTOS

À Dalila Jucá e Joana Jucá pela correção ortográfica.

REFERÊNCIAS

1. **Strasinger, S. K.** (2000) *Uroanálise & Fluidos Biológicos*, Ed. Premier, 3ª Ed.
2. **Chow, G; Schmidley, J. W.** (1984) Lysis of erythrocytes and leukocytes in traumatic lumbar puctures. *Arch. Neurol.* 41:1084-1085.
3. **Glasser, L.** (1981) Cells in cerebrospinal fluid. *Diagnostic Medicine* 4(2):33-50.
4. **Landy, J. M.** (1997) *Urinalysis and Body Fluids*. Lippincott-Raven Publishers.
5. **Glasser, L.** (1981) Tapping the wealth of information in CSF. *Diagnostic Medicine* 4(1)23-33.
6. **Henry, J. B.** (1999) *Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais*, Editora Manole Ltda, 19ª Edição.
7. **Reske, A.; Haferkamp, G.; Hopf, H.** (1981) Influence of artificial blood contamination on the analysis of cerebrospinal fluid. *J. Neurol.* 226:187-193.
8. **Menkes, J.** (1969) The causes of low spinal fluid sugar in bacterial meningitis. Another look. *Pediatrics* 44(1):1-3.
9. **Albright, R. E. Jr.; Graham, C. B. 3rd; Christenson, R. H.; Schell, W. A.; Bledsoe, M. C.; Emlet, J. L.; Mears, T. P.; Reller, L. B.; Schneider, K. A.** (1991) Issues in cerebrospinal fluid management. *Am. J. Clin. Pathol.* 95(3):397-401.
10. **Davis, L. E.; Schmitt, J. W.** (1989) Clinical significance of cerebrospinal fluid tests for neurosyphilis. *Ann. Neurol.* 25:50-53.
11. **Delmotte, P.; Carton, H.** (1981) Electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 83(4):183.
12. **Feldman, W. E.** (1977) Relation of concentrations of bacteria and bacterial antigen in cerebrospinal fluid to prognosis in patients with bacterial meningitis. *N. Engl. J. Med.* 296(8):433-435.

Endereço para correspondência
Prof. Célio Lima de Melo
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.
Rua Barão de Aracati, 2715/203 – Joaquim Távora
CEP: 60.115-082
Fortaleza, CE
E-mail: fcahel@ig.com.br

Contagem de plaquetas: método manual versus método automatizado

Platelets count: manual versus automated methods

Marcelo Carvalho Lasmar[1]; Jônathns B.G. Souto[2]; Mônica de F. Ribeiro Ferreira[2]; Luci Maria Sant'Ana Dusse[3]; Lauro Mello Viana[3]; Geralda Fátima Guerra Lages[3] & Maria das Graças Carvalho[3]

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo investigar a concordância entre o método manual (Rees Ecker) e automatizado (Cell Dyn 3700 – Abbott), buscando obter subsídios para responder os numerosos questionamentos levantados pelos profissionais acerca do método de escolha. Foi observada uma correlação positiva e significativa ($r=0.86$; $p<0.05$) entre os métodos e ausência de diferença significativa entre ambos. O coeficiente de variação intra-ensaio do método manual foi maior, portanto, exige padronização rigorosa e enorme familiarização com o mesmo. Foi observada uma tendência ao aumento para os parâmetros VPM (volume plaquetário médio) e PDW (amplitude de distribuição das plaquetas) nos pacientes que apresentaram plaquetopenia quando comparados aos resultados daqueles que apresentaram número de plaquetas dentro da faixa normal e daqueles com plaquetocitose. Este achado vem ressaltar a possível associação entre número de plaquetas, volume plaquetário e certos estados patológicos. Portanto, a medida do VPM possui potencialidade para uso em trabalhos de pesquisa visando aplicações clínicas. A presença de um profissional capaz de reconhecer as possíveis interferências dos métodos automatizados e manual e equacionar satisfatoriamente as situações "problema" torna-se indispensável.

PALAVRAS-CHAVE – Plaquetas, método manual, método automatizado.

SUMMARY *– The present work investigates the relationship between the manual (Rees-Ecker) and automated (Cell-Dyn 3700 – Abbott) methods, in order to get support to answering a several questions raised by professionals about the choice method. It was observed a positive and significant ($r=0.86$; $p<0.05$) correlation between those methods and no significant difference between them. The variation of coefficient intraassay from the manual method was higher compared to the automated one, thus, it demands a rigorous standardization and a big familiarization with the first method. It was observed an increasing tendency for VPM (median platelet volume) and PDW (platelet distribution width) parameters in patients who showed thrombocytopeny if compared to results from subjects with platelets count within normal range and those with thrombocytosis. This finding comes highlight the possible association between platelet count, platelet volume and specific pathologic states, in which platelet abnormalities seem to be a frequent finding. Therefore, VPM and PDW measurements constitutes important parameters in the research field with potential clinical application. An expert professional is required in order to detect possible interferences related between the methods and to solve satisfactorily the spurious situations.*

KEYWORDS *– Platelets; manual method; automated method.*

INTRODUÇÃO

Com o crescente avanço tecnológico voltado aos laboratórios clínicos, novos métodos para avaliação dos elementos figurados do sangue têm sido desenvolvidos. Não obstante, a implantação da moderna tecnologia ter contribuído substancialmente para dinamizar a rotina laboratorial, não significa obrigatoriamente, em casos específicos, ganho de qualidade no resultado final da análise. Portanto, diante da realidade do uso constante da automação nos laboratórios clínicos e do crescente número de amostras para serem analisadas, há necessidade premente de estudos criteriosos acerca da confiabilidade dos resultados e de profissionais dotados de alto senso crítico. Estudos comparativos entre diferentes métodos são altamente desejáveis, principalmente, quando possíveis interferências podem comprometer um dos resultados, gerando interpretações errôneas pelo médico e acarretando prejuízos ao paciente.

Um fator relevante na determinação de parâmetros plaquetários, tais como contagem do número de plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e amplitude de distribuição de plaquetas (PDW), seria sua estreita relação com o anticoagulante utilizado e o tempo de processamento do material[11]. Além disso, outro fator capaz de causar variações na determinação de alguns parâmetros plaquetários seria a observação do princípio utilizado pelo equipamento automatizado, seja através de impedância por abertura, dispersão ótica utilizando-se de laser ou outros[17].

O presente estudo foi motivado para responder questionamentos levantados por profissionais sobre o grau de concordância entre os métodos manual (Rees Ecker) e automatizado (empregou-se o Cell-Dyn 3700 – Abbott) para contagem de plaquetas, como também para descrever situações potencialmente comprometedoras da acurácia do resultado fornecido pela automação. Investigou-se também neste trabalho a existência de correlação entre o número de plaquetas, o volume destas (VPM) e o índice de anisocitose plaquetária (PDW).

Recebido em 25/7/2003
Aprovado em 4/8/2003
[1]Bolsista de Iniciação Científica/Depto. de Anál. Clín. e Toxic. da Fac. de Farm. da UFMG; [2]Serviço de Pat. Clín. do Hosp. Israel Pinheiro, IPSEMG, Belo Horizonte, MG; [3]Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta e cinco (65) amostras de sangue em EDTA (5 ml) foram obtidas por punção venosa, utilizando o sistema *Vacutainer* (sem trauma e com uso mínimo de torniquete, obedecendo à uma padronização do processo), de pacientes da rotina ambulatorial do Hospital Israel Pinheiro (IPSEMG), Belo Horizonte, MG. Após a realização da contagem de plaquetas pelo contador de células Cell-Dyn 3700 (Abbott), o qual funciona baseado no princípio físico da impedância, as amostras foram classificadas em :

1. 18 amostras com número de plaquetas abaixo de 150.000/mm^3.
2. 25 amostras com número normal de plaquetas: faixa compreendida entre 150.000 a 400.000/mm^3.
3. 22 amostras com número de plaquetas acima de 400.000/mm^3.

Logo após a contagem automatizada, as amostras de sangue foram submetidas à contagem manual pelo método de Rees-Ecker, em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio ótico Olympus (contagem feita com a objetiva de 40x). Para a realização deste método, procedeu-se à diluição de 0,02 ml de cada amostra de sangue, após devida homogeneização, em 2ml da solução diluidora (3,8g de citrato de Sódio; 2ml de formol à 40%; 0,05 g de azul de cresil brilhante e água destilada q.s.p. 100ml). Para garantir a qualidade, a solução diluidora foi filtrada antes do uso e, posteriormente, analisada para se detectar a possível presença de precipitados, que podem ser facilmente confundidos com as plaquetas. A diluição da amostra somente deve-se processar em soluções absolutamente isentas de precipitados e/ou partículas. O coeficiente de variação intra-ensaio foi calculado utilizando-se uma amostra de sangue normal da seguinte forma:

1. Vinte diluições da mesma amostra, com contagem normal (150.000 a 400.000/mm^3), seguidas da contagem do número de plaquetas pelo mesmo analista (método manual).
2. Vinte contagens automatizadas em uma mesma amostra, com contagem normal (150.000 a 400.000/mm^3), na mesma hora e pelo mesmo analista (Cell Dyn 3700 – Abbott).

A diferença entre os dois métodos, investigada através do teste 't' de Student, e as médias para as três faixas estudadas, foram determinadas utilizando-se o software Sigma Stat V1.0. O coeficiente de correlação entre os métodos foi determinado pela correlação de Pearson. P foi considerado significativo quando inferior a 0,05.

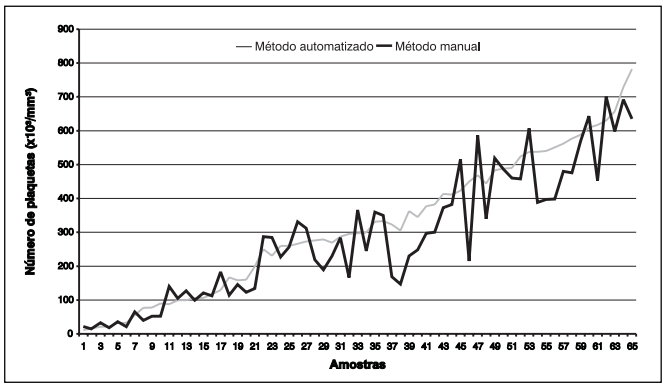


FIG.1 - Distribuição gráfica das contagens de plaquetas pelos métodos automatizado e manual.

RESULTADOS

O coeficiente de variação para os métodos manual e automatizado foram 8,5% e 3,9%, respectivamente, sugerindo ser o método automatizado mais linear.

As maiores discrepâncias entre os dois métodos ocorreram quando as plaquetas estavam em número normal ou em número aumentado, o que equivale a dizer que a concordância entre os métodos foi maior quando havia trombocitopenia. A Figura 1 mostra que a oscilação da contagem de plaquetas pelo método manual em torno dos valores obtidos pelo método automatizado foi visivelmente menor quando o número de plaquetas era inferior a 150.000/mm^3.

O coeficiente de correlação entre os dois métodos foi de 0,86, quando todas as amostras foram estudadas simultaneamente e independente do número de plaquetas (Fig. 2). Diferença significativa não foi observada entre os dois métodos, para as três faixas estudadas (Tabela I).

Quanto ao volume plaquetário médio (VPM) e à amplitude de distribuição das plaquetas (PDW) foram observadas diferenças significativas entre :

a) VPM dos indivíduos que apresentaram plaquetocitose e VPM dos indivíduos com faixa normal de plaquetas (P<0,02).
b) VPM dos indivíduos que apresentaram plaquetocitose e VPM dos indivíduos com plaquetopenia (P<0,004).
c) PDW dos indivíduos que apresentaram plaquetopenia e PDW dos indivíduos com faixa normal de plaquetas (P<0,01).
d) PDW dos indivíduos que apresentaram plaquetopenia e PDW dos indivíduos que apresentaram plaquetocitose (P<0,001).

A Tabela I mostra os resultados médios para a contagem de plaquetas (métodos manual e automatizado), VPM e PDW.

TABELA I
Valores médios para a contagem de plaquetas (métodos manual e automatizado), VPM (volume plaquetário médio) e PDW (amplitude de distribuição das plaquetas)

Nº plaquetas (/mm³)	Manual (μ)	Automatizado (μ)	VPM	PDW
< 150.000	76,000	78,800	9.14	19.5
150.000 - 400.000	250,700	287,800	7.97	17.4
>400.000	492,400	545,600	7.13	16.9

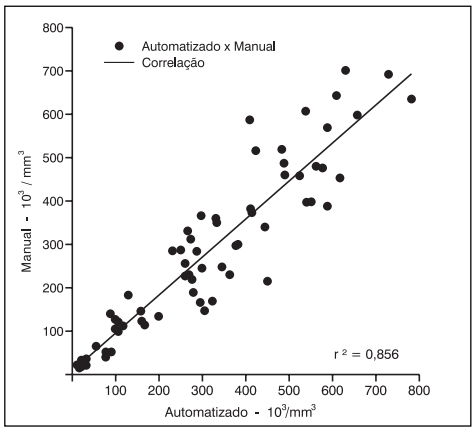


FIG.2 - Correlação entre os métodos manual e automatizado (Cell Dyn 3700 - Abbott).

DISCUSSÃO

A comparação entre os dois métodos permite dizer que a diferença de resultados entre ambos é menor quando há trombocitopenia, o que permite inferir que uma plaquetopenia inicialmente determinada pela automação geralmente é confirmada pelo método manual sem grandes discrepâncias de resultados. Cumpre ressaltar que as plaquetopenias persistentes têm que ser minuciosamente investigadas, considerando a possibilidade de doença grave. Assim o analista clínico deverá analisar, de forma crítica, as possíveis interferências nos resultados fornecidos pelos aparelhos automáticos, principalmente em situações de trombocitopenia. Presença de plaquetas gigantes, agregação plaquetária e/ou satelitismo plaquetário (freqüentemente induzido por EDTA) e coágulos de fibrina indetectáveis, resultam em uma falsa plaquetopenia. Ao contrário, a presença de partículas no líquido diluidor, degranulações de leucócitos (especialmente eosinófilos), fragmentações de eritrócitos e de blastos, microcitose acentuada e bactérias, são alguns exemplos de interferências no método automatizado favorecendo uma falsa plaquetocitose e determinação espúria do VPM[1,4,8,15].

As determinações são realizadas em amostra de sangue diluída em meio condutor de eletricidade, utilizando-se o princípio da impedância elétrica. Dois eletrodos, mergulhados na solução condutora, determinam uma corrente elétrica. O número e o tamanho das células são medidos de acordo com as alterações produzidas na condução de eletricidade entre os dois eletrodos: positivo (ânodo) e negativo (cátodo), quando uma célula passa através de um pequeno orifício interrompendo a corrente elétrica. Esta interrupção gera um pulso, assim, o número de pulsos corresponde ao número de células e a magnitude do pulso corresponde ao volume da célula. No entanto, a forma da célula pode causar uma "sombra" no campo elétrico do orifício. Acredita-se que o volume desta "sombra" interfira no tamanho celular. A microscopia eletrônica de plaquetas, expostas ao EDTA, mostra que a mudança de forma de discóide para esférica é acompanhada pela formação de pseudópodes que pode criar um aumento na "sombra elétrica" e um falso aumento no VPM[1,15].

Uma vez que interferências na contagem de plaquetas e na determinação de seu volume podem ocorrer, há necessidade de familiarização com um método alternativo altamente otimizado que possa confirmar achados fora dos parâmetros da normalidade e em situações potencialmente favorecedora de falsos resultados.

É corrente o uso de "flags" que sinalizam para o analista a presença de parâmetros fora da normalidade, exigindo um exame minucioso do filme sanguíneo[4]. Desta forma, "flags" denunciando situações de plaquetocitose ou plaquetopenia exigem uma observação rigorosa da lâmina, cuja análise do filme fornecerá uma impressão sobre o número de plaquetas. A aparente ou evidente plaquetopenia/plaquetocitose demandará uma contagem de plaquetas por método alternativo confiável, ou solicitação de outra amostra, conforme o caso. A análise dos filmes sanguíneos dos pacientes integrantes deste trabalho mostrou que a condição de trombocitopenia está associada geralmente ao encontro de um valor médio inferior a 5 plaquetas por campo, enquanto na trombocitose este valor médio supera 30.

Um outro fator importante a acrescentar, visando uma melhor interpretação dos resultados, consiste em ressaltar o efeito da metodologia utilizada sobre os valores de VPM. Assim cabe ressaltar que amostras colhidas com EDTA apresentam VPM diferentes em função do princípio utilizado pelo equipamento de contagem eletrônica[11]. De acordo com O'Malley *et al.*(1996), um aumento da ordem de 17% no VPM, medido através da tecnologia Coulter (impedância por abertura), foi observado após 39 horas de exposição ao EDTA. Contrariamente, uma diminuição de 22 % foi observada quando a mesma amostra foi analisada pelo aparelho Technicon (dispersão ótica a laser). Ainda segundo o mesmo autor, acreditava–se que a exposição ao EDTA seria capaz de alterar a permeabilidade da membrana plaquetária, resultando em progressivo entumescimento da plaqueta e concomitante redução na densidade ao longo do tempo, o que poderia explicar a diferença nos valores de VPM entre as duas metodologias. À luz deste conhecimento, ou seja, da interferência do princípio da metodologia empregada na determinação de certos parâmetros plaquetários, torna–se essencial determinar os valores de normalidade para cada tipo de aparelho a fim de que os resultados possam ser adequadamente interpretados. Estas diferenças observadas para o volume plaquetário empregando–se dois métodos automatizados distintos parecem ser mais acentuadas durante as primeiras duas horas de exposição ao EDTA, embora o processo continue além de 24 horas.

Um levantamento da literatura relata uma possível associação entre altos valores de VPM com uma série de doenças, tais como infarto agudo do miocárdio[9,13], AVC[6,10], pré-eclâmpsia[2,16] e *Diabetes mellitus*[5,7,12,14]. Acreditava-se que o VPM elevado contribua para uma acentuada função plaquetária em doenças cardiovasculares. Desta forma, pode-se pensar que o uso de certas drogas podem trazer benefícios, reduzindo o risco de aterotromboses. Portanto, o encontro de plaquetas gigantes em grande quantidade traduzido por um VPM elevado, pode sinalizar para risco de aterotrombose, sendo desejável que este risco seja minimizado terapeuticamente[3].

Diante dos dados apresentados pelo estudo, podemos observar uma correlação positiva e significativa ($r=0,86$; $p<0,05$) entre os métodos e ausência de diferença significativa entre ambos. O coeficiente de variação intra-ensaio do método manual foi maior, portanto, exige padronização rigorosa e enorme familiarização com o mesmo. Observou-se também uma tendência de aumento para os parâmetros VPM e PDW nos pacientes que apresentaram plaquetopenia quando comparados aos resultados dos pacientes que apresentaram número de plaquetas dentro da faixa normal e aqueles com plaquetocitose. Cumpre ressaltar que a discussão realizada sobre as alterações de alguns parâmetros plaquetários, especialmente o VPM, pretende suscitar no leitor a atenção necessária para o estabelecimento de possíveis interrelações entre tais alterações plaquetárias e certos estados patológicos, contribuindo não apenas para o diagnóstico precoce dos mesmos, para a adoção de medidas profiláticas e/ou terapêuticas cabíveis. A presença de um profissional capaz de reconhecer as possíveis interferências do método automatizado e equacionar satisfatoriamente as situações "problema" é de fundamental importância para garantir a qualidade do processo como um todo, incluindo as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, com reflexos altamente positivos para a clínica médica.

AGRADECIMENTOS

A todos os funcionários do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG), em Belo Horizonte, MG.

REFERÊNCIAS

1. **Abbott.** *Cell-Dyn 3700 operator's manual*. Illinois.
2. **Ahmed Y., van Iddekinge B., Paul C., *et al*.**Retrospective analysis of platelet numbers and volumes in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 1993;100:216-220.
3. **Bath P.M.W., Butterworth R. J.** Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coag. Fibr.*, vol 7,1996;157-160.
4. **Bessman J.D., Williams L. J., Gilmer P. R.** The inverse relation of platelet siza and count in normal subjects and an artifact of other particles. *Amer. Soc. Clin, Pathol.*,1981;289-293
5. **Brown A. S., hong Y., de Belder A., *et al*.** Diabetics with peripheral vascular disease have an increased mean platelet volume and megakaryocyte plody. *Br. Heart. J.* 1994;71:178(abstract).
6. **D'Erasmo E., Aliberti G., Celi F. S., *et al*.** Platelet count, mean platelet volume and their relation to prognosis in cerebral infarction. *J. Intern .Med 1990*;227:11-14.
7. **Garg S. K., Lackner H., Karpatkin S.** The increseadpercent-ageof megathrombocytes in various clinical disorders. *Ann. Intern. Med.* 1972;77:361-369.
8. **Kunicka J., Fischer G., Zelmanovic D., Fitzpatrick P., Dorfman D.** Precisão na contagem de plaquetas com o sistema hematológico ADVIA™ 120. *News-Lab.* 39,2000;157-158.
9. **Martin J. F., Plumb J., Kilbey R. S., Kishk Y. T.** Changes in volume and density of platelets in myocardial infarction. *Br. Med. J.* 1983;287:456-459
10. **O'Malley T., Langhorne P., Elton R. A., Stewart C.** Platelet size in stroke patients.*Stroke* 1995;26.:995-999.
11. **O'Malley T., Ludlam C. A., Fox K. A. A., Elton R. A.** Measurement of platelet volume using a variety of different anticoagulant and antiplatelet mixtures. *Blood Coag. Fibr.*, vol 7,1996;431-436.
12. **Rao A. K., Goldberg R. E., Walsh P. N.** Platelet coagulant activies in *Diabetes mellitus*. Evidence for relationship between platelet coagulant hyperactivity and platelet volume. *J. Lab. Clin. Med*. 1984; 103:82-92.
13. **Schultheiss H. P., Tschoepe D., Esser J.**, *et al*. Large platelets continue to circulate in an activated state after myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994;24:243-247.
14. **Sharpe P. C., Trinick T.** Mean platelet volume in *Diabetes mellitus*. *Quart. J. Med.* 1993;86:676-679.
15. **Silveira M. M., Fonseca L. M.** Standardization of platelet parameters determination in blood samples collected with EDTA. *RBAC 2001*,vol. 33 (2);55-58.
16. **Walker J. J., Cameron A. D.,Bjornsson S.,*et al*.** Can platelet volume predcit progressive hypertensive disease in pregnacy? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989;161:676-679.
17. **Trowbridge E. A., Reardon D.M., Hutchinson D., Pickering C.** The routine measurement of platelet volume: a comparison of light-scattering and aperture impedance technologies. *Clin. Phys.* 1985;6:221-238.

Endereço para correspondência
Profª Maria das Graças Carvalho
Faculdade de Farmácia da UFMG
Av. Olegário Maciel, 2.360/608
Belo Horizonte, MG

A SBAC no Brasil

Quem são, onde estão e como entrar em contato com os profissionais que estão à frente das regionais e delegacias estaduais da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Delegacia de Alagoas
Dr. José Pereira Mendes Junior
e-mail: jmendes@sunnet.com.br

•

Delegacia do Amazonas
Dr. Sebastião Ferreira Marinho
Tel.: (0xx92) 232-6504

•

Regional da Bahia
Dr. Eric Ettinger de Menezes
e-mail: ettinger@nuxnet.com.br

•

Regional do Ceará
Dr. Francisco Einstein Nascimento
e-mail: einstein@mcanet.com.br

•

Regional do Distrito Federal
Dr. Antonio Alves Souza
e-mail: sbacdf@bol.com.br

•

Delegacia do Espírito Santo
Dr. Henrique Tommasi Netto
e-mail: tommasi@zaz.com.br

Regional de Goiás
Dr. Elias José Cury Junior
e-mail: sbacgo@zaz.com.br

•

Delegacia do Maranhão
Drª Rita Maria Palhano
e-mail: ritabp@zaz.com.br

•

Delegacia do Mato Grosso
Dr. Jerolino Lopes Aquino
e-mail: sbacmt@terra.com.br

•

Delegacia do Mato Grosso do Sul
Drª Lunilde Brandão Arão
e-mail: lacocruz@zaz.com.br

•

Regional de Minas Gerais
Dr. Homero Jackson de Jesus Lopes
e-mail: sbacmg@zaz.com.br

•

Delegacia da Paraíba
Drª Tereza Cristina Davi Marques
e-mail: tcristina_tm@hotmail.com
Tel.: (0xx83) 9963-0237

Regional do Paraná
Dr. Sandro Nelson Lunedo
e-mail: sbacpr@terra.com.br

•

Regional de Pernambuco
Dr. Tarcísio de Oliveira Moura
e-mail: sbac-p@mailbr.com.br

•

Regional do Rio Grande do Norte
Drª Geruza Maria Caldas Maia
e-mail: sbacrn@ig.com.br

•

Regional do Rio Grande do Sul
Dr. Irineu Keiserman Grinberg
e-mail: sbacrs@terra.com.br

•

Delegacia de Santa Catarina
Dr. Arício Treitinger
e-mail: aricio@ccs.ufsc.br

•

Regional de São Paulo
Drª Mie Yamamoto D'Alessandro
e-mail: sbacsp@hotmail.com

Delegacia do Sergipe
Drª Maria da Conceição Oliveira
e-mail: sbacse@netdados.com.br

Delegacia de Tocantins
Dr. Francisco Wellington Macedo
e-mail: jofra@terra.com.br

Papilomavírus humano e lesões intra-epiteliais cervicais: estudo colpocitológico retrospectivo*

Human Papillomavirus and cervical intraepithelial lesions: retrospective cytologic study

Heliana de Araújo Silva[1]; Luiz Mário da Silva Silveira[1]; Vanda Maria Furtado Pinheiro[2]; Ana Paula Sanches Mendes[3]; Wanessa Rocha Ribeiro[4] & Marcírio Ferreira de Souza Júnior[4]

RESUMO – Estudos epidemiológicos têm apontado o papel do papilomavírus humano (HPV) no aparecimento de lesões cervicais em mulheres do mundo todo. Neste trabalho foram investigadas mulheres com lesões cervicais e sua relação com o HPV, usando dados citológicos. Durante o estudo, foram examinadas 8.020 mulheres atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA), em 2002. Foram encontrados 256 pacientes (3,2%) com laudos de alterações citológicas, onde 39 (0,5%) estavam relacionadas as atipias de significado indeterminado em células escamosas (ASCUS), 116 (1,4%) LSIL, 96 (1,2%) HSIL e quatro casos (0,05%) de carcinoma invasor. De todos os casos com alterações citológicas, 8,6% estavam relacionados à infecção por HPV. Diferentes aspectos morfológicos de HPV na citologia foram avaliados e verificou-se prevalência maior nos critérios não-clássicos. Verificou-se que o HPV foi mais freqüentemente detectado em lesões de baixo grau e em mulheres jovens.

PALAVRAS-CHAVE – Papilomavírus humano, lesão cervical, citopatologia.

SUMMARY *– Several epidemiologic studies point to the role of human papillomavirus (HPV) in the development of cervical lesions in women around the world. The starting point of this work was to search women with cervical lesions and correlate them with HPV infection using cytologic data with 8,020 patients who were attended at the Public Health Central Laboratory of Maranhão (LACEN-MA) in 2002 wich abnormal cytology were found in 256 patients (3.2%) whose 39 women screened (0.5%) have atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), 116 (1.4%) LSIL, 96 (1.2%) HSIL and 4 cases (0.05%) with squamous cells carcinoma. From overall cases of cervical lesions, 8.6% were related to HPV infection. Different HPV-positive features observed in the cervical lesions were recorded and non-classical criteria were prevalent. It was observed that occurs HPV in low-grade lesion and in younger women.*

KEYWORDS *– Human papillomavirus, cervical lesion, cytopathology.*

INTRODUÇÃO

Desde sua idealização e implantação na rotina, o exame colpocitológico adquiriu papel de destaque na prevenção do câncer ginecológico. Considerado responsável pela redução de casos fatais, devido ao acesso facilitado e boa sensibilidade, possibilita um diagnóstico precoce, condição essencial para o sucesso terapêutico.

Em contrapartida, ainda permanecem presentes de forma marcante os fatores predisponentes do câncer no cotidiano da população, traduzindo-se pela crescente disseminação do papilomavírus humano, principal agente relacionado a lesões cervicais malignas.

O reconhecimento clínico da verruga do trato genital data do século I d.C., relatado por escritores gregos e romanos[5].

Entretanto, foi no século XX, em 1977, que Meisels e Purolla relacionaram imagens citológicas de lesões condilomatosas ao vírus do papiloma humano. Estabeleceram a inter-relação entre esfregaços citológicos e biópsias de pacientes com o vírus, mostrando, inclusive, uma relação entre as verrugas genitais e lesões pré-cancerosas[24].

Nos EUA e no Reino Unido, o condiloma acuminado figura como a doença viral sexualmente transmitida de maior freqüência. A prevalência varia bastante (0,24 a 13%) conforme a distribuição etária e o risco de doença sexualmente transmissível da população estudada[5].

Estima-se que 10 a 20% das mulheres são infectadas de forma latente pelo HPV. Em mulheres grávidas pesquisadas por PCR (reação de cadeia polimerase) detectou-se o vírus em metade delas[9].

A incidência de HPV na população em geral é de 1 a 8%. Acredita-se que num período de 10 anos metade das mulheres com vida sexual ativa adquirem, ao menos, uma infecção por papilomavírus humano[23].

A infecção por HPV é mais freqüente em jovens, estando o pico na faixa entre 20 e 24 anos[23]. Entretanto, outros estudos realizados com mulheres acima de 50 anos com alterações citopáticas de infecção por HPV mostraram padrões citológicos similares aos de outras faixas etárias, e quando submetidas à biópsia e hibridização *in situ* demonstraram números semelhantes a faixas etárias mais baixas[25].

A investigação de infecção genital pelo vírus do papiloma humano é feita rotineiramente pela tríade com-

Recebido em 10/7/2003
Aprovado em 30/7/2003
*Prêmio CFF, XXX CBAC, 2003, Rio de Janeiro, RJ
* Trabalho realizado no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA).
[1]Professores do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Citologistas do LACEN-MA; [2]Citologista do LACEN-MA; [3]Farmacêutica-Bioquímica; [4]Acadêmicos do Curso de Farmácia da UFMA.

posta pela colpocitologia, colposcopia e histopatologia. Em verdade, a extensa maioria da população brasileira dispõe apenas do exame citológico como método acessível para identificação tanto de infecção por HPV quanto de lesões pré-malignas e malignas da cérvice.

Atualmente, métodos utilizando biologia molecular estão sendo empregados na detecção do HPV, possibilitando inclusive a tipagem e quantificação viral. São os métodos de hibridização e a PCR.

O exame colpocitológico envolve ações simplificadas e não requer equipamentos, materiais ou técnicas sofisticadas, condições que fazem deste método o mais viável do ponto de vista de saúde pública[26].

A coilocitose, a disceratose e algumas anomalias nucleares caracterizam o diagnóstico citológico de infecção por HPV. Em 1956, Koss e Durfee denominaram de atipia coilocitótica células grandes com citoplasma claro e transparente, circundando um núcleo pequeno, irregular e hipercromático[11].

Células disceratóticas não são específicas de lesões por HPV. São também freqüentes em leucoplasias e displasias. Dessa forma, parece precipitado um diagnóstico de papilomavírus humano baseado apenas na presença dessas alterações. É necessária a observação de um conjunto de parâmetros citológicos[6]. Esfregaços de pacientes com infecção por HPV demonstram os dois tipos celulares mais comuns: coilócitos e células disceratóticas. Apresentam-se limpos com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório, onde predominam as células disceratóticas e poucos coilócitos ou vice-versa[11].

Os critérios não-clássicos de infecção por HPV são a coilocitose leve, disceratose leve, hiperceratose, hipercromasia nuclear, binucleação, halos perinucleares, citoplasma claro, citomegalia, grânulos de cerato-hialino e células alongadas.

A binucleação, multinucleação, núcleo aumentado com padrão de cromatina fina e nucléolo ausente ou diminuído são alterações também vistas em esfregaços de pacientes infectadas pelo HPV[5].

Erros podem ocorrer no que se refere ao laudo citológico. Além das limitações do método, uma coleta inadequada, a má fixação do esfregaço, o erro de leitura por citopatologista ou citotécnico inexperiente, ou condições desfavoráveis da paciente (infecção, traumatismo, uso de DIU, etc) podem levar a uma conclusão equivocada[23].

MATERIAL E MÉTODOS

A população estudada foi composta por pacientes submetidas à colpocitologia oncótica, realizada no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão - Instituto Oswaldo Cruz – Setor de Citopatologia (LACEN-MA), no período de janeiro a dezembro de 2002. Utilizaram-se os arquivos de entrevistas, laudos e lâminas para selecionar as amostras que seriam analisadas.

Seleção das amostras

Fez-se a triagem dos casos através do exame de todos os laudos, sendo selecionados aqueles cujo diagnóstico citológico apresentavam lesões pré-malignas, lesões malignas, alterações citopáticas características ou sugestivas de infecção por HPV, com algum critério celular clássico ou não-clássico da referida virose. Excluiram-se os casos descritos como esfregaços normais, inflamatórios e os insatisfatórios.

Registro dos dados

Anotaram-se os dados existentes nos laudos e nas entrevistas realizadas quando da colheita do material cérvico-vaginal, a saber: a faixa etária, o início da atividade sexual, a realização de exame anterior, a profissão, a procedência (logradouro), os agentes microbiológicos detectados, a presença ou não de células endocervicais e/ou metaplásicas e a conclusão existente no diagnóstico citológico.

Organização dos dados

Agruparam-se os dados para serem avaliados de acordo com a classe a que pertenciam:

a) de acordo com a faixa etária: a primeira faixa compreendeu aquelas com idade até 20 anos, seguida de intervalos de 10 anos e finalizando com uma faixa compostas por pacientes com idade superior a 60 anos;

b) de acordo com o início da atividade sexual: a partir do primeiro grupo formado por pacientes com idade máxima de 15 anos, seguiu-se intervalo de cinco anos até atingir as maiores de 30 anos;

c) quanto à realização de exame anterior;

d) quanto à presença no esfregaço de células endocervicais e/ou metaplásicas;

e) conforme o diagnóstico colpocitológico (Bethesda, 2001);

f) quanto à microflora cérvico-vaginal;

g) quanto à profissão;

h) quanto à procedência (logradouro) e

i) quanto à associação entre o HPV e lesões intra-epiteliais cervicais ou carcinoma invasor

Análise dos critérios morfológicos do HPV

Efetuou-se a revisão das lâminas das pacientes selecionadas para a quantificação das alterações morfológicas relacionadas ao HPV quanto os critérios clássicos e não-clássicos. O referido material encontrava-se corado por Papanicolaou e montada com Entellan®[9].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 256 fichas analisadas de pacientes atendidas no LACEN-MA em 2002, conforme ilustrado na Tabela I, verificou-se que 142 (55,5%) estavam na faixa etária de 31-50 anos, faixa onde freqüentemente se observam alterações citológicas cervicais[22].

Tem-se referido que existe uma nítida associação das lesões cervicais com a idade do início da atividade sexual e o número de parceiros. Todos os fatores permitem caracterizar a lesão cervical como uma doença sexualmente transmissível associada ao HPV. A idéia apoiada por Rawls e colaboradores é de que o primeiro coito em idade precoce poderia significar um epitélio cervical puberal mais suscetível à agressão oncogênica[26].

Tem-se considerado precoce o início de atividade sexual antes de 16 anos e tardio, quando este acontece após os 26 anos.

Adotando-se este critério, foi obtido neste trabalho o índice de 30% para precocidade sexual, sendo que um pico foi observado entre os 16 e 20 anos de idade (52,3%). É importante lembrar a peculiaridade da população estudada, composta apenas por pacientes que demonstraram nos esfregaços cérvico-vaginais alterações indicativas de atipias celulares (Tabela II).

TABELA I
Pacientes selecionadas de acordo com a faixa etária (LACEN-MA, 2002)

Faixa etária	nº pacientes	%
≤20	10	3,9
21–30	45	17,6
31–40	75	29,3
41–50	67	26,2
51–60	33	12,9
≥61	19	7,4
S/informação	7	2,7
Total	**256**	**100**

TABELA II
Início da atividade sexual, por grupos etários (LACEN-MA, 2002)

Faixa etária	nº pacientes	%
15	77	30,1
16–20	134	52,3
21–25	20	7,8
26–30	3	1,2
>30	0	0,0
S/informação	22	8,6
Total	**256**	**100**

TABELA III
Realização do exame colpocitológico anterior, por faixa etária (LACEN-MA, 2002)

Faixa etária	Sim		Não		Não informaram	
	nº	%	nº	%	nº	%
≤20	2	0,8	4	1,6	3	1,2
21–30	12	4,7	20	7,8	12	4,7
31–40	25	9,8	34	13,3	15	5,9
41–50	25	9,8	25	9,8	16	6,3
51–60	7	2,7	13	5,1	12	4,7
≥61	4	1,6	14	5,5	5	2,0
Sem informação	1	0,4	1	0,4	6	2,3
Total	**76**	**29,7**	**111**	**43,4**	**69**	**27,0**

Outro aspecto observado foi a realização de exame colpocitológico anterior (Tabela III). Das 256 pacientes estudadas, 111 (43,4%) nunca haviam sido submetidas a uma citologia oncótica. Entre elas, 28 (10,9%) apresentavam idade superior a 50 anos. Entre as pacientes infectadas pelo HPV, 21,7% estavam submetendo-se ao exame citológico pela primeira vez, entre as pacientes com SIL este índice foi de 40,2%.

A incidência de câncer do colo uterino está na dependência direta da existência ou não de ações primárias atuando no controle dos fatores de risco, e a detecção precoce de lesões precursoras, através do exame citológico, realizado periodicamente por todas as mulheres expostas ao risco[26].

O baixo nível sócio-econômico e doenças sexualmente transmissíveis também são arrolados como fatores de risco importante na etiologia do câncer cervical uterino[4].

Entre as pacientes analisadas, a grande maioria exerce função considerada de baixa remuneração. As empregadas domésticas corresponderam a 23,8%, outras 15,2% eram lavradoras e 30% desenvolviam atividades apenas no lar, sem remuneração. Outras profissões estiveram representadas com menor freqüência como: costureira, zeladora, lavadeira e cozinheira. Boa parte dessas pacientes é oriunda de municípios do interior do Estado somando 224 (87,5%), enquanto apenas 32 (12,5%) foram atendidas nos postos de saúde da capital.

Quanto à presença de agentes microbiológicos quase todas mostraram, pelo menos, um tipo de infecção (Fig. 1). Os cocos estiveram presentes em maior quantidade infectando 91 mulheres (34,9%). Observou-se que 46,0% dos esfregaços examinados com presença de cocos encontravam-se associados à presença de bacilos.

Naquelas infectadas pelo HPV, a co-infecção mais freqüente foi a causada por cocos (27,3%), embora estudos apontem a *Gardnerella vaginalis* como agente mais comumente associado ao vírus do papiloma humano[15,17]. Neste trabalho, a prevalência deste agente foi concordante com estes trabalhos, encontrando-se porcentagem de 18,0%.

Trichomonas vaginalis, apontado como agente de grande agressividade tissular, foi encontrado em apenas 5,7% dos casos. Estes dados concordam com os encontrados na literatura, visto que este agente vem sistematicamente diminuindo a sua incidência ao longo dos anos[1].

A adequação da amostra constitui ponto essencial para um diagnóstico seguro. Vários aspectos estão envolvidos no que se refere a um esfregaço satisfatório para avaliação, cuja descrição é detalhada de forma própria e objetiva na classificação de Bethesda. Além

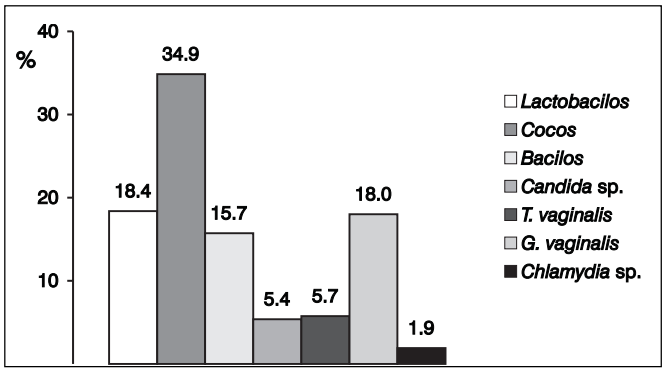


FIG.1 – Distribuição dos agentes microbiológicos encontrados, em porcentagem. (LACEN-MA, 2002)

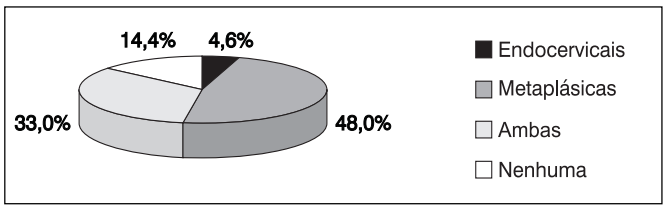


FIG.2 – Presença de células endocervicais e/ou metaplásicas nos esfregaços analisados. (LACEN-MA, 2002)

da identificação apropriada das lâminas e informações clínicas relevantes, a composição celular do esfregaço é considerada primordial na avaliação de sua representatividade.

O fato é que na junção escamo-colunar origina-se a maioria das lesões precursoras do câncer de colo. A presença de um componente escamoso e endocervical garantem uma amostra adequada dessa região, aumentando a probabilidade da detecção de anormalidades cervicais[21]. Ainda, existem observações que indicam que espécime sem tais componentes também permite a identificação de atipias celulares[5].

O sistema Bethesda estabelece, como um componente endocervical/zona de transformação adequado, um mínimo de dois grupos celulares glandulares endocervicais e/ou metaplásicas bem preservadas, sendo cada grupo composto por, pelo menos, 5 células, não se aplicando a esfregaços marcadamente atróficos, onde células metaplásicas e endocervicais nem sempre podem ser distintas de células parabasais[12].

Entre as pacientes selecionadas para este estudo, 37 (14,4%) não apresentaram células endocervicais nem metaplásicas e 85,6% mostraram células endocervicais, metaplásicas ou ambas. Das 135 mulheres que tiveram laudo de neoplasia intra-epitelial cervical 17 (12,6%) não exibiam esses tipos celulares (Fig. 2).

TABELA IV
Distribuição dos casos de acordo com o laudo citológico e faixa etária
(LACEN-MA, 2002)

Faixa etária	ASCUS		LSIL		HSIL		Carcinoma invasor	
	n	%	n	%	n	%	n	%
≤20	0	0,0	10	3,9	0	0,0	0	0,0
21–30	4	1,6	29	11,3	11	4,3	0	0,0
31–40	14	5,5	4	1,6	24	9,4	1	0,4
41–50	16	6,3	43	16,8	35	13,7	2	0,8
51–60	5	2,0	14	5,5	16	6,3	1	0,4
≥61	0	0,0	10	3,9	6	2,3	0	0,0
S/ inform.	0	0,0	6	2,3	4	1,6	0	0,0
Total	**39**	**15,2**	**116**	**45,3**	**96**	**37,5**	**4**	**1,6**

TABELA V
Relação entre HPV e lesões intra-epiteliais cervicais, por faixa etária (LACEN-MA, 2002)

Faixa etária	LSIL		HSIL	
	n	%	n	%
≤ 20	2	0,9	0	0,0
21–30	7	3,3	1	0,5
31–40	5	2,4	2	0,9
41–50	6	2,8	1	0,5
51–60	0	0,0	0	0,0
≥61	0	0,0	0	0,0
Total	**20**	**9,4**	**4**	**1,9**

O universo ao qual pertencem as 256 pacientes escolhidas para este estudo é de 8.020 fichas analisadas, chegando-se ao percentual de incidência tanto das lesões intra-epiteliais cervicais e carcinoma invasor, quanto da infecção por papilomavírus humano. Atipias em células escamosas de significado indeterminado e lesões de baixo e alto grau tiveram índice de 0,5%, 1,4% e 1,2%, respectivamente. Quatro casos de carcinoma invasor foram encontrados (0,05%) e o percentual de infecção por HPV foi de 0,3%.

O número total de casos alterados diagnosticados deve corresponder a 4 a 6% do total de casos avaliados[12]. Entretanto, dados recentes revelaram taxas de resultados alterados na ordem de 4,80%[18], 3,14%[2] e 4,75%[3]. O quantitativo de casos alterados diagnosticados e relatados neste trabalho (3,15%) encontram-se dentro da faixa do padrão internacional.

Das 96 pacientes com lesão de alto grau, 59 encontravam-se na faixa etária de 31-50 anos, e dois dos quatro casos de câncer invasivo estão na faixa de 51 a 60 anos (Tabela IV).

O total de casos de HPV observados neste trabalho foi de 24, sendo que a relação com as lesões intra-epiteliais cervicais de baixo e alto grau correspondeu a 9,4 e 1,9%, respectivamente. É fácil notar, neste caso, o decréscimo na detecção do HPV com o aumento do grau da lesão cervical (Tabela V).

Características de infecção por papilomavírus humano coexistem nas lesões de alto grau, embora a coilocitose seja encontrada com menos freqüência nesta circunstância. A coilocitose representa multiplicação virótica e lesões contagiosas, porém menos graves, ao passo que nas mais severas a coilocitose não está presente; nesses casos, o genoma viral estaria integrado à célula. Assim, perde-se o poder infectante, ganhando-se o poder oncogênico[11].

Durante o *screening* do material em estudo, foram registrados as alterações relacionadas ao HPV presentes em cada esfregaço, como as alterações clássicas, a coilocitose e a disceratose, e as não-clássicas, como esboço de coilocitose, hiperceratose, paraceratose, binucleação, multinucleação, células com aspecto de rachaduras citoplasmáticas (amarfanhados celulares), presença de grânulos de cerato-hialino, cariomegalia, citomegalia e escamas, além de atipias nucleares.

Entre as mulheres infectadas pelo HPV, as alterações mais encontradas foram a hiperceratose (91,7%), a disceratose (79,2%), a cariomegalia (83,3%) e a citomegalia (70,8%). Os coilócitos característicos estiveram presentes em 45,8% dos casos, e os esboços (coilocitose leve) em 66,7% (Tabela VI).

TABELA VI
Freqüência de alterações celulares relacionadas ao HPV (LACEN-MA, 2002)

Alterações celulares	nº pacientes	% de ocorrência
Coilocitose	11	45,8
Disceratose	19	79,2
Esboço de coilocitose	16	66,7
Hiperceratose	22	91,7
Paraceratose	7	29,2
Binucleação	14	58,3
Citomegalia	17	70,8
Cariomegalia	20	83,3
Amarfanhados	18	75,0
Escamas	20	83,3

Na literatura foi relatado que 60% das infecções cervicais e vaginais por HPV demonstram coilócitos típicos, 20% de casos adicionais revelam coilócitos se rastreados cuidadosamente, e cerca de 20% não são detectados por método citológico[5].

As mudanças citoplasmáticas sofridas pelas células até a formação do coilócito derivam provavelmente do processo de produção virótica, iniciando-se com o aparecimento de formações semelhantes a microvacúolos, cuja fusão determina o aparecimento de uma zona clara que se alarga gradual e centrifugamente até a formação de um grande halo perinuclear[11].

Um estudo similar realizado por Moura com 80 pacientes cujos laudos mostraram alterações compatíveis com HPV apresentou freqüência concordante em muitos critérios apresentados neste trabalho, com a diferença que a freqüência de coilocitose encontrada por esse autor foi mais significativa (95,0%). Nota-se uma acentuada discordância quanto ao percentual de coilócitos clássicos, além da ausência de citação da coilocitose leve como critério citológico na detecção de HPV na referida pesquisa.

Assim, se for levado em consideração os achados de coilocitose e aquelas alterações bastante sugestivas de sua presença (esboço de coilocitose), este índice sobe para a quase totalidade dos casos examinados.

Outros estudos relatam as alterações citológicas re-

lacionadas ao HPV, chegando a um certo nível de discordância entre a presença e a freqüência dos vários critérios de identificação do vírus.

Tem-se verificado que mais de 99% de todos os cânceres cervicais contém alto risco para HPV[14]. Estudos prospectivos e de seguimento têm mostrado que mulheres com lesões cervicais apresentam elevada incidência de HPV, variando, porém as taxas de acordo com o método de detecção do vírus[8,10,20]. Palaoro e colaboradores[19], em pesquisa realizada com 129 mulheres com diagnóstico prévio de infecção por HPV através de método biomolecular, chegaram a um índice de 48,8% de casos mostrando coilócitos.

O diagnóstico citológico de condiloma virótico não pode ser baseado apenas no encontro de células coilocitóticas. Outros tipos são mais freqüentemente observados, especialmente células displásicas mono ou binucleadas, com esboço de coilocitose com marcante hipercromasia nuclear, presente em 66,2% dos casos[13].

Chuaqui e Verni[7] em análise de sinais não-clássicos de infecção por HPV em 81 mulheres com condiloma confirmado em biópsia, observou 78% de casos contendo halos perinucleares, 77% com citoplasma claro e 74% apresentando coilocitose leve. Verificaram ainda que 89% exibiram, pelo menos, quatro dos critérios não-clássicos de infecção.

CONCLUSÃO

A análise dos aspectos observados na população estudada permitiu a discussão dos vários fatores relacionados à infecção pelo vírus do papiloma humano e sua associação a lesões cérvico-vaginais, dentre os quais destacam-se alguns de maior importância, a saber:

- a maioria das pacientes mostrou um perfil considerado de risco para a infecção pelo vírus e o desenvolvimento de lesões intra-epiteliais cervicais. Apresentaram início de atividade sexual precoce, grande freqüência de infecção por agentes microbiológicos, baixo nível sócio-econômico, além do grande número de mulheres submetendo-se ao exame citológico pela primeira vez após os 40 anos de idade;
- a freqüência das lesões intra-epiteliais cervicais e a detecção do HPV decresceram com o aumento da severidade da lesão cervical. Dos 212 casos de SIL (Tab.IV), 24 estavam associados ao HPV, sendo que a maioria estava caracterizada como LSIL;
- quanto às alterações relacionadas ao HPV, as de maior freqüência foram as consideradas não-clássicas, merecendo destaque a hiperceratose, a cariomegalia, os amarfanhados celulares e a presença de escamas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão e aos técnicos do Setor de Citopatologia do referido laboratório:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Adad, S.J.; De Lima, R. V.; Sawan, Z. T. *et al.*** Frequency *of Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp. and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smear in four different decades. *São Paulo Med. J.,* 119(6):200-205, 2001.
2. **Altaf, F.J.** Pattern of cervical smear cytology in the western region of Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*, 21(1-2): 94-96, 2001.
3. **Arcuri, R.A., Cunha, K. C. F., Alves, E. C. *et al.*** Controle interno da qualidade em citopatologia ginecológica: um estudo de 48.355 casos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38(2): 141-147, 2002.
4. **Assis, J.S.** Aspectos colposcópicos e histológicos do colo do útero, vagina e vulva em mulheres com colpocitologia oncótica alterada. *Rev. Ginecol. Obst.,* 79(4):145-158,1996.
5. **Bibbo, M.; Morais Filho, A.** *Lesões relacionadas às infecções por HPV no trato anogenital.* Rio de Janeiro: Revinter, 1998.
6. **Costa, A. F. M.** *Comparação da incidência das neoplasia intra-epiteliais cervicais e papilomavírus humano nos laboratórios de citologia clínica da Faculdade de Farmácia e Gemma Galgani.* São Luís. Monografia de Conclusão de Curso de Farmácia – Universidade Federal do Maranhão. 1997.
7. **Chuaqui, R.; Verni, J.** Diagnóstico de infección por virus papiloma humano en citología cervical con ausencia signos clasicos. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.,* 58(4): 304-9, 1993.
8. **Denise, Z. G.; Snijders, P. J.; Rozendaal, L. *et al.*** High-risk HPV testing in women with borderline and mild diskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol.*, 195(3): 300-6, 2001.
9. **Gompel, C.; Koss, L. G.** *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. São Paulo: Manole, 1997. 200p.
10. **Herbst, A. L.; Pickett, K. E.; Follen, M. *et al.*** The management of ASCUS cervical cytology abnormalities and HPV testing: a cautionary note. *Obstet. Gynecol.*, 98: 849-51, 2001.
11. **Jacyntho, C.; Almeida Filho, G.; Maldonado, P.** *Hpv: infecção genital feminina e masculina.* Rio de Janeiro: Revinter, 1996. 130p.
12. **Kurman, R. J.; Solomon, D.** *O sistema Bethesda para o relato de diagnóstico citológico cérvico-vaginal.* Rio de Janeiro: Revinter, 1997. 75p.
13. **Lira Neto, J. B.** Aspectos citológicos da infecção ginecológica pelo Papilomavírus humano. *J. Bras. Ginec.,* 95(7):281-87, 1985.
14. **Meijer, C. J.; Rozendaal, L.; Voorhorst, F.J. *et al.*** Human papillomavirus and screening for cervical cancer: state of art and prospects. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.,* 144(35): 1675-9, 2000.
15. **Motta, E. V.; Fonseca, A. M.; Bagnoli, V.R. *et al.*** A colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. *Rev. Assoc. Med.Bras.*, 47(4): 302-310, 2001.
16. **Moura, C. A.** *Avaliação dos aspectos citológicos encontrados em esfregaços com padrão celular de infecção por papilomavírus humano.* São Luís. Monografia de Conclusão de Curso de Especialização em Citologia Clínica – Universidade Federal do Maranhão. 1995.
17. **Murta, E. F. C.; Souza, M.A.H.; Araújo Júnior, E. *et al.*** Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human papilloma virus in cytological smears. *São Paulo Medical Journal*, 118(4): 105-108, 2002.
18. **Nyirjesy, I., Billingsley, F. S., Forman, M.** Evaluation of atypical and low grade cervical cytology in private practice. *Obstestrics and Gynecology,* 92(4): 601-607, 1998.
19. **Palaoro, L. A.; Szulc, M.; Giogrande, J.C. *et al.*** Cells with dyskeratotic inclusions in smear from cervix uteri infected by human papillomavirus. *Rev. Bras. Cancer.,* 45(2):42, 1999.
20. **Roteli-Martin, C. M.; Derchain, S. F.; Martinez, E. Z. *et al.*** Morphological diagnosis of HPV lesions and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is highly reproducible. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.,* 28(2): 78-80, 2001.
21. **Shirata, N. K.; Pereira, S. M. M.; Cavalieri, M. J. *et al.*** Celularidade dos esfregaços cérvico-vaginais: importância e programa de garantia de qualidade em citopatologia. *J. Bras. Ginecol.,* 108: 63-6, 1998.
22. **Silva, H. A.; Silveira, L. M. S.; Corrêa, P. B. F. *et al.*** A influência da fase pré-analítica no controle de qualidade do diagnóstico colpocitológico. *RBAC*, 34(3): 131-135, 2002.
23. **Silveira, G. P. G.; Pessini, S.A.** Câncer do colo uterino: lesões precursoras. *In:* **Halbe, H. W.** *Tratado de ginecologia.* 2ed. São Paulo: Roca, v.2, 1994. 1800p.
24. **Sugishita, T.** Gynecological cytology in theory and practice. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*; 46(8):717-22, 1994.
25. **Utagawa, M. L.** Papilomavírus humano em esfregaço citológico de mulheres acima de 50 anos: estudo morfológico *in situ* nas respectivas biósias. *J. Bras. Ginecol.*, 107(4): 83-87, 1997.
26. **Zeferino, L. C.** Epidemiologia da neoplasia intra-epitelial cervical. *Rev. Ginecol. Obst.,* 1(1):22-32,1990.

SBAC/CE

II Congresso Regional de Análises Clínicas do Nordeste

12 a 14 de dezembro de 2003

Centro de Convenções do Ceará, Fortaleza/CE
Inf.: (0xx21)2234-4881 e (0xx85)256-2867

SBAC/PB

Curso de Genética Humana

Dezembro/2003

Inf.: (0xx83)226-2711
E-mail: congressopb@yahoo.com.br

Análise de amostras preservadas para controle de qualidade em hematologia em laboratórios de análises clínicas de Curitiba e Região Metropolitana, PR

Preserved samples analysis for hematology quality control in clinical laboratories from Curitiba and Metropolitan area, PR, Brazil

Aline Borsato Hauser[1]; Caroline Luise Prochaska[2]; Aguinaldo José do Nascimento[3] & Maria Suely Soares Leonart[4]

RESUMO – Para a obtenção de valores hematológicos confiáveis, é imprescindível o emprego de amostras controle estáveis, como parte de programas de Controle de Qualidade. Esse projeto teve como objetivo analisar a estabilidade de amostras preservadas em hematimetria. Preparou-se amostras estáveis para o eritrograma e plaquetas, a partir de unidades de sangue venoso de 3 doadores, coletadas no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR. Isolou-se eritrócitos e plaquetas, ressuspendendo-se em meio CE, após fixação parcial com glutaraldeído (Leonart *et al., RBAC* 21:111,1989; Emendörfer *et al., RBAC* 32:192, 2000) para amostras controle altas, médias e baixas. Distribuiu-se alíquotas aos laboratórios participantes, que determinaram os valores do eritrograma e plaquetas semanalmente, empregando os equipamentos T890 e STKS (Coulter), Cell Dyn 1400, 1700 e 3500 (Abbott) ou Sysmex (Roche). Comprovou-se a estabilidade das amostras durante a preservação pelo coeficiente de determinação (r^2) próximo de zero, cujos valores foram comparados nas amostras-controle altas, médias e baixas como medida de tendência central e de dispersão. A comparação dos valores médios de r^2 para as medidas hematimétricas em função do tempo mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras controle ($p>0,05$). As amostras controle médias mostraram menor dispersão em torno da média que as amostras-controle altas e baixas para eritrócitos, hemoglobina e VG ($p<0,05$). A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que a amostra-controle média resulta em menor variabilidade dos dados durante o armazenamento, e que as amostras analisadas apresentaram estabilidade adequada para uso em controle da qualidade em hematologia.

PALAVRAS-CHAVE – Controle da qualidade em hematologia, preservação de eritrócitos e preservação de plaquetas.

SUMMARY *– In order to obtain reliable values in hematology it is necessary the employment of stable control samples as part of Quality Control Programs. The aim of this work was to analyze the samples stability for the red cells values and platelet. Stable samples were prepared from three healthy donors' venous blood. The blood samples were collected in the Blood Bank of UFPr's Clinical Hospital. The isolated red blood cells and platelets were partially fixed with glutaraldehyde and ressuspended in CE solution (Leonart* et al*. RBAC 21:111,1989; Emendörfer* et al*. RBAC 32:192, 2000) for high, medium and low control samples. Aliquots were distributed weekly to the participant laboratories wich determinates the red cell values and platelets, using automated equipments T890 and STKS (Coulter); Cell Dyn 1400, 1700 and 3500 (Abbott) or Sysmex (Roche). Samples stability as a function of time were observed during the preservation by the coefficient determination (r^2) close to zero being analyzed for average and variance values and compared for the high, medium and low control samples. The comparison for r^2 average values to hematology as a function of time showed that there was no difference statistically significant among the three control samples ($p>0.05$). The medium control showed smaller dispersion around the average then the high and low controls for red cells, hemoglobin and PCV ($p<0.05$). It can be concluded that the samples presented stability during preservation and was adequate for use in quality control in hematology.*

KEYWORDS *– Quality control in hematology, red blood cell preservations, platelet preservations*

INTRODUÇÃO

A implantação de programas de controle de qualidade em hematologia é essencial para um cuidado adequado aos pacientes. Embora a avaliação do controle da qualidade interno e externo tenha melhorado, um sistema ideal de controle de qualidade, para todas as determinações hematológicas, ainda não é viável. Muitos laboratórios de análises clínicas têm utilizado amostras de sangue preservadas como material de referência (Springer *et al.*, 1999).

O sangue, mantido a 4 °C com os anticoagulantes usuais, é estável apenas por 1 a 4 dias. Porém, as amostras-controle devem conter células humanas ou de animais, fixadas, tamponadas, estabilizadas ou preservadas (Leonart *et al.*, 1986). A amostra ideal para controle da qualidade dos dados do eritrograma deve conter eritrócitos em suspensão, mantido por longos períodos, com características próprias de forma, metabolismo, fluidez da membrana, maleabilidade, filtrabilidade, resistência à hemólise e capacidade de liberar a hemoglobina, para que a mesma possa ser dosada corretamente (Leonart, 1994).

Recebido em 9/4/2003
Aprovado em 30/7/2003

*Trabalho realizado como parte de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

[1]Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Farmacêutica Bioquímica do Laboratório Frischmann-Aisengart, Curitiba-PR;
[2]Bolsista do Programa PIBIC CNPq/UFPR, Acadêmica do Curso de Farmácia; [3]Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica;
[4]Professora Titular do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

Foram desenvolvidas amostras adequadas ao controle da qualidade em hematimetria, estáveis para os valores do eritrograma, pela preservação de eritrócitos em meio CE, composto por glicose, cloreto de sódio, citrato de sódio, fosfato monohidrógeno de sódio, cloreto de potássio, Edta Na_2, albumina bovina, cloromicetina, neomicina e cortisona (Leonart *et al.*, 1986). Amostras obtidas com incubação dos eritrócitos em glutaraldeído e ressuspensas em meio CE, apresentam viscosidade ideal para a determinação dos valores do eritrograma (Leonart *et al.*, 1989). Tais amostras foram distribuídas a 10 laboratórios, com metodologias diferenciadas, para a determinação de valores do eritrograma durante um período de 3 meses, coletando-se dados cuja análise estatística comprovou o sucesso do seu uso em programas de controle externo da qualidade (Braga *et al.*, 1990).

Acredita-se que a amostra ideal para preservação de plaquetas para controle de sua contagem inclui a manutenção da morfologia original, níveis de ATP, glicose, lactato e pH adequados para realizar a sua contagem (Snyder, 2000). A idéia de se empregar meios de preservação em comum para eritrócitos e plaquetas se fundamentou no estudo comparativo do metabolismo e da estrutura de ambos, considerando-se principalmente as semelhanças existentes nas estruturas das membranas eritrocitária e plaquetária (Heaton *et al.*, 1990).

Emendorfer *et al.*, 2000 testaram amostras de plaquetas em meio CE após fixação parcial com glutaradeído em sistema semelhante ao já testado para eritrócitos, obtendo-se valores estáveis durante 50 dias.

O presente trabalho é o resultado de um planejamento para o estudo da variação interlaboratorial em hematologia envolvendo 14 laboratórios de análises clínicas de médio e grande porte, públicos e privados, de Curitiba e Região Metropolitana, PR. Objetivou-se avaliar a estabilidade de amostras-controle altas, médias e baixas para os valores do eritrograma e da contagem de plaquetas, através do estudo das possíveis variações interlaboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR).

Após consentimento informado, coletou-se 3 unidades de sangue venoso, de doadores voluntários, no Banco de Sangue do HC/UFPR, segundo as Normas Técnicas para coleta de sangue em Hemocentros, preconizadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), portaria nº 2.135 (Brasil, 2003) (Fig.1).

Acondicionou-se as amostras em bolsas triplas (Grifols), num sistema fechado, com uma bolsa mãe constituída de cloreto de polivinil (PVC), com citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA1) e duas bolsas satélites, uma de PVC e a outra de material plastificante tri-2-etilexil-trimelitato (TOTM), para preservação de plaquetas. Centrifugou-se as bolsas (centrífuga refrigerada Sorvall RC-3B), durante 6 min a 600xg, transferindo-se o plasma rico em plaquetas para a bolsa TOTM e mantendo-se o concentrado de eritrócitos na bolsa mãe. Removeu-se os leucócitos do plasma rico em plaquetas (Bio P Plus Biofil) e do concentrado de eritrócitos (R-500 II Sepacell Baxter), filtrando-se durante cerca de 20 min. Submeteu-se o material empregado para o preparo das amostras à lavagem em Extran neutro (Merck) e a sucessivos enxágües em água destilada-deionizada, para evitar contaminações mínimas por metais pesados, autoclavando-o (Grimes, 1980; Leonart *et al.*, 1986). Preparou-se o meio CE (Leonart *et al.*, 1986) para a preservação de eritrócitos e de plaquetas com água do tipo I (Elga Maxima Ultra Pure Water), tindalizando-o a 65ºC antes do uso. Fixou-se parcialmente os eritrócitos e as plaquetas com glutaraldeído em meio CE, diluindo-se as suspensões de células no meio na proporção de 1:2, e homogeneizando-se as amostras durante 1h (homogeinizador Melco LPR-3A). Os procedimentos em sistema aberto foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Centrifugou-se as amostras de eritrócitos a 600 x g durante 20min. Retirou-se o meio CE sobrenadante com extrator de plasma (Hemoblu) (Fig. 2), ressuspendendo-se os eritrócitos em meio CE, em frascos plásticos estéreis de 100ml para: amostras-controle altas - 70ml de eritrócitos e 20ml de meio CE; amostras-controle médias - 50 ml de eritrócitos e 40ml de meio CE e amostras-controle baixas - 30ml de eritrócitos e 60 ml de meio CE, para VG de 60%, 45% e 25%, respectivamente.

Centrifugou-se as amostras de plaquetas a 2250xg durante 10min, retirando-se o meio CE sobrenadante. Adicionou-se o sedimento de plaquetas ao meio CE em frascos plásticos estéreis de 100ml para amostras-controle altas - 15ml de plaquetas e 35ml do meio CE, e amostras-controle médias - 5ml de plaquetas e 45 ml do meio CE.

Realizou-se o controle microbiológico das amostras, semeando-as em meio Brain Heart Infusion (BHI) para hemocultura, não se observando turvação, ou seja, crescimento bacteriano. Homogeneizou-se as suspensões de eritrócitos e de plaquetas, fracionando-as em alíquotas de 2ml e acondicionado-as em frascos plásticos, mantidos a 4 ºC. Distribuiu-se as amostras preserva-

FIG.1 - Bolsa tripla (grifols) após a coleta de uma unidade de sangue venoso. (Banco de Sangue do HC/ UFPR).

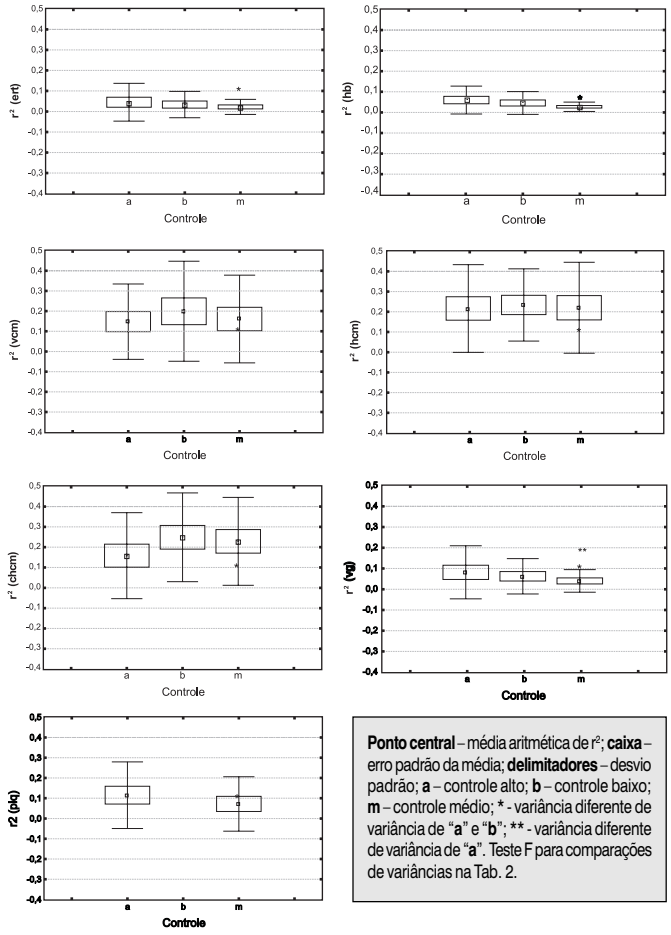
FIG.2 - Extratores de plasma (hemoblu) para a separação de sedimento de eritrócitos e de plaquetas. (Banco de Sangue do HC/UFPR).

das a 14 Laboratórios de Análises Clínicas, com orientações pertinentes ao manuseio das mesmas. Em cada laboratório, determinou-se a contagem de eritrócitos ($x10^6/\mu l$), a concentração de hemoglobina (g/dl), os valores de VCM (fl), HCM (pg), CHCM (g/dl) e VG (%) e a contagem de plaquetas; semanalmente, durante 11 semanas, empregando os equipamentos T890 e STKS (Coulter), Cell Dyn 1400, 1700 e 3500 (Abbott) ou Sysmex (Roche).

Analisou-se a estabilidade das amostras preservadas para as variáveis analisadas em relação às 11 semanas de análise, através da correlação linear, com as medidas hematimétricas (y) em função do tempo (x). Utilizou-se o coeficiente de determinação (r^2) para verificar a estabilidade das amostras e a influência da concentração da suspensão de células na qualidade de preservação. Submeteu-se os valores de r^2 para as variáveis hematimétricas nas amostras-controle altas, médias e baixas, à análise de dispersão e comparação de média pela análise de variância. Considerou-se os resultados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$ (Vieira, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos para os valores do eritrograma e contagem de plaquetas nas amostras-controle altas, médias e baixas está ilustrada na Fig. 3 e Tabelas I e II.



Ponto central – média aritmética de r^2; **caixa** – erro padrão da média; **delimitadores** – desvio padrão; **a** – controle alto; **b** – controle baixo; **m** – controle médio; * - variância diferente de variância de "**a**" e "**b**"; ** - variância diferente de variância de "**a**". Teste F para comparações de variâncias na Tab. 2.

FIG.3 - Valores médios e a variabilidade dos dados do coeficiente de determinação (r^2) obtidos a partir dos valores hematimétricos de amostras controle altas, médias e baixas, em função do tempo. gráficos de caixa e delimitadores.

TABELA I
Análise de variância para comparações entre os valores médios dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir dos valores hematimétricos das amostras-controle altas, médias e baixas

Fonte	Tratamento		Resíduo		F	p
	QM	GL	QM	GL		
ert	0,00235	2	0,00475	38	0,49475	0,613
hb	0,00460	2	0,00287	38	1,60378	0,214
vcm	0,00112	2	0,04779	38	0,23363	0,792
hcm	0,00125	2	0,04297	38	0,02905	0,971
chcm	0,02477	2	0,04761	38	0,52029	0,598
vg	0,00794	2	0,00888	38	0,89423	0,417
plq	0,01222	1	0,02268	25	0,53881	0,469

QM - quadrado médio; GL- graus de liberdade; F- teste de distribuição F; p - probabilidade

TABELA II
Teste F para comparações de variâncias entre os valores médios dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir dos valores hematimétricos de amostras-controle altas, médias e baixas, em função do tempo

Variáveis	Controle	N	s^2	Comparações			
				Teste F	ab	am	bm
ert	a	13	0,0090	Fo	2,179	6,652	3,052
	b	14	0,0041	p	p>0,05	**p<0,05**	**p<0,05**
	m	14	0,0014				
hb	a	13	0,0050	Fo	1,556	9,266	5,955
	b	14	0,0032	p	p>0,05	**p<0,05**	**p<0,05**
	m	14	0,0005				
vcm	a	13	0,0361	Fo	1,641	1,309	1,254
	b	14	0,0592	p	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	m	14	0,0472				
hcm	a	13	0,0465	Fo	1,457	1,089	1,586
	b	14	0,0320	p	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	m	14	0,0507				
chcm	a	13	0,0477	Fo	1,016	1,019	1,035
	b	14	0,0484	p	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	m	14	0,0468				
vg	a	13	0,0170	Fo	2,368	5,779	2,441
	b	14	0,0072	p	p>0,05	**p<0,05**	p>0,05
	m	14	0,0030				
plq	a	14	0,0270	Fo		1,506	
	m	13	0,0180	p		p>0,05	

N - Número de dados; s^2 - variância; Fo - Razão entre pares de variâncias; Fc – (F crítico a 5%): ab - 2,600; am - 2,600; bm - 2,57 p – probabilidade; ab – alto x baixo; am – alto x médio; bm – baixo x médio.

A relação entre os valores hematimétricos das suspensões de eritrócitos e de plaquetas preservados em meio CE, após fixação parcial com glutaraldeído, e o tempo de armazenamento (11 semanas) foi analisada como o coeficiente de determinação (r^2), ou seja, o coeficiente de correlação (r) elevado ao quadrado. O r^2 foi calculado para todos os dados independentes analisados, cerca de 400 dados para cada variável. Observa-se na Figura 3, que a média aritmética de r^2 é próxima de zero para todas as medidas hematimétricas em todos os níveis de controle, o que indica a sua estabilidade em função do tempo.

Não se observou diferença estatística entre as médias do r^2 para as amostras-controles altas, médias e baixas,

conforme a Tabela I (ANOVA, $p>0,05$). A comparação das variabilidades dos dados do r^2 em torno dos valores médios, entre as amostras-controle, foi analisada pelas comparações de variância pelo teste F, cujos resultados estão ilustrados na Tabela II. As menores variâncias foram obtidas com as amostras-controle médias, nas medidas hematimétricas de eritrócitos, hemoglobina e VG ($p<0,05$), como se observa na Fig. 3.

Mesmo com correlações estatisticamente semelhantes e próximas de zero para as amostras-controle para todos os valores hematimétricos (Tabela I), observou-se uma menor dispersão dos dados em torno dos valores médios para as amostras-controle médias, nas quais a relação entre células e meio CE era em torno de 50% (Tabela II).

Para que a qualidade seja mantida em relação à determinação de valores hematimétricos, é relevante que sejam reforçados os programas de controle da qualidade já existentes no país e também que se estabeleçam novos programas, que envolvam todos os laboratórios, inclusive os de pequeno porte. É necessário também que se estimule a pesquisa científica para o desenvolvimento de novas metodologias nesta área, incluindo a padronização e o preparo de amostras-controle estáveis, viáveis e de boa qualidade para as mais diversas determinações laboratoriais.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

a) Amostras de eritrócitos e de plaquetas preservadas em meio CE, após fixação parcial com glutaraldeído, são adequadas para uso em controle da qualidade para os valores de eritrograma e contagem de plaquetas, por se manterem estáveis durante 11 semanas.

b) A média aritmética dos valores do r^2, para os valores hematimétricos e o tempo de armazenamento, foi próxima de zero para todas as medidas hematimétricas em amostras-controle altas, médias e baixas, porém com menor dispersão para as amostras-controle médias.

AGRADECIMENTOS

Aos doadores das unidades de sangue e às equipes do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e dos Laboratórios de Análises Clínicas participantes: Frischmann-Aisengart, Hospital Cajuru, Hospital de Clínicas da UFPR, Hospital Geral do Exército de Curitiba, Hospital do Trabalhador, Hormocentro, Metrolab, Champagnat, Hospital das Nações, Hospital Nossa Senhora das Graças, Paraná Clínicas, Prefeitura Municipal de Curitiba e Prefeitura Municipal de Araucária; à CAPES, UFPR e Fundação Araucária pela cooperação para a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. **Braga, A.L.; Tutake, E.M.; Nascimento, A. J. Pelissari, C. B.; Stinghen, S. T.; Malvezzi, M.; Duarte, L. C.; Leonart, M.S.S.** Controle de qualidade externo do eritrograma: uma experiência em laboratórios de análises clínicas do Paraná. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro. v.22, n.4, p. 93-96, 1990.
2. **Brasil**. Portaria nº 2.135, de 22 de dezembro de 1994. Normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/> Acesso em 20 fev. 2003.
3. **Emendörfer, F.; Claro, L. M.; Comar, S. R.; Nascimento, A. J.; Leonart, M. S. S.** Meio CE e glutaraldeído na preservação de plaquetas para o controle de qualidade em hematimetria. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.191-194, 2000.
4. **Grimes, A. T.** *Human red cell metabolism.* Oxford: Blackwell, 1980. 384 p.
5. **Heaton, W. A. L.; Holme, S.; Keegan, T.** Development of a combined storage medium for 7-day storage of platelet concentrates and 42-day storage of red cell concentrates. *British Journal of Haematology*, Oxford, v.75, p.400-407, 1990.
6. **Leonart, M.S.S.** *Estudos sobre a preservação de eritrócitos*. 131f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 1994. Orientador: Domênico H. G. P. Barbieri.
7. **Leonart, M. S. S.; Granato, E. S.; Nascimento, A. J. Hashimoto, Y.; Leonart, R.** Solução preservadora de eritrócitos para controle de qualidade do eritrograma. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.18, p.7-12, 1986.
8. **Leonart, M. S. S.; Silva, E. L.; Stinghen, S. T.; Nascimento, A. J.** Amostra para controle de qualidade do eritrograma estável durante 100 dias. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.21, p.111-113, 1989.
9. **Snyder, E. L.** Platelet storage – 1999 as good as it gets? *Transfusion Science*, Oxford, v.22, p.89-91, 2000.
10. **Springer, W.; Prohaska, W.; Neukammer, J.; Hope, A.; Ruecker, A.** Evaluation of a new reagent for preserving fresh blood samples and its potencial usefulness for internal quality controls of multichannel hematology analyzers. *American Journal of Clinical Pathology*, Philadelphia, v.111, p.387-396, 1999.
11. **Vieira, S.** *Introdução à Bioestatística*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998.

Endereço para correspondência
Profª Drª Maria Suely Soares Leonart
R. Benvenuto, 880 - B. Vista - Vitória - ES - 82540-080
E-mail: msue@ufpr.br

Adesão grátis

A SBAC oferece até ***março de 2004***, a oportunidade dos colegas professores se associarem gratuitamente. Para isso basta apresentar documentação que comprove o vínculo empregatício e duas fotos 3x4. A ficha de inscrição pode ser obtida no site:

www.sbac.org.br • e-mail: congresso@sbac.org.br

ou na Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

Os acadêmicos de penúltimo e último período e primeiro ano após a formatura na habilitação de Análises Clínicas, também têm inscrição gratuita. Os documentos necessários são duas fotos 3x4, declaração do coordenador do curso ou certificado de conclusão.

Os acadêmicos de pós-graduação que quiserem inscrever trabalhos de pesquisa nos Temas Livres, deverão fazê-lo pagando a taxa de inscrição do Congresso apenas do titular do trabalho; os outros participantes terão o acesso liberado.

Contatos:

Prof. Antenor H.P. Pedrazzi
pedrazzi@cirp.usp.br
Tel.: (0xx16)625-4970

Prof. Homero J. J. Lopes
sac@goldanalisa.com.br
Tel.: (0xx31)3275-3756 ou 3272-1888

Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-β-lactamases isoladas em João Pessoa/PB*

The presence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBLs isolated in João Pessoa, Paraíba, Brazil

Lauro Santos Filho[1]; Isabele Beserra Santos[2]; Danilo Elias Xavier[3] & Liana Carballo Menezes[4]

RESUMO – *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista que apresenta um alto nível de resistência aos antimicrobianos, sendo freqüentemente isolado com capacidade de produzir metalo β-lactamases (MBLs), que são enzimas com atividade sobre vários β-lactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenens. O trabalho teve por objetivo confirmar por tipagem molecular a presença de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de MBLs já dectadas por métodos fenotípicos. Foram analisadas 250 amostras não repetitivas de *P. aeruginosa* identificadas por métodos de rotina. Foram consideradas para análise as cepas que mostraram-se multirresistentes, com diminuição de sensibilidade ao imipenem (halo<16mm) e a ceftazidima (halo<18mm). Estas foram submetidas aos testes fenotípicos de dupla difusão com discos em superfície de agar e ao método E-test® padronizados para a detecção de MBLs, confirmadas pelo método molecular de PCR. Como resultado foi obtido um percentual de 14,8% de resistência cruzada ao imipenem/ceftazidima com identificação de (8/250) 3,2% de amostras produtoras de MBLs, das quais 75% foram caracterizadas como SPM-1 e 25% como IMP-1. Destacando a importância do isolamento de amostras com o gene SPM-1 em nosso meio, sem que haja um relacionamento epidemiológico. O aparecimento destes tipos de amostras se configura um problema emergente, com importantes implicações na terapêutica antimicrobiana e necessitando, portanto, de maior investigação através de metodologia molecular mais discriminatória, para melhor caracterizar a extensão do problema.

PALAVRAS-CHAVE – *Pseudomonas aeruginosa*, Tipagem molecular, metalo-β-lactamase.

SUMMARY – Pseudomonas aeruginosa *is an opportunistic pathogen that presents a high-level resistance to many antibiotics, and is usually isolated with the ability to produce metallo-β-lactamase (MBLs), who is an enzyme with activity against many β-lactams antibiotics, as cefamicins and carbapenems. The aim of this study was to confirm, using molecular typing, the presence of* Pseudomonas aeruginosa *strains producing MBLs, that was previously investigated by phenotipic methods. A total of 250 non-repetitive strains of* Pseudomonas aeruginosa *identified by routine techniques was examinated. It was considered to analysis the strains that showed antibiotics multiresistance, with the increased sensibility to imipenem (inibition zone<16mm) and ceftazidime (inibition zone<18mm). These strains were screened for MBLs production using the double disk diffusion test and the E-test® standardized to MBLs detection and confirmed by the PCR molecular test. The results were a cross resistance 37/250 (14.8%) to imipenem/ceftazidime and (8/250) 3.2% of positivity to MBLs producers and among them 75% was characterized as SPM-1 gene and 25% as IMP-1 gene. The detection of SPM-1 gene (specific gene recently characterized at São Paulo) is important by the lack of epidemiologic correlation with our isolates. Our findings indicate an emerging problem, with important therapeutic implications and this fact needs further investigation including the use of molecular methodologies to fully characterize the extent of the problem.*

KEYWORDS – Pseudomonas aeruginosa*, molecular typing, metallo-β-lactamase.*

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete Gram-negativo ubíqüo, de vida livre e muito encontrado em ambientes úmidos, como água, solo, plantas e detritos. Embora raramente possa causar patologias em indivíduos sadios, essa bactéria é uma grande ameaça a pacientes hospitalizados, particularmente, aqueles com sérias doenças de base (Dubois *et al*, 2001). Trata-se de um patógeno oportunista causador de bacteremias em pacientes imuno-comprometidos, vítimas de queimaduras, com infecções urinárias associadas ao uso de catéteres e pneumonias hospitalares, particularmente, em Unidades de Terapia Intensiva (Pollack, 2000; Tsakris *et al*, 2000).

A importância clínica dos bacilos Gram-negativos não-fermentadores tem aumentado significativamente, devido à gravidade das infecções, as altas taxas de morbi-mortalidade em pacientes hospitalizados e ao grande índice de resistência. Uma das características

Recebido em 9/4/2003
Aprovado em 11/8/2003
*Prêmio NEWPROV, XXX CBAC, Rio de Janeiro, RJ
*Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Medicina Tropical /UFPB, e no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - LEMC/UNIFESP
[1]Professor de Microbiologia Clínica. Dep. de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB. Doutor em Microbiologia;
[2]Professora de Microbiologia/DFP/UFPB;[3] Bolsista do PIBIC/UFPB/CNPq;[4] Mestranda do LEMC/UNIFESP

da *P. aeruginosa* é seu alto nível de resistência intrínseca a agentes antimicrobianos estruturalmente diferentes. Devido ao seu largo espectro de atividade e a estabilidade à hidrólise pela maioria das β-lactamases, os carbapenens têm sido considerados as drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes às cefalosporinas (Bradley *et al*, 1999).

Bactérias Gram-negativas resistentes ao carbapenem, incluindo linhagens de enterobactérias e de *P. aeruginosa,* têm sido isoladas freqüentemente, com capacidade de produzirem metalo-β-lactamases (MBLs), que são enzimas com atividade sobre vários β-lactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenens e, ainda, sobre os inibidores de b-lactâmicos, como ácido clavulânico e sulbactam (Bush *et al*, 1995; Arakawa *et al*, 2000). Como dentro da classe dos antibióticos β-lactâmicos, os carbapenens são os que possuem o mais amplo espectro de atividade, amostras de *P. aeruginosa* resistentes a esses agentes devem ser registradas (Cardoso *et al*, 1999).

Baseado em estudos moleculares enzimas de dois grupos com capacidade de hidrolizar os carbapenens têm sido descritas: enzimas que possuem a serina como sítio ativo (classes A, C e D) e enzimas que requerem cátions divalentes como co-fatores para sua atividade enzimática e são denominadas metalo-β-lactamases (classe B), que podem ser inibidas por íons de metais quelantes como o EDTA ou compostos tiólicos (Watanabe *et al*, 1991; Rasmussen e Bush, 1997; Bush, 1998).

As MBLs pertencem ao grupo 3 das β-lactamases de espectro ampliado, fazendo parte de uma classe funcional comum de metaloenzimas classificadas com base em sua habilidade de hidrolizar o imipenem em um nível mensurável, assim como sua suscetibilidade aos inibidores de β-lactamases disponíveis comercialmente (Rasmussen e Bush, 1997; Bush, 1998).

Dentro da classe B das metaloenzimas duas β-lactamases que hidrolizam o carbapenem foram, inicialmente, caracterizadas: IMP-1, a primeira MBL descrita, no Japão, em *P. aeruginosa* (Watanabe *et al*, 1991) e VIM-1. Ambas as enzimas possuem uma ampla diversidade de substrato para hidrólise que inclui: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, e carbapenens, mas não atingem os monobactâmicos (Bush, 2001). Recentemente, houve a descoberta de um terceiro tipo de enzima: a VIM-2, a qual apresenta 90% dos aminoácidos idênticos à VIM-1. As amostras de *P. aeruginosa* produtoras das MBLs VIM-1 ou VIM-2 são susceptíveis apenas ao aztreonam e resistentes à maioria dos aminoglicosídeos, o que limita a escolha de drogas eficazes no uso clínico (Poirel *et al*, 2000). Existindo ainda outras variantes identificadas na Ásia e em outras regiões, como é o caso da VIM-3 em Taiwan (Yan *et al*, 2001).

A propagação e a disseminação desse tipo de microrganismo têm sido confirmadas em vários locais, tais como: Japão, Itália, Cingapura, Inglaterra, Portugal, Grécia, Taiwan e França (Woodford *et al*, 1998; Cardoso *et al*, 1999; Cornaglia *et al*, 1999; Koh *et al*, 1999; Poirel *et al* 2000; Tsakis *et al*, 2000; Yan *et al*, 2001). No Brasil, foram isoladas as primeiras amostras no Hospital Universitário do Rio de Janeiro, havendo registros também na região nordeste, na cidade de João Pessoa e em São Paulo (Pellegrino *et al*, 2001; Santos Fº *et al*, 2002; Tolleman *et al*, 2002), inclusive, com a caracterização bioquímica e molecular de uma nova MBL, diferente daquelas classificadas como VIM e IMP, obtida de uma amostra isolada na cidade de São Paulo e denominada SPM-1, que constitui uma nova sub-família com características próprias (Murphy *et al*, 2003).

Como os produtores de MBLs tendem a demonstrar resistência a drogas β-lactâmicas de amplo espectro, sua detecção preliminar é importante para o controle de infecções e orientação adequada da terapêutica (Bush, 1998). Arakawa e cols. (2000) testaram vários produtos químicos inibidores das MBLs, estabelecendo um método conveniente de difusão com duplo disco para a triagem de bactérias produtoras de MBLs, através do uso do ácido 2-mercapto propiônico (2-MPA). No entanto, seu uso é limitado devido à sua alta volatilidade, utilizando-se em seu lugar, o mercaptoacetato de sódio (Shibata *et al*, 2001).

Com esta finalidade, a análise por reação de cadeia de polimerase (PCR) é a técnica mais adequada e satisfatória para a confirmação de amostras MBL-positivas. No entanto, este método tem seu uso prático limitado em virtude do elevado custo (Senda *et al*, 1996; Arakawa *et al*, 2000), sendo necessário portanto, um método simples, específico e de baixo custo que possa ser utilizado em rotina (Nakajima *et al*, 2001).

A ceftazidima mostrou-se o substrato mais adequado para o teste de detecção de produtores MBLs (IMP-1), por apresentarem usualmente, altos níveis de resistência à ceftazidima (MIC>64μg/mL) e pelo fato do efeito inibitório dos compostos tiólicos serem bem visíveis (Arakawa, 2000). Para outros tipos de teste, ou quando se tenta detectar diferentes MBLs, outros substratos podem apresentar melhor desempenho.

O presente estudo teve por objetivo:

1 - Comparar os métodos de detecção fenotípicos de *P. aeruginosa* produtoras de MBLs pela técnica de dupla difusão utilizando discos de ceftazidima, imipenem e meropenem associados a discos contendo mercaptoacetato de sódio (SMA), e pelo método do E-test®, para determinação de metalo β-lactamases, no qual se utiliza o imipenem associado ao EDTA em um gradiente pré-definido;

2- Confirmar, por tipagem molecular (PCR), a produção de MBLs por amostras de *P. aeruginosa*, já caracterizadas fenotipicamente;

3- Identificar, através da tipagem molecular, a presença em nosso meio de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBLs, contendo o gene SPM-1, recentemente caracterizado no Brasil.

METODOLOGIA

Foi utilizado um total de 250 amostras não repetitivas de *Pseudomonas aeruginosa* de origem comunitária e hospitalar, identificadas por métodos de rotina. Realizaram-se testes de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão com discos, utilizando-se critérios aprovados pelo NCCLS (1999) e antimicrobianos de uso corrente. Considerou-se para análise as cepas que mostraram perfil de resistência elevado, com diminuição de sensibilidade ao imipenem (halo<16mm) e à ceftazidima (halo<18mm).

Métodos fenotípicos

A detecção presuntiva de amostras produtoras de MBLs foi realizada por dois métodos fenotípicos:

a) Dupla difusão com discos em superfície de agar -

utilizando-se discos de ceftazidima, imipenem e meropenem associados a discos padronizados contendo mercaptoacetato de sódio (SMA), obtendo-se zonas de inibição próximas aos discos nos casos positivos (Nakajima *et al*, 2001; Santos F[0] *et al*, 2002).

A dupla difusão com discos consiste em diluir a amostra de *Pseudomonas aeruginosa* em caldo de Mueller-Hinton para se obter uma concentração aproximada de 10^6 UFC/mL, sendo então espalhada em uma placa de Petri (10mmx100mm), contendo Agar Mueller-Hinton (Oxoid) de acordo com o protocolo do NCCLS (1999). Dois discos comerciais de ceftazidima (Oxoid), contendo respectivamente 30mg, foram então colocados sobre a placa inoculada. A distância entre os discos foi de aproximadamente 30mm. Um disco padronizado contendo 3mg de mercaptoacetato de sódio (*SMA – Eiken Chemical, Japão*), foi colocado 15mm abaixo do segundo disco (Fig. 1). Essa mesma técnica foi aplicada aos discos de imipenem e meropenem (Oxoid) (Fig. 2). A amostra teste foi considerada produtora de MBL quando uma diferença de 5mm ou mais era observada entre os diâmetros da zona de inibição, comparando-se os dois discos de antibióticos (Nakajima *et al*, 2001).

b) Método E-test® - é constituído de uma fita padronizada para a detecção de MBLs utilizando imipenem associado ao EDTA em um gradiente pré-definido (Bolmström *et al*, 2000, Walsh *et al*, 2002).

O E-test MBL® consiste em uma fita plástica (5x60mm) calibrada com uma escala de leitura de MIC graduada em µg/mL e impressa em um dos lados, enquanto na superfície reversa existem dois gradientes pré-definidos: IP (imipenem: 4-256µg/mL) e IPI (imipenem: 1-64µg/mL) associado ao EDTA em um nível constante (Fig. 3). O teste foi realizado pelo procedimento padrão adotado para o E-test® convencional e a leitura dos valores de IP e IPI são lidos no ponto de intersecção da elipse de inibição com a fita, sendo a positividade para MBL refletida pela redução da MIC de imipenem em três diluições logarítmicas (>3 $\log_2$) na presença do EDTA. Como não existe disponibilidade comercial de amostras-controle positivas (ATCC), uma amostra referência isolada no próprio laboratório, onde se realiza o teste e que apresente positividade, pode ser utilizada como controle positivo para comparar com novas cepas isoladas (Bolmström *et al*, 2000).

As amostras que demonstraram produção de MBLs, a partir da triagem com métodos fenotípicos, foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM), através do método de microdiluição em caldo recomendado pelo NCCLS (1999), e utilizando uma bateria padronizada de antimicrobianos (Tabela I).

TABELA I
Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) das amostras de *P. aeruginosa* submetidas à tipagem molecular por PCR

Drogas	11	32	07	05	22	35	27	21	ATCC 27853
ATM	4	>32	16	16	8	8	16	2	4
PTZ	256/4	>256/4	128/4	64/4	256/4	256/4	128/4	256/4	8/4
CAZ	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4
CPM	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	2
CRO	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	16
SAM	>64/32	>64/32	>64/32	>64/32	>64/32	>64/32	>64/32	>64/32	>64/32
CIP	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	0,5
COL	1	2	2	2	2	2	4	2	2
GAT	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	2
FOX	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
MER	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	0,25
GEN	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	4
IMI	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	2
AMI	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	≤ 8
CTX	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
CPD	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
CEF	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
NAL	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32

***ATM**=aztreonam; **PTZ**=piperacilina/tazobactam; **CAZ**=ceftazidima; **CPM**=cefepima; **CRO**=ceftriaxona; **SAM**=ampicilina/sulbactam; **CIP**=ciprofloxacina; **COL**=colistina; **AT**=gatifloxacina; **FOX**=cefoxitina; **MER**=meropenem; **GEN**=gentamicina; **IMI**=imipenem; **AMI**=amicacina; **CTX**=cefotaxima; **CPD**=cefpodoxima; **CEF**=cefalotina; **NAL**=acido nalidixico.*

Métodos moleculares

Para confirmação dos resultados observados nos testes fenotípicos, foi utilizada a técnica molecular de PCR.

a) Reação da polimerase em cadeia (*polimerase chain reaction* – PCR) - será utilizada para determinar a presença de genes responsáveis por resistência a antimicrobianos.

A extração do DNA foi realizada segundo protocolo padronizado. As amostras bacterianas foram subcultivadas em ágar Mueller-Hinton e, após isolamento em cultura pura, três colônias de cada amostra foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 200µl de água estéril, agitadas no vortex por 3 minutos. A seguir as amostras foram colocadas a 100°C por 20 minutos e, após este período, foram centrifugadas por 5 minutos a 3500 rpm em temperatura ambiente. A seguir 10µl do sobrenadante de cada uma das amostras foram utilizadas para a etapa de amplificação do DNA.

Utilizando técnica estéril, foram preparadas misturas "master" para cada reação contendo: H_2O deionizada, solução tampão NH_4Cl/50mM, tampão $MgCl_2$/15mM, tampão Tris-HCl pH 9.0/10mM, 2 µL de desoxinucleotídeo trifosfato (0,5µL de cada um: dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 1µL /2µL (primers) dos iniciadores da

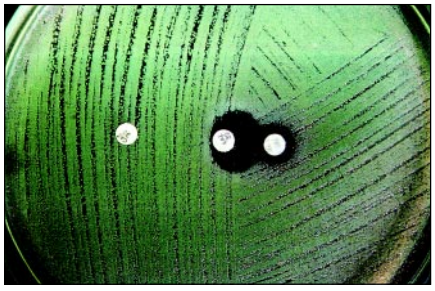


FIG. 1 - Detecção fenotípica de metalo β-lactamases pela técnica de disco aproximação, utilizando discos de ceftazidime e mercaptoacetato de sódio (SMA).

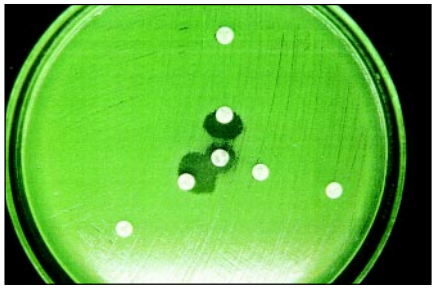


FIG. 2 - Técnica de disco aproximação utilizando imipenem, meropenem e ceftazidima associados ao disco de mercaptoacetato de sódio (SMA).

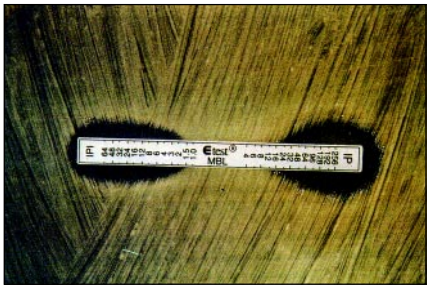


FIG. 3 - Detecção da produção de metalo β-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando o método E-test® MBL.

fita sentido "sense" e da fita "anti-sense" e 2,5 unidades por litro de Taq polimerase. Esta mistura "master" foi mantida a aproximadamente 4°C durante seu preparo e, após leve agitação, 90 mL foram transferidos para cada tubo de amplificação, ao qual será adicionado 10μL do inóculo.

As condições de termociclagem (Mastercycler Gradient 5331, Eppendorf) para a amplificação do gene *spm* foram as seguintes: cinco minutos a 95°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 95°C (desnaturação), um minuto a 40°C (anelamento), um minuto a 68°C (extensão). Para a amplificação do gene *imp* foram as seguintes: cinco minutos a 95°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação), seguidos por 35 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 61°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão).

Após a amplificação do DNA a revelação do produto foi obtida através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão tris ácido bórico/EDTA (pH 7,0). A corrida em gel de agarose foi feita durante 40 minutos a 120v e 40[A] e visualizados sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 ml/ml). Para a amplificação dos genes de MBLs foram utilizados os seguintes "primers":

bla_{IMP}	5′ CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC 3′ 3′ GAACAACCAGTTTTGCCTTACC 5′
bla_{SPM-1}	5′ CCTACAATCTAACGGCGACC 3′ 3′ TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 5′

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A disseminação de bactérias Gram-negativas com resistência adquirida a vários β-lactâmicos de amplo espectro está tornando-se um problema clínico mundial (Arakawa, 2000; Bush, 2001). A seleção de cepas de *P. aeruginosa* resistentes deve-se, dentre outras causas, ao uso indiscriminado de antibióticos, especialmente, no Japão onde os carbapenêmicos são líderes de mercado entre os antimicrobianos β-lactâmicos parenterais, em contraste com outras áreas geográficas, onde os carbapenens são usados em bases mais restritas (Rasmussen e Bush, 1997; Senda *et al*, 1996). A antibióticoterapia das infecções causadas por esta bactéria consiste, principalmente, no uso de ceftazidima, imipenem e amicacina (Cardoso *et al*, 1999; Dubois *et al*, 2001).

Em nossa amostragem foram caracterizadas na triagem preliminar um percentual de resistência de 58/250 (23,2%) ao imipenem e 52/250 (20,8%) a ceftazidima, dessas amostras 37/250 (14,8%) evidenciaram resistência cruzada aos dois antimicrobianos e padrão de multiresistência, com a detecção por técnicas fenotípicas de 07/250 (3,2%) linhagens que demonstraram produção de MBLs.

Entre as amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBLS 6/8 (75,0%) foram classificadas como SPM-1 (Fig. 4), enquanto 2/8 (25,0%) foram identificadas como IMP-1 (Fig. 5), através da técnica molecular de PCR.

Na Tabela I é apresentado o resultado da determinação da CIM das amostras submetidas à confirmação por método molecular (PCR), evidenciando-se o aspecto de multiresistência dessas amostras. Na Tabela II evidencia-se uma comparação entre os métodos fenotípicos e a respectiva confirmação com metodologia molecular, e apesar de não constituírem um resultado definitivo, a triagem preliminar é uma importante etapa na detecção preliminar das MBLs, constituindo-se em técnicas confiáveis e apropriadas para utilização em rotina laboratorial.

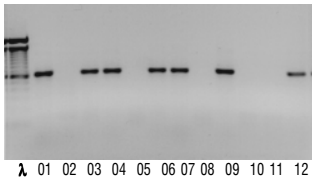


FIG. 4 - Resultado da eletroforese em gel de agarose de PCR na detecção de genes tipo SPM-1. λ marcador de peso molecular; 01Controle positivo SPM-1; 02 Controle negativo ATCC 27853 Positivo: lanes 03(22), 04(35), 06(21), 07(05), 09(32), 12(11). Negativo: lanes 05(27), 08 (07), 10(972), 11(741).

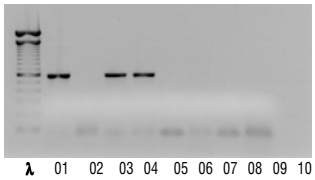


FIG. 5 - Resultado da eletroforese em gel de agarose de PCR na detecção de genes tipo IMP-1. λ marcador de peso molecular; 01 Controle positivo SPM-1; 02 Controle negativo ATCC 27853 Positivo: 03 (27), 04 (07); Negativo: 05 (972), 06 (741).

TABELA II
Comparação entre métodos fenotípicos e PCR na determinação da produção de MBLs em amostras de *P. aeruginosa*

Testes genotípicos x fenotípicos	Amostras bacterianas							
	11	32	07	05	22	35	27	21
SPM-1	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS
MP-1 sp	NR	NR	POS	NR	NR	NR	POS	NR
E-test®	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
SMA/CAZ	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
MBLs	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

***POS** = positivo; **NEG** = negativo; **NR** = não realizado*

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir:

- Houve uma correlação entre os dois métodos fenotípicos que por sua vez demonstraram concordância com o método molecular (PCR). Configurando-se assim em métodos simples e específicos que podem ser utilizados como rotina.
- O registro dessas amostras no Brasil merece atenção especial no tocante à possibilidade do surgimento de novos casos, alterando a conduta terapêutica nessas infecções e servindo de alerta para motivar ações necessárias à prevenção contra a disseminação desses microrganismos.
- Como achado principal destacamos a presença de amostras com o gene SPM-1 em nosso meio, sem que haja um relacionamento epidemiológico com nossos isolamentos. Este fato aponta a possibilidade de caracterização das amostras pertencentes a um mesmo clone o que deverá ser obtido com métodos mais discriminatórios como o "Pulsed field gel eletrophoresis" (PFGE).
- Apesar da existência de correlação entre os métodos fenotípicos e moleculares, as amostras devem ser remetidas aos laboratórios de referência para confirmação genotípica.

A detecção dessas amostras se configura um problema emergente, com importantes implicações na terapêutica antimicrobiana e necessitando, portanto, de maior investigação através de metodologia molecular mais discriminatória, para melhor caracterizar a extensão do problema.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Kazuhiro Nakajima (*Microbiological Reagents Dept., Eiken Chemical Co. Japan*) que gentilmente nos cedeu os discos padronizados de Mercaptoacetato de Sódio (SMA).

À Probac do Brasil pelo fornecimento das fitas E-test MBL® utilizadas no estudo comparativo.

Ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC/UNIFESP) pelo apoio na realização dos métodos moleculares de PCR.

REFERÊNCIAS

1. **Arakawa Y., Shibata, N., Shibayama, K. *et al.*** Convenient test for screening metallo-β-lactamase- producing Gram negative bacteria by using thiol compounds. *J.Clin. Microbiol*. 38: 40-43, 2000.
2. **Arakawa, Y., Shibata, N., Doi, Y. *et al*.** Detection of VIM-2 metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas* by thiol compounds in Japan. Abstract A-101. In: *101th ASM General Meeting*, Orlando, Fla, 2001.
3. **Bolmström, A., Qwärnström, A., Gales, A. *et al*.,** Evaluation of a new E-test to detect metallo β-lactamases (MBL) in routine clinical testing. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (ICAAC) poster nº 1615, 2000.
4. **Bradley, J. S., Garau, H., Lode, K.V., *et al*.** Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. Int. *J. Antimicrob. Agents*. 11: 93-100, 1999.
5. **Bush, K.** Metallo-β-lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis*. 27: S48-S53, 1998.
6. **Bush, K.** New β-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infect. Dis*. 32:1085 – 1089, 2001.
7. **Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A.** A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39: 1211-1233, 1995.
8. **Cardoso, O., Souza, J. C., Leitão, R. *et al*.** Carbapenem-hidrolozing from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Portugal *J. Antimicrob. Chemother*. 44: 135-138, 1999.
9. **Cornaglia, G., Riccio, M. L., Mazzariol, *et al*.** Appearance of IMP-1 metallo-β-lactamase in Europe. *Lancet*, 353: 899-900, 1999.
10. **Dubois, V.; Arpin, C.; Melon, M. *et al*.** Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime – Amikacin therapy and analysis of β-lactam resistance. *J. Clin. Microbiol*. 39: 2072-2078, 2001.
11. **Koh, T. H., Babini, N., Woodford, N. *et al*.** Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *Lancet*, 353: 2162-2164, 1999.
12. **Murphy, T. A., Simm, A.M. Toleman, M. A. *et al*.** Biochemical characterization of acquired metallo-β-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 47: 582 – 587, 2003.
13. **Nakajima, K., Sadamoto, S., Ikdo, M. *et al.*** Disk diffusion and microdilution tests for screening metallo-β-lactamase producing bactéria. Abstract C-287. In: *101th ASM General Metting,* Orlando FLA, 2001.
14. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, PA. 1999.
15. **Pellegrino, F. L. P., Moreira, B. M., Nouér, S. A. *et al.*** Antimicrobial resistance and genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro, Abstract L-14. In: *101th ASM General Metting,* Orlando FLA, 2001.
16. **Poirel, L., Naas, D., Nicolas, L., *et al.*** Characterizationof VIM-2 carbapenem-hidrolyzing metallo-β-lactamase, and its plamid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother*. 44: 891-897, 2000.
17. **Pollack, M.** *Pseudomonas aeruginosa*. **In: G. L. Mandell, J. E. Bennett and R. Dolin** (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th Ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, p. 2310-2335, 2000.
18. **Rasmussen, B. A., Bush, K.** Carbapenem-hidrolizing β lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 41: 223-231, 1997.
19. **Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K. *et al.*** PCR detection of metallo-β-lactamase gene ([bla]IMP) in Gram negative rods resistant to broad-spectrum b-lactams. *J. Clin. Microbiol*. 34: 2909-2913, 1996.
20. **Santos Fº, L., Santos, I. B., Assis, A. L. M. *et al*,** Determinação da produção de metalo β-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, PB *J. Bras. Patol. e Med. Laborat*. 38: 79 – 84, 2002.
21. **Shibata, N., Doi, Y., Komatsu, M. *et al.*** Molecular epidemiology of metallo-β-lactamase among Gram-negative rods detected by thiol compounds in Japan. Abstract C-524. In: *101th ASM General Metting*, Orlando FLA, 2001.
22. **Toleman, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C. *et al.*** Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother*. 50: 673 – 679, 2002.
23. **Tsakis, A., Pournaras, S., Woodford, N. *et al.*** Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J.Clin. Microbiol*. 38: 1290-1292, 2000.
24. **Yan. J.J., Hsueh, P. R., Ko, W.C. *et al.*** Metallo-β-lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-2 enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2224 –2228, 2001.
25. **Walh, T.R., Bolmström A., Wärnström, A., Gales, A.** Evaluation of E-test® for detecting metallo-β-lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol*. 40: 2755 – 2759, 2002.
26. **Watanabe, M., Itobe, S., Inoue, M. *et al*.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother*. 35: 147-151, 1991.
27. **Wooddford, N., Palepou, M. F., Babini, G. S. *et al*.** Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in UK. *Lancet*, 352: 546-547, 1998.

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

Aos professores de análises clínicas

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC, é uma sociedade científica que tem por finalidade congregar profissionais analistas clínicos de diferentes formações profissionais.

Os professores de Análises Clínicas, não têm entidade constituída, (o que não acontece com outras profissões liberais) onde possam se reunir, discutir os assuntos sobre ensino e, principalmente, apresentar as reivindicações necessárias ao adequado desenvolvimento profissional.

*A SBAC é a sociedade que pode congregar esta classe e servir como fórum de discussões e reivindicações. Além desta possibilidade, a SBAC oferece aos associados à Revista Brasileira de Análises Clínicas – RBAC indexada (ISSN 0370-369x e LILACS) com divulgação internacional, periodicidade trimestral, tendo formato científico voltado à divulgação de trabalhos científicos de pesquisa e o **SBAC Jornal** (40.000 exemplares), voltado para artigos de atualização, reciclagem profissional e informações gerais sobre a Sociedade e produtos de laboratório.*

Descontos especiais são oferecidos habitualmente na inscrição para os congressos brasileiros, além de premiação para os melhores trabalhos (temas livres) desenvolvidos em diversas áreas e cuja regulamentação encontra-se divulgada na Revista Brasileira de Análises Clínicas.

Atividade antimicrobiana da Linezolida frente a cocos Gram-positivos isolados no Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS*

Antimicrobial activity of Linezolid against Gram-positive cocci isolated in Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS

Roberto Christ Vianna Santos; Jairo Luís Hoerlle & Alzira Resende do Carmo Aquino

RESUMO – A Linezolida é a primeira droga de uma nova classe de antimicrobianos, as Oxazolidinonas, que apresentam ampla atividade *in vitro* contra uma grande gama de patógenos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. e *Streptococcus pneumoniae*. Foram estudadas 81 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 a agosto de 2002. Os microorganismos gram-positivos mais freqüentemente encontrados foram *Staphylococcus* sp. Coagulase negativa (33,3%), *Staphylococcus aureus* (32,1%) e *Streptococcus* sp. (16,1%). A Linezolida, Vancomicina e Teicoplanina foram as drogas que tiveram 100% de atividade frente aos cocos Gram-positivos testados. A excelente atividade *in vitro* apresentada pela Linezolida neste estudo, pode representar uma importante opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por cocos Gram-positivos.

PALAVRAS-CHAVE – Atividade de Linezolida, cocos Gram-positivos.

SUMMARY *– The Linezolid is the first drug from a new class of antimicrobial agents, the Oxazolidinons, that presents extensive activity* in vitro *against a variety of Gram-positive pathogens, as* Staphylococcus aureus*,* Enterococcus *spp. and* Streptococcus pneumoniae*. It had been studied 81 clinical samples from in-patients at the Hospital Divina Providência, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, from april to august, 2002. The Gram-positive more frequently found had been* Staphylococcus *spp. (33.3%),* Staphylococcus aureus *(32.1%) and* Streptococcus *spp. (16.1%). The Linezolid, Vancomicin and Teicoplanin had been the drugs with 100% of activity to the Gram-positive cocci tested. The excellent activity* in vitro *presented by the Linezolida in this study, can represent an important therapeutical option for the treatment of Gram-positive infections.*

KEYWORDS *– Activity of Linezolid, Gram-positive cocci.*

INTRODUÇÃO

As oxazolidinonas, que são uma nova classe de antimicrobianos, foram descritas inicialmente em 1987[1] e a Linezolida foi o primeiro composto desta classe a ser aprovado para uso clínico pelo *Food and Drug Administration (FDA)* em 2000[2]. As indicações para o uso desta droga incluem tanto infecções comunitárias quanto infecções nosocomiais, sendo utilizada para tratamento de pneumonias, lesões de pele e infecções de tecidos moles.

A Linezolida apresenta alta atividade *in vitro* contra uma grande gama de patógenos Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* (inclusive o Oxacilina-resistente), *Enterococcus* sp. (incluindo o Vancomicina-resistente) e *Streptococcus pneumoniae* (incluindo a Penicilina-resistente). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica bacteriana, através de sua ligação à subunidade 50S, distorcendo o local de ligação do tRNA, impedindo a formação do complexo de iniciação[3].

A Linezolida é capaz de penetrar na membrana de microrganismos Gram-negativos mas é rapidamente eliminada da célula bacteriana através da bomba de efluxo[4], razão pela qual a Linezolida não possui a aprovação do FDA para uso em infecções causadas por Gram-negativos[2].

Considerando que a obtenção de informações locais sobre a sensibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos utilizados é de grande importância para uma melhor monitorização e otimização do tratamento, este trabalho tem por objetivo determinar atividade antimicrobiana da Linezolida frente a cocos Gram-positivos isolados no Hospital Divina Providência de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas 81 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 a agosto de 2002. As amostras foram coradas pelo Gram e isoladas através da inoculação primária em ágar Sangue de carneiro 5% (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Posteriormente ao desenvolvimento em placa, as bactérias foram diferenciadas em *Staphylococcus* ou *Streptococcus* através do teste da catalase. A coagulase em tubo foi o teste realizado para a identificação do *Staphylococcus aureus* e o teste de resistência ao disco de novobiocina 5mg (Laborclin Brasil) foi utilizado para a identificação do *Staphylococcus saprophyticus*. O crescimento nos meios de SF (Laborclin Brasil) e da Bilesculina (Laborclin Brasil) foram utilizados para a identificação do *Enterococcus sp*. Foram realizados testes de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e utilizados discos de antimicrobianos: Penicilina, Ampicilina, Clindamicina, Oxacilina, Eritromicina, Vancomicina, Teicoplanina e Linezolida (Oxoid, Basin-

Recebido em 27/12/2002
Aprovado em 20/2/2003
* Trabalho desenvolvido no Laboratório Unidos de Pesquisas Clínicas Ltda - Unilab.

TABELA I
Local de isolamento de cocos gram-positivos

	Hemo-cultura	Trato urinário	Trato respiratório	Secreção ocular	Ferida operatória	Total
Streptococcus sp.	4	7	1	0	1	13
S. saprophyticus	0	9	0	0	0	9
Staphylococcus sp. coag neg.	7	4	7	3	6	27
Enterococcus sp.	0	3	0	0	3	6
S. aureus	1	2	13	0	10	26
Total	12	25	21	3	20	81

TABELA II
Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados no HDP, 2002

	Oxacilina-Resistente (ORSA) %	Oxacilina-Sensível (OSSA) %
Ampicilina	0	25
Penicilina	0	16.66
Clindamicina	0	83.33
Vancomicina	100	100
Teicoplanina	100	100
Linezolida	100	100

gstoke, Hampshire, England). Foram adotados os critérios recomendados pelo NCCLS (1998)[5] e foi realizado o controle de qualidade através da utilização de cepas da *American Type Culture Collection (ATCC)* de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

RESULTADOS

Os microrganismos Gram-positivos mais freqüentemente encontrados e o seu local de isolamento, durante o período deste estudo, foram *Staphylococcus* sp. coagulase negativa (33,3%), *Staphylococcus aureus* (32,1%) e *Streptococcus* sp. (16,1%). Das 81 amostras isoladas, 12 foram isoladas de hemoculturas, 21 de infecções do trato respiratório, 25 de trato urinário e 20 de ferida operatória, como pode ser verificado na Tabela I.

A Linezolida, Vancomicina e Teicoplanina foram as drogas que tiveram 100% de atividade frente aos cocos Gram-positivos testados, como pode ser visto da Figura 1. Dos *Staphylococcus aureus* isolados, 53,8% foram resistentes à Oxacilina (ORSA) e apresentaram resistência à Penicilina e Ampicilina, confirmando a resistência à Beta-lactâmicos, com pode ser visto na Tabela II.

DISCUSSÃO

As oxazolidinonas representam uma nova classe de agentes antimicrobianos que possuem excelente atividade contra Gram-positivos. A Linezolida é a primeira droga representante desta classe aprovada para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. e *Streptococcus pneumoniae*.

Os glicopeptídeos Vancomicina e Teicoplanina, continuam sendo a terapia de referência para infecções graves causadas por Gram-positivos[8]. Atualmente, cepas com crescente resistência frente à Teicoplanina estão sendo reportadas na Europa e Estados Unidos[9]. Resistência à Vancomicina é incomum, mas níveis de resistência de *Staphylococcus aureus* têm sido recentemente reportados nos Estados Unidos e Japão[10].

Em nosso estudo, não encontramos nenhuma cepa resistente à Linezolida, Vancomicina e Teicoplanina, pois estes agentes antimicrobianos apresentaram 100% de atividade frente aos cocos Gram-positivos. Os microrganismos mais freqüentemente isolados durante o período de estudo foram: *Staphylococcus* sp. (33,3%), *Staphylococcus aureus* (32,1%) e *Streptococcus sp.* (16,1%). Das 81 amostras clínicas isoladas, 12 foram isoladas de hemoculturas, 21 de infecções do trato respiratório, 25 de trato urinário e 20 de ferida operatória. Dos *Staphylococcus aureus* isolados, 53,8% foram resistentes à Oxacilina (ORSA).

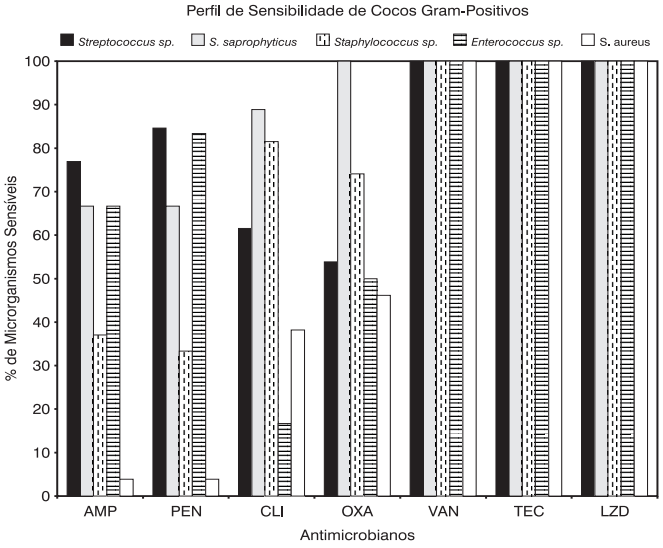


FIG. 1 - Sensibilidade de diferentes microrganismos frente à Ampicilina (AMP), Penicilina (PEN), Clindamicina (CLI), Oxacilina (OXA), Vancomicina (VAN) e Teicoplanina.

Apesar dos grandes avanços na terapia antimicrobiana, a resistência em patógenos Gram-positivos continua a aumentar, principalmente em relação à drogas comumente utilizadas na prática médica. Este estudo demonstrou que a Linezolida vem a ser um importante agente antimicrobiano no combate a este problema e pode se tornar uma interessante alternativa a agentes glicopeptídeos[7]. O laboratório de bacteriologia deve estar em alerta para o aparecimento de isolados clínicos resistentes à Linezolida, para iniciar os procedimentos de confirmação e comunicação destes resultados, da mesma maneira como é realizado para o *Enterococcus* resistente à Vancomicina e para o *Staphylococcus aureus,* intermediário à Vancomicina[6].

REFERÊNCIAS

1. **Slee, A. M. *et al.*** Oxazolidinones, a new class of sinthetic antibacterial agents: *in vitro* activities of DuP 105 and Du 721. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1791-1797, 1987.
2. **Ford, C.; Hamel, J.; Stapert, D.; Moerman, J.; Hutchinson, D.; Barbachyn, M.; Zurenco, G.** *Infect. Med.*16, 435, 1999.
3. **Swaney, SM.; Aoki, H.; Ganoza, M. C. *et al.*** The Oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein syntesis in bacteria. *Atimicrob. Agents Chemother.* 42:1-5, 1998.
4. **Zabransky, R. J.; Shaker, H.** Linezolid: the first of a new class of antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Newsletter.* 24(4):25-30, 2002.
5. **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.
6. **Fridkin, S. K.** Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clinical and Infectious Disease.* 32:108-115, 2001.
7. **Stevens, D. L.; Herr, D.; Lampiris, H.; Hunt, J. L.; Batts, D. H.; *et al.*** Linezolid versus Vancomycin for the treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infections. *CID.* 34:1481-1490, 2002.
8. **Sader, H.; Gales, A. C.; Jones, R. N.** Antimicrobial activity of Linezolid against Gram-positive cocci isolated in Brazil. *BID.* 2001, 5(4):171-176.
9. **Cormican, M. G.; Jones, R. N.** Emergin resistance to antimicrobial agents in Gram-positive bacteria. *Drugs.* 51(1):6-12, 1996.
10. **Jones, R. N.; Barrett, M. S.; Erwin, M. E.** *In vitro* activity and spectrum of LY333326, a novel glycopeptide derivative. *Antimicob. Agents Chemother.* 41:488-91, 1997.

Endereço para correspondência
Roberto Christ Vianna Santos
Laboratório Unilab - Rua da Gruta, 145 - Glória - 91712-160 - Porto Alegre - RS
Fone/Fax: (0xx51)3318 4389 - E-mail: roberto@unifra.com.br

Citometria de Fluxo, imunocitoquímica e Western Blot na detecção da expressão da proteína p53 em células tumorais: uma análise comparativa*

Flow cytometry, immunocytochemistry and Western Blot in measurement of p53 protein expression in tumor cells: a comparative analysis

Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc)[1], Marcos Antonio Mauricio Scheiner (MSc)[2], José Gustavo Pugliese de Oliveira[3], Flavia da Cunha Vasconcelos[4], Ana Carolina dos Santos Ferreira[5] & Raquel C. Maia (MD, PhD)[6]

RESUMO – **Introdução e Objetivos:** p53 é a proteína cuja função é crucial no controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose de células geneticamente instáveis. O Western Blot (WB) e a imunocitoquímica (ICQ) são atualmente os métodos de detecção mais empregados da proteína p53, se tratando, porém de técnicas de execução demorada e trabalhosa. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia rápida para detecção e quantificação da proteína p53 em células tumorais através da citometria de fluxo (CF). **Material e Métodos:** Empregou-se 14 linhagens de células tumorais humanas: Namalva, Raji e Daudi (linfoma de Burkitt), C91 e MT-2 (leucemia de células T do adulto), Jurkat (leucemia linfoblástica de células T), HL-60 (leucemia promielocítica), HT-29 (adenocarcinoma de Colon), GLC-4 (carcinoma de pulmão), MCF-7 (carcinoma de mama), H460 e H460/bcl-2 (carcinoma de células não pequenas de pulmão), K562 e Lucena (leucemia mielóide crônica em crise blástica) e C6 (astrocitoma originária de rato). Paralelamente, linfócitos provenientes de 36 indivíduos sadios serviram como controle da reação negativa. A ICQ foi realizada pelo método da imunoperoxidase indireta, a CF por marcação direta com anticorpo monoclonal anti-p53 diretamente conjugado ao isotiocianato de fluoresceína após permeabilização celular e o WB através do método padrão. A quantificação antigênica foi realizada através da média de intensidade de fluorescência na CF e densitometria no WB. **Resultados:** Observou-se uma correlação direta entre os resultados da CF, WB e ICQ, com expressão positiva nas linhagens Namalva, Raji, HT-29, GLC-4, MT-2, C91pl, MCF-7, H460 e H460/bcl-2 e negativa nas demais linhagens e em todas as células do grupo controle. A ICQ foi eficaz na demonstração da presença da p53 no núcleo da célula e a CF e WB permitiram também a quantificação antigênica, evidenciando células com variados níveis de expressão antigênica. A CF quando comparada ao WB apresentou maior sensibilidade. **Conclusões:** Nossos resultados mostraram que a proteína p53 pode ser detectada em células tumorais através da CF. Esta metodologia é eficaz, sensível e prática, podendo ser empregada rotineiramente em estudos de expressão da proteína p53 em células tumorias.

PALAVRAS-CHAVE – Proteína p53, citometria de fluxo, imunocitoquímica, Western Blot e células tumorais.

SUMMARY *– **Introduction and Objective:** p53 is a protein with a crucial role in the cell cycle control, DNA damage repair and induction of apoptosis in genetically unstable cells. Over 50% of all human cancers contain a mutation in the p53 gene and an overexpression of p53 protein. The Western Blot (WB) and Immunocytochemistry (ICC) are the most used methods to detect p53 protein, but they both have the disadvantage of requiring lots of time to be executed. The objective of this study is to describe a faster and more reliable methodology to detect and quantify p53 in tumor cells by flow cytometry (FC). **Methods:** Fourteen human tumor cell lines including: Namalva, Raji and Daudi (Burkitt lymphoma); C91pl and MT2 (adult T-cell leukemia); Jurkat (T-cell lymphoblastic leukemia); HL-60 (Acute Promielocytic Leukemia); HT-29 (colon adenocarcinoma); GLC-4 (lung carcinoma); H460 and H460/bcl-2 (lung non small cells carcinoma); MCF-7 (breast carcinoma); K562 and Lucena (chronic myeloid leukemia in blastic crisis) and C6 (derived from rat astrocytoma) were used in this study. As a negative control, we used 36 samples from healthy donors. The ICC method was performed by indirect immunoperoxidase technique, the FC by FITC monoclonal antibody after cell permeabilization and the WB by standard methodology. The antigenic quantification was performed by the measurement of mean of the fluorescence intensity in FC and by densitometry in the WB. **Results:** A positive correlation between the FC, ICC and WB results for positive p53 expression in Raji, Namalva, GLC-4, MT-2, C-91pl, HT-29, MCF-7, H460 and H460/bcl-2 was found. The other samples including the control ones were negative for p53 expression in all methods. The ICC method was useful to show the presence of p53 in the cell nucleous and WB and FC also allowed an antigenic quantification, showing cells with many different levels of antigenic expression, but FC quantification was shown to be more sensitive when compared to WB data. **Conclusion**: Our results show that p53 can be detected in tumor cells by FC. This technique is sensitive, practical and reliable, allowing its routine usage in p53 expression studies with cancer cells.*

KEYWORDS *– p53 protein, Flow Cytometry, Imunocytochemistry, Western Blot and tumor cells.*

INTRODUÇÃO

A superexpressão da oncoproteína p53 é um achado comum na maioria das neoplasias humanas, estando freqüentemente associada com um prognóstico desfavorável em diversos tipos de neoplasias malignas, tais como câncer de mama, pulmão, cólon e uma variedade de hemopatias malignas [1-12].

A proteína p53 é uma fosfoproteína de 53 kD, codificada pelo gene supressor tumoral p53, localizado na

Recebido em 8/4/2003
Aprovado em 31/7/2003
*Prêmio SBAC - XXX CBAC, 2003, Rio de Janeiro, RJ

*Trabalho realizado no Lab. de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer (LHCM/HC-I/INCA/RJ).
[1]Farmacêutico–Bioquímico e Prof. Ass. da Disciplina de Imunologia Clínica do Depto. de Anál. Clínicas e Toxicológicas da UFRN (DACT/UFRN) e Doutorando do LHCM/HC-I/INCA/RJ; [2]Farmacêutico-Bioquímico do LHCM/HC-I/INCA/RJ; [3]Aluno da graduação da Fac. de Ciências Méd./UERJ e estagiário de iniciação científica do LHCM/HC-I/INCA/RJ; [4]Bióloga do LHCM/HC-I/INCA/RJ; [5]Aluna do CEFET-RJ e estagiária do LHCM/HC-I/INCA/RJ; [6]Médica Hematologista e responsável pelo LHCM/HC-I/ INCA/RJ.

região 13p do braço curto do cromossomo 17 [2, 13-17]. A principal função desta proteína é o controle do ciclo celular, possibilitando o reparo do DNA alterado e, dependendo da extensão da lesão, induzindo a apoptose de células geneticamente instáveis, mantendo desta forma a integridade do genoma[2,13-19].

A mutação do gene p53 ou inativação do seu produto de transcrição tem sido descrita como a alteração genética mais observada nas neoplasias malignas, levando freqüentemente à estabilização e superexpressão da proteína p53 no núcleo das células neoplásicas[2-6,16-19].

A proteína p53 funcional (selvagem ou *wild-type*) encontra-se normalmente no núcleo das células, apresentando meia vida curta, não sendo detectada na maioria dos tecidos normais[5-8,19-20]. Em contraste, a forma mutada ou inativada apresenta uma maior estabilização, sendo possível sua detecção por técnicas imunológicas por meio de anticorpos monoclonais (AcMo) anti-p53 utilizados nos métodos da imunohistoquímica[19-20] imunocitoquímica (ICQ)[19-20], Western Blot (WB)[19-22,25] e mais recentemente a citometria de fluxo (CF)[11,19,23,24,25].

A ICQ é um método de avaliação da expressão de antígenos e tem como vantagem a correlação dos resultados obtidos com a análise citomorfológica e a identificação precisa da localização da proteína na célula[19-20]. A técnica utiliza células em suspensão ou *imprint* de tecidos previamente fixados em lâminas que são submetidas à permeabilização e em seguida, incubadas com AcMo. A presença da proteína é revelada por meio da adição do anticorpo secundário com especificidade contra a fração constante (FC) da imunoglobulina de camundongo, estando conjugado a um substrato revelador que pode ser peroxidase ou fosfatase alcalina. A ICQ apresenta, como fator limitante, a rápida degradação da proteína, sendo necessário a preservação do material em baixa temperatura (-70^{0}C)[20,21].

O WB apresenta como característica, a alta resolução da eletroforese em gel de poliacrilamida aliada à especificidade da imunoquímica. Os componentes resultantes da separação eletroforética são transferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose, imediatamente após a corrida eletroforética, seguida da incubação com anticorpo primário (em geral AcMo) e de uma segunda incubação com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase. O sistema revelador contém uma substância que, ao reagir com o conjugado, emitirá luz. Essa membrana quando exposta a um filme radiográfico revela a presença das bandas antigênicas específicas para o AcMo em questão[22].

Embora o WB seja um método de alta especificidade e sensibilidade e, portanto a técnica é referida como "padrão ouro" para a detecção da proteína p53, além de demorada, apresenta muitas etapas de execução que dificultam sua aplicação, principalmente, em um número grande de amostras ficando o seu uso mais restrito aos trabalhos de pesquisa[20,22].

A CF tem se destacado como método de detecção de expressão de antígenos celulares de outras metodologias por ser uma técnica semi-automatizada, possibilitando a análise de um grande número de amostras em um tempo curto[23,24]. A CF apresenta ainda, como vantagem em relação à ICQ e ao WB, a possibilidade de analisar de forma multiparamétrica, permitindo a detecção de co-expressão de vários antígenos simultaneamente, bem como, a quantificação antigênica[18,23,24].

Células previamente marcadas com AcMo conjugados a fluorocromos são introduzidas no citômetro de fluxo. Dentro do equipamento, as células são conduzidas através de um fluxo de líquido isotônico até um compartimento denominado câmara de fluxo "*flow cell*". Nesse compartimento, um feixe de raios laser incide sobre cada célula individualmente. Ao incidir sobre a célula, uma fração, ou seja, uma parte da luz é bloqueada frontalmente (*Forward Scatter* ou FSC) e outra fração é dispersa lateralmente (*Side Scatter* ou SSC). A fração FSC é relativa ao tamanho da célula e a SSC representa a complexidade intracitoplasmática, que caracteriza a granulosidade interna[23,24,25].

Análises preliminares de (SSC x FSC) fornecem informações que identificam e separam populações celulares diferentes, distinguindo-as de acordo com tamanho e a complexidade interna[23,24,25]. Adicionalmente, ainda sob ação do raio laser, anticorpos conjugados a fluorocromos emitem sinais fluorescentes que são detectados por tubos fotomultiplicadores, convertendo a luz em sinais eletrônicos e possibilitando a detecção das células que reagiram positivamente para cada um dos anticorpos. Estes sinais fornecem resultados em forma de histogramas[23,24,25].

A CF pode ser utilizada como método de estudo da expressão da p53[26-28], com vantagem sobre as demais metodologias pela praticidade, rapidez e precisão (Tabela I). Entretanto, por se tratar de uma proteína que pode ser encontrada no núcleo, torna-se necessário a permeabilização preliminar da membrana nuclear possibilitando a exposição do antígeno ao AcMo anti-p53[26-29].

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram o de empregar as técnicas de CF, ICQ e WB para a detecção da expressão e quantificação da proteína p53 em células de linhagens tumorais humanas e uma linhagem de rato, e em linfócitos normais, provenientes de indivíduos sadios. Procurou-se fazer uma análise crítica e comparativa dos resultados obtidos entre as técnicas de ICQ e WB com a de CF, objetivando a validação da CF como uma técnica que pode ser empregada rotineiramente para a detecção da proteína p53.

TABELA I
Análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocitoquímica e Western Blot

Parâmetros	Citometria de fluxo	Imunocitoquímica	Western Blot
Nº de células avaliadas	10^5 - 10^6	10^2 - 10^3	10^5 - 10^6
Tempo de realização	Minutos	Horas	Dias
Precisão	Objetividade	Subjetividade	Objetividade
Análises dos dados	Multiparamétrica	Positivo/ negativo	Positivo/ negativo
Reprodutibilidade	Alta	Baixa	Baixa
Técnica	Semi-automatizada	Trabalhosa (manual)	Trabalhosa (manual)
Método	Padrão	Alternativo/ Complementar	Padrão
Sensibilidade	Alta	Baixa	Alta
Reação imunológica	Direto	Direto	Indireto

MATERIAIS E MÉTODOS

• *Materiais*

Linhagens celulares

Este estudo foi realizado em 15 linhagens distintas de células tumorais, estabilizadas e mantidas no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular, do Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer no Rio de Janeiro-RJ (INCA-RJ), segundo recomendação do *American Type Culture Collection* (ATCC)[30], (Tabela II).

Células-controle

Paralelamente foram empregados linfócitos normais provenientes de 36 indivíduos sadios que serviram como controle negativo para a expressão da proteína p53. Nesses casos, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos heparinizados e os linfócitos separados em gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque, 1077-Sigma), lavadas três vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e ressuspendidos em meio de cultura RPMI (RPMI 1640-Sigma), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF-Gibco).

TABELA II
Linhagens de células tumorais empregadas neste estudo

Linhagem Celular	Origem	Proteína p53/status	Referências
HT-29	Adenocarcinoma de cólon	+/Mutada	30
HL-60	Leucemia promielocítica	-/Deleção	30, 42-46
GLC-4	Carcinoma de pulmão	+/Mutada	30, 40
K562	Leucemia mielóide crônica em crise blástica	-/Mutada	30, 32
Lucena	Derivada da linhagem K562	nr *	33
Jurkat	Linfoma de células T	nr*	30
MT-2	Leucemia de células-T do adulto	+/Selvagem	30, 41
C91pl	Leucemia de células-T do adulto	nr*	30
Daudi	Linfoma de Burkitt	-/Mutada	30, 34
Raji	Linfoma de Burkitt	+/Mutada	30; 34, 35
Namalva	Linfoma de Burkitt	+/Mutada	30, 34
H460	Carcinoma de não pequenas células de pulmão	+/Selvagem	30, 40
H460/bcl-2	Linhagem H460, transfectada com o gene BCL-2	nr*	40
MCF-7	Carcinoma de mama	+/Selvagem	22, 30, 36, 37, 38
C6**	Sistema Nervoso Central (Astrocitoma)	nr*	30

(nr) dados não relatados na literatura consultada, (**) linhagem originária de rato.*

• *Métodos*

Teste de viabilidade celular

A determinação de viabilidade celular foi realizada nas amostras antes de qualquer experimento. Neste caso, $1,0x10^6$/ml células mononucleares foram incubadas com solução de azul de tripan (Merck) a 0,5% em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), na proporção de 9/1. Após homogeneização, a mistura foi analisada no microscópio ótico com objetiva de 20x, sendo descartadas as amostras com viabilidade inferior a 80%.

Citometria de fluxo

a) Preparação das amostras

A pesquisa da proteína p53 pela CF foi realizada em triplicata para cada linhagem celular e em 36 diferentes amostras de sangue de doadores sadios, empregando solução de lise (*Becton Dickinson´s FACS lysing solution*) para a permeabilização celular[29].

A suspensão celular foi ajustada na concentração $1,0x10^6$/células por ml por tubo e fixada em solução de paraformaldeído (Merck) a 2% em PBS em um volume de 1 ml da suspensão celular juntamente com 1 ml de solução de paraformaldeído (1/1), durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com SBF (Gibco) diluído a 5% em PBS, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o sedimento quando então foi incubado com solução de lise previamente diluída a 10% em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação a 1.500 rpm por 7 minutos, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento. Este sedimento foi lavado 2 vezes com solução de Tween 20 (Merck) na concentração de 0,5% em PBS, pH 7.4.

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi homogeneizado adicionando-se 10µl de AcMo anti-p53 (Clone DO-7; Dako) conjugado à isotiocianato de fluoresceina (FICT), procedendo-se em seguida à incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após ressuspender o sedimento em solução de PBS/Tween-20, seguida de centrifugação a 1.500 rpm por 7 minutos, desprezado o sobrenadante, o sedimento foi submetido a mais uma lavagem com solução de PBS/Tween-20. Após o descarte do sobrenadante, ao sedimento final foi adicionado 1 ml de formalina (Merck) a 1% em PBS e estocado na geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Para cada amostra foi utilizado um tubo controle de marcação inespecífica, empregando-se para tal, imunoglobulina inespecífica conjugada ao FITC diluída conforme as especificações do fabricante (*Rabit anti mouse immunoglobulin*/FICT, Dako).

b) Leitura e análises

A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Analyser* - Facs-can da *Becton Dickinson*, San-Jose, Ca, USA), utilizando-se o *software cell quest*, com aquisição de 40.000 eventos, tendo como parâmetros FSC e SSC em escala linear e FL1 em escala logarítmica que detecta a fluorescência verde, ou seja, a reação antígeno/anticorpo conjugado ao FICT.

Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação

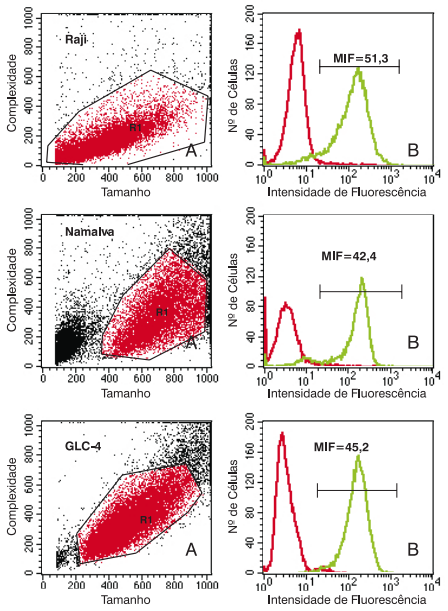


FIG. 1 - Análises da citometria de fluxo das linhagens Raji, Namalva e GLC-4.

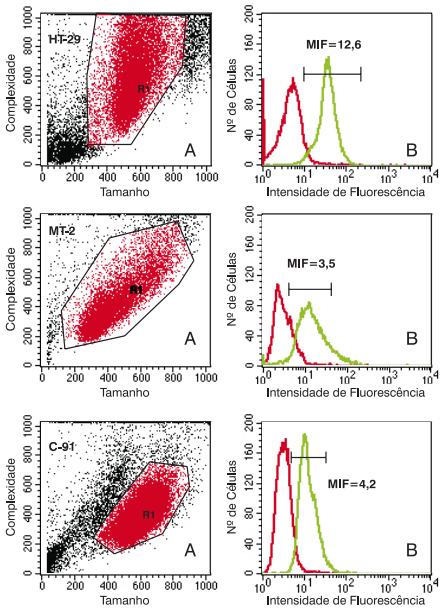


FIG. 2 - Análises da citometria de fluxo das linhagens HT-29, MT-2 e C-91.

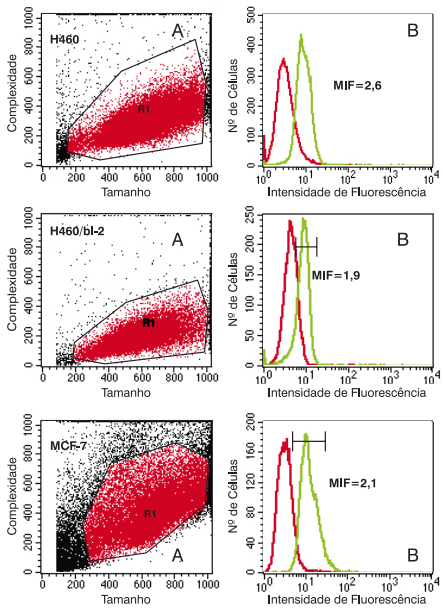


FIG. 3 - Análises da citometria de fluxo das linhagens H460, H460/bcl-2 e MCF-7.

***A) Demonstração das características físicas SSC (granulosidade interna) e FSC (tamanho); B) Histogramas de intensidades de fluorescência do tubo controle e tubo marcado com o AcMo anti-p53 apresentando elevada intensidade de fluorescência* e MIF (*Media de intensidade de fluorescência*).**

positiva para o AcMo anti-p53. Determinou-se também a quantificação antigênica da proteína p53 através da intensidade de fluorescência, calculada pela razão entre a média de intensidade de fluorescência do tubo com o AcMo e a média de intensidade de fluorescência do tubo controle (MIF)[11, 26-28, 31]. Para tal, procedeu-se a sobreposição dos histogramas das amostras do tubo controle sobre o tubo marcado com o AcMo (Figuras 1, 2 e 3).

Imunocitoquímica

a) Preparo das amostras

A expressão e localização topográfica da proteína p53 no núcleo das células foram realizadas em lâminas de microscopia contendo concentrado de células mononucleares após citocentrifugação de 150µl de suspensão contendo 1,0x10^6/ml de células mononucleares. Após a confecção dos *cytospins*, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem até o dia seguinte e então, embaladas em papel alumínio e mantidas a –80ºC até a realização da ICQ.

b) Metodologia

As lâminas foram retiradas do freezer e descongeladas por 15 minutos ainda sob proteção do papel alumínio. Esta proteção foi então retirada, sendo realizada a identificação das amostras. Após este procedimento, as células foram fixadas e permeabilizadas simultaneamente com uma solução em partes iguais de acetona / metanol (Merck) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram lavadas com água destilada e incubadas por 5 minutos em PBS à temperatura ambiente, seguida de nova incubação com soro de doador do sexo masculino do grupo sangüíneo AB, inativado e diluído a 5% em PBS, por 20 minutos, para inibir as ligações inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com PBS por 5 minutos em PBS à temperatura ambiente.

Foi depositado sobre as amostras, 20µl de AcMo anti p53 (DO7-Dako) previamente diluído a 1/50 em PBS/SBF. As lâminas foram então incubadas por uma hora à temperatura ambiente em câmara úmida, lavadas e incubadas por 5 minutos em PBS à temperatura ambiente para retirar o excesso do AcMo.

Na etapa seguinte, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário *(biotinylated Goat Antibody to Mouse/Rabbit Immunoglobulins-Dako)* diluído a 1/100 em PBS/SBF, conforme recomendação do fabricante, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para retirar o excesso de anticorpos secundário, uma etapa de lavagem e incubação com PBS durante 5 minutos à temperatura ambiente foi realizada.

Procedeu-se então a incubação com o anticorpo terciário *(Strept ABC complex*/HRP-Dako, diluído a 1/100 em PBS/BSA, conforme recomendação do fabricante, por 30 minutos, em câmara úmida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As lâminas foram lavadas e incubadas por 5 minutos em PBS à temperatura ambiente, para retirar o excesso do anticorpo terciário e em seguida foi realizada a incubação em solução de diaminobenzidina (Merck) (a 5% em PBS) acrescida de 10µl peróxido de hidrogênio 20v (Merck), por 10 minutos ao abrigo da luz, seguindo-se a lavagem das lâminas com PBS.

Finalmente, as lâminas foram submetidas a uma coloração de fundo com hematoxilina de Haris (Merck) por 10 minutos, seguindo-se uma lavagem com bastante água corrente, secagem e montagem com lamínula e bálsamo do Canadá.

A análise foi realizada em um microscópio ótico com objetiva de imersão, com contagem de no mínimo 200 células. A reação foi considerada positiva quando as células apresentavam uma coloração castanho-escuro na região nuclear (Figura 4).

Para cada lâmina, procedeu-se o controle de marcação inespecífica, onde o anticorpo primário foi omitido.

Western Blot

a) Preparação das amostras

As amostras foram preparadas por lise direta de 10^6

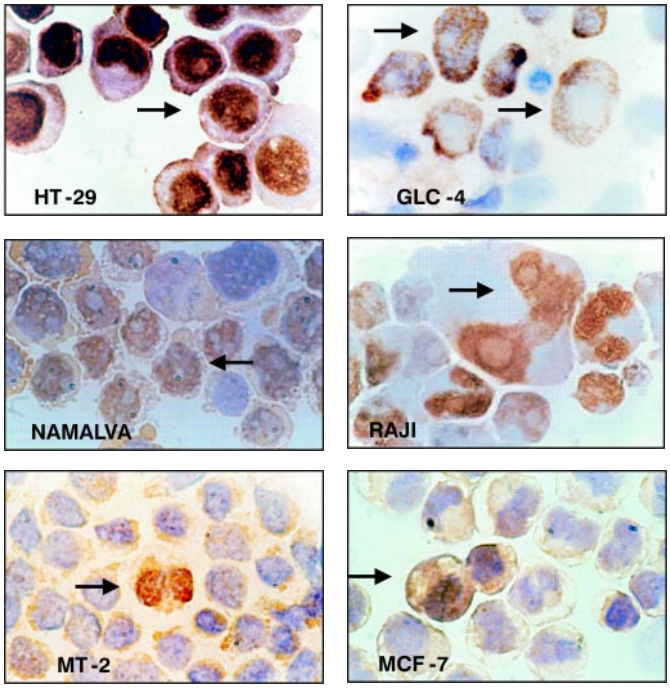


FIG. 4 - Reação de imunoperoxidase positiva para proteína p53 em células das linhagens tumorais HT-29, GLC-4, Namalva, Raji, MT-2 e MCF-7.

células, em 20µl de tampão de lise (10 mM EDTA, 60 mM de pirofosfato, 40mM tris-HCl pH 6,8), acrescida de 20µl de SDS (solução a 10%) e 20µl de tampão de amostras (115 mM tris-HCl pH 6,8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2-β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) e incubadas a 95^{0}C por 10 minutos, sendo mantidas a –20^{0}C até serem usadas.

b) Eletroforese de proteínas

Em cada amostra, 2x10^6 células de cada amostra foram submetidas a SDS-PAGE (acrilamida/bis-acrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 12% preparado em tampão contendo 1,5M tris-HCl pH 8,8 e 0,4% de SDS e o gel de empilhamento (*stacking gel*) a 3% em tampão 0,5M tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS. A composição do tampão de eletroforese foi 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 200mM de glicina e 1% de SDS. A eletroforese das proteínas foi realizada a 70 volts em gel 14cmx16 cm com duração de 16 horas.

c) Transferência das bandas protéicas para suporte sólido

Após a eletroforese, as bandas protéicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se tampão com 25mM de tris, 193mM de glicina e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba semi-seca (Hoeffer-Scientific), por duas horas sendo a potência estabelecida em função da área da membrana.

d) Marcação com anticorpo monoclonal anti-p53

Após a transferência das bandas de proteínas, a membrana de nitrocelulose, foi incubada por duas horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS (10mM de tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada duas vezes em tampão TBS-Tween (10mM de tris-HCl pH 7,4, 0,9% de NaCl e 0,2% de Tween 20) por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com o AcMo anti-p53 (clone DO-7 Dako), diluído 1/2000 em leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS, por 16 horas na temperatura de 2 a 8^{0}C.

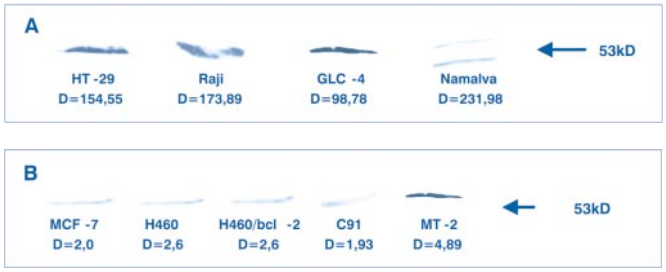


FIG. 5 - Expressão da proteína p53 em amostras de células tumorais e respectivos níveis de expressão antigênica determinado por densitometria. A) Linhagens HT-29, Raji, GLC-4 e Namalva com elevados níveis de expressão antigênica. Em destaque a presença de banda extra na linhagem Namalva, B) Linhagens MCF-7, H460, H460/bcl2, C91 e MT-2 exibindo baixos níveis de expressão antigênica.

Após este período, a membrana foi lavada por três vezes (15 minutos em cada lavagem) em tampão TBS-Tween, sob agitação leve em temperatura ambiente, sendo em seguida incubada com o anticorpo secundário (*goat anti-mouse* IgG F(ab)^2 HRP–Pierce), previamente diluído 1/5000 em leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS por duas horas à temperatura ambiente sob agitação suave, sendo em seguida lavada 6 vezes (15 minutos em cada lavagem) em tampão TBS-Tween.

e) Revelação

A banda da proteína p53 foi revelada utilizando-se o kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) e exposição da membrana a um filme de raio X (Mamo-M Kodak) por 10 minutos e revelação em máquina de raio-X (Kodak) (Figura 5).

f) Análise quantitativa

Níveis de expressão da proteína p53 foram determinados por densitometria das amostras, usando o programa *SigmaGel software* (Jandel Scientific, San Rafael CA), com escala linear.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas pela teste do qui-quadrado (χ^2) tomando-se o valor de $p<0,05$ como estatisticamente significativo. Foram também construídos gráficos de correlação linear confrontando os resultados das análises de quantificação antigênica obtidos pela CF e WB e também entre o percentual de células marcadas com o AcMo anti p53 pela CF e ICQ.

Nas análises realizadas pela CF foram calculados, os valores mínimos, máximos, média e desvios-padrão desses resultados.

RESULTADOS

Citometria de fluxo

Como observado na Tabela III e Figuras 1, 2 e 3, a expressão da proteína p53 nas linhagens de células tumorais HT-29, GLC-4, MT-2, C91, Raji, Namalva, MCF-7, H460 e H460/bcl-2 apresentaram elevado percentual de células positivamente marcadas. Nas linhagens HL-60, Daudi, Jurkat, K562, Lucena, C6 e amostras das células-controle, observou-se ausência de expressão da p53.

A análise quantitativa da densidade antigênica determinada pela média da intensidade de fluorescência (MIF) nas amostras mostraram-se variáveis, refletindo em uma maior ou menor quantidade da proteína p53

TABELA III
Avaliação da expressão da proteína p53 em células tumorais através da citometria de fluxo

Linhagem de células tumorais	Citometria de fluxo	
	Percentual variação (m*)	Índice de fluorescência variação (m*)
HT-29	97 ± 1 (98)	12,2 ± 0,2 (12,1)
HL-60	0	1.0
GLC-4	98 ± 1 (98)	45,2 ± 1,2 (45,2)
K562	0	1,3 ± 0,1 (1,3)
Lucena	0	1,2 ± 0,1 (1,2)
Jurkat	0	1,1 ± 0,1 (1.3)
MT-2	86 ± 1 (87)	3.5 ± 0.2 (3,5)
C91pl	88 ± 8 (87)	4,4 ± 1,1 (4,2)
Daudi	2 ± 1 (3)	1,1 ± 0,1 (1,1)
Raji	93 ± 7 (93)	52,2 ± 2,9 (51,3)
Namalva	92 ± 5 (93)	43,9 ± 11,8 (42,4)
H460	80 ± 5 (82)	2,5 ± 0,6 (2,6)
H460/bcl-2	70 ± 10 (69)	2,0 ± 0,5 (1,9)
MCF-7	44 ± 1 (44)	2,2 ± 0,5 (2,1)
C6	0	1,0
Controle	2 ± 2 (0)	1,2 ± 0,2 (1,1)

** (m) media dos valores determinados pela realização dos testes em triplicata, exceto em células-controle com 36 diferentes amostras estudadas.*

TABELA IV
Análises da expressão da proteína p53 em linhagens tumorais e linfócitos normais por metodologias diferentes

Células	CF		ICQ	WB
	%*	MIF*	%*	IA*
HT-29	98	12,1	98	154,79
HL60	0	1,0	0	0
GLC4	98	45,2	100	98,78
K562	0	1,3	0	0
Lucena	0	1,2	0	0
Jurkat	0	1,0	0	0
MT-2	87	3,5	89	3,33
C91	87	4,2	87	1,91
Daudi	3	1,1	0	0
Raji	93	51,3	97	173,89
Namalva	93	42,4	98	231,98
H460	82	2,6	70	2,6
H460/bcl-2	69	1,9	70	3,15
MCF-7	44	2,1	50	2,0
C6	0	1,0	0	0
Doador	0	1,2	0	0

**(m) media dos valores determinados pela realização dos testes em triplicata, exceto em células mononucleares de doadores com 36 diferentes amostras estudadas, (%) percentuais de células marcadas, (MIF) média de intensidade de fluorescência, (DO) densidade ótica, (CF) citometria de fluxo, (ICQ) imunocitoquímica, (WB) Western Blot, (IA) Intensidade antigênica. Teste do x^2, p= 0,0000874.*

no núcleo das células. Foi observada elevada intensidade de fluorescência nas linhagens originárias do linfoma de Burkitt (Raji e Namalva), com valores MIF médio de 51,3 e 42,4 respectivamente, na linhagem proveniente de carcinoma de pulmão (GLC-4), MIF médio foi de 45,2. As células de adenocarcinoma de cólon (HT-29) com MIF médio de 12,1 apresentaram uma intensidade intermediária, contrastando com MIFs médios menores das linhagens C-91 e MT-2 (leucemia de células T do adulto), carcinoma de não pequenas células de pulmão (H-460 e H-460/bcl2), e carcinoma de mama (MCF-7), que mostraram valores de MIF de 4,2; 3,5; 2,6; 1,9 e 2,1, respectivamente.

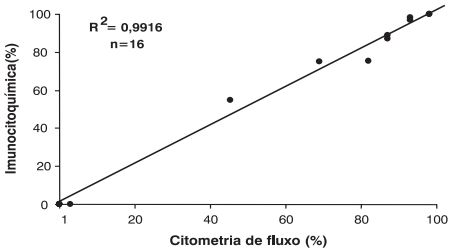


FIG.6- Análise de correlação linear demonstrando entre o percentual de células marcadas pela reação de imunocitoquímica e citometria de fluxo nas amostras de células tumorais e células-controle.

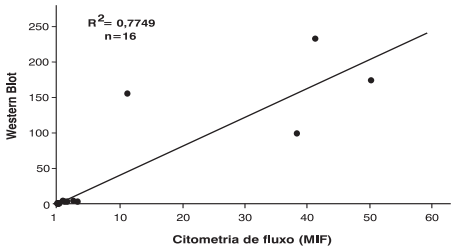


FIG.7- Análise de correlação linear entre a media de intensidade de fluorescência (MIF) obtida pela citometria de fluxo e densitometria do Western Blot, realizada nas amostras de linhagens de células tumorais e células-controle.

Células tumorais com marcação negativa apresentaram baixa intensidade de fluorescência com valores de MIF homogêneos e similares aos resultados observados pelas células-controle, com média de 1.0 na maioria dos casos (Tabelas III e IV).

Imunoperoxidase

Os resultados obtidos pela ICQ mostraram percentual elevado de células positivas nas seguintes linhagens: GLC-4 (100%), HT-29 (98%), Namalva (98%) e Raji (93%), menores nas linhagens C-91 (87%), MT-2 (87%), H460/bcl-2 (70%), H460 (70%) e MCF-7 (50%) e ausência de expressão nas linhagens Daudi, HL-60, K562, Lucena, Jurkat, C6 e nas células-controle, estando estes resultados concordantes com os dados obtidos pela CF (Tabela IV e Figura 6).

Western Blot

O WB foi positivo nas linhagens HT-29, MT-2, C-91, Raji, GLC-4, MCF-7, H460 e H460/bcl2. Na linhagem Namalva na qual observou-se adicionalmente a presença de uma banda extra (Figura 3). Os resultados foram negativos nas linhagens HL-60, Daudi, K562, Lucena, Jurkat, e C6 e células-controle (Tabela III), observou-se também nestes casos, uma concordância entre os resultados da expressão da proteína p53 determinada pela WB com as análises feitas pela ICQ e CF (Tabela IV).

Análises quantitativas mostraram valores variáveis, indicando níveis elevados de expressão da proteína p53 nas linhagens Namalva (231,98), HT-29 (154,79), Raji (173,89), GLC-4 (98,78) e níveis mais baixos nas linhagens MT2 (3,33), C91 (1,91), H460 (2,6), H460/bcl-2 (3,15) e MCF-7 (2,0).

Comparando os resultados referentes à quantificação antigênica determinada pelas intensidades de fluorescência na CF e densitometria no WB constatou-se uma tendência entre os dados obtidos pelos dois métodos de quantificação antigênica (Figura 7).

DISCUSSÃO

O número crescente de estudos relacionados os aspectos moleculares da biologia do câncer, elevam o interesse sobre o gene supressor tumoral p53 e a função da respectiva proteína nessas doenças[1-8,18-19]. Uma série de

alterações genéticas do gene p53 inclui a troca de nucleotídeos na seqüência do gene p53 (mutação *missense*), assim como deleções[42-46], inversões e translocações, envolvendo o cromossomo 17, havendo uma estreita correlação dessas alterações genéticas e o acúmulo da proteína p53 no núcleo das células afetadas[6-12, 18-19, 21, 22].

Outras formas de inativação da proteína p53 incluem interações com outras proteínas regulatórias do ciclo celular, como a proteína MDM-2, produto do gene *mouse double minute* 2 e proteínas virais como o antígeno TAX do vírus linfotrópico de células T humana (HTLV) e EBNA5 do vírus Epstein-Barr (EBV) dentre outras. Essas proteínas quando interagem com a proteína p53 levam à inativação, estabilização e acúmulo da p53 no núcleo da célula, tornando possível a sua detecção[2-9,18-19,41].

A detecção da proteína p53 por métodos imunológicos consiste em adicionar um anticorpo com especificidade para a proteína, possibilitando a pesquisa em amostras de cortes histológicos, células em suspensão, *imprint* de tecidos ou lisados celulares. Esse complexo antígeno-anticorpo pode ser facilmente detectado de acordo com a particularidade do método adotado.

Neste trabalho, a proteína p53 foi investigada em amostras procedentes de linhagens tumorais empregando-se o AcMo anti-p53 (clone DO-7-Dako), específico para a região N-terminal da molécula (selvagem e mutada). Este método é sensível e específico para detecção da proteína nas formas mutadas ou inativada. A proteína p53 selvagem tem meia vida muito curta, não sendo possível a sua detecção nas células normais[22,36,39,45].

No presente estudo, embora considerando particularidades dos três métodos de detecção da proteína p53, obtivemos resultados concordantes no que tange a presença ou a ausência de expressão nas diferentes amostras investigadas.

A ICQ foi a metodologia que apresentou mais desvantagens em termos informativos quando comparada com as demais metodologias. Entretanto, este método apresenta a vantagem da reação imunológica se processar na própria célula e de poder ser associado com a análise citomorfológica, possibilitando a distinção entre as células patológicas das normais, assim como, a localização topográfica da proteína p53 no núcleo das células[20].

Por se tratar de uma metodologia demorada e constituída de muitas etapas, sua utilização na rotina tem sido dificultada, principalmente, quando se utiliza um grande número de amostras o que torna este método alternativo ou complementar. Como se trata de uma metodologia puramente qualitativa, seu resultado limita-se a uma contagem dos elementos positivos ou negativos, ficando a intensidade antigênica sujeita a uma análise subjetiva de acordo com a intensidade da coloração e interpretação do operador.

A ICQ apresenta ainda, baixa sensibilidade, pois a ausência de marcação não significa necessariamente mutação do gene p53 ou ausência da proteína, que pode ocorrer em condições adversas de fixação das células ou conservação do material de forma inadequada em função da rápida degradação da proteína p53[20,21]. No entanto, uma contagem criteriosa com elevado número de células (mais que 200) tornou os resultados confiáveis e compatíveis com os resultados obtidos pela CF, conforme pode ser observado na Tabela IV e Figura 6.

A CF mostrou ser a metodologia mais adequada para a detecção da expressão da proteína p53 em função da fácil execução, o que possibilita o processamento e análise das amostras em tempo hábil quando comparada com a ICQ e WB. Aliada a estas características, a CF apresentou reprodutibilidade da técnica com concordância nos resultados das análises em triplicata nas células tumorais e nas 36 amostras procedentes do grupo-controle, tanto na análise quantitativa, quanto na avaliação de densidade antigênica (Tabela III).

Por se tratar de um método indireto, o WB perde em termos de viabilidade de execução quando comparado à CF na qual a reação imunológica é efetuada em uma única etapa de marcação e que adicionalmente apresenta ainda a vantagem de se utilizar células recém-obtidas e pelo fato da mesma se processar na própria célula.

Por necessitar várias etapas de processamento, tais como o preparo dos lisados, a eletroforese em gel de poliacrilamida, eletrotransferência das bandas de proteínas do gel para membrana de nitrocelulose e a captura e digitalização das imagens das mesmas do filme de raio-X por um scanner, o WB foi a metodologia que apresentou mais desvantagens em termos operacionais, perdendo também em sensibilidade para a CF.

Resultados do WB mostraram a presença de dois grupos de células tumorais de acordo com os resultados dos níveis de expressão da proteína p53 obtidos pela densitometria: alta na HT-29 (154,79), Raji (173,89) e Namalva (216,98) e GLC-4 (98,78) e baixa na linhagem MT-2 (3,33), C91 (1,91) MCF-7 (2,0), H460 (2,6) e H460/bcl-2 (3,15). Em contraste com os resultados obtidos pelo WB, na CF observou-se distintamente a presença de três grupos determinados através dos resultados com os resultados das intensidade de fluorescência: MIF alto na Raji (45,2 ± 2,9), Namalva (43,9 ± 11,8), GLC-4 (45,2 ± 1,2), intermediário na HT-29 (12,2 ± 0,2) e baixo nas linhagens MT-2 (3,5 ± 0,2), C91 (4,4 ± 1,1), MCF-7 (2,2 ± 0,5), H460 (2,5 ± 0,6) e H460/bcl-2 (2,0 ± 0,5) o que reflete uma maior sensibilidade da CF em relação ao WB.

Outra limitação deste método é o surgimento esporádico de bandas extras, que podem ocorrer em função da qualidade dos anticorpos[22] ou ainda, como conseqüência da degradação da proteína pela ação de proteases no momento de preparo dos lisados ou na estocagem das amostras. Este achado foi observado apenas na linhagem Namalva (Figura 4).

Em ultima análise, observou-se superexpressão antigênica nas linhagens com mutação do tipo *missense* do gene p53: Namalva com mutação nos codons 248, exon 8[34], Raji (codon 234, exon 7)[35], HT-29 (codon 273, exon 8)[30] e GLC-4 (codon 132, exon 5)[40], em detrimento das linhagens MCF-7[22,36-38], H460[40] e MT-2[41] que expressaram a forma selvagem do gene e possivelmente, apresentam outros mecanismos de estabilização da proteína[18,19].

As linhagens K-562 e Daudi, que também apresentam mutação do gene p53 no codons 135 e 136 do exon 5 e codon 213 no exon 6 respectivamente, não mostraram expressão da proteína p53 pelo fato destas mutações impedirem a transcrição da proteína (mutação do tipo *stop codon*)[32,34], e a linhagem HL60 que também apresenta ausência de transcrição da proteína p53 em decorrência apresentar deleção na região 13p do cromossomo 17[42-46].

CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos concluímos que o AcMo DO-7 mostrou-se eficaz na detecção da expressão da proteína p53, sendo observada uma concordância dos resultados nas três metodologias apesar das limitações presentes em cada uma da técnicas.

A CF foi a metodologia mais eficiente na detecção da proteína p53 quando comparada com a ICQ e WB.

Com relação a ICQ, ficou demonstrado a eficácia da correlação entre a reação imunológica e a análise citomorfológica, possibilitando a visualização da expressão da proteína p53 no núcleo das células tumorais.

Observou-se níveis mais altos de expressão da proteína p53 nas linhagens com mutação do tipo missense no gene *p53* tais como nas linhagens Namalva, Raji, GLC-4 e HT-29 em relação às linhagens H460, MCF-7 e MT-2 que expressam a forma selvagem da proteína.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Drª Claudete Esteves Klumb pela revisão do manuscrito, às Drªs Maria José de Andrade Serpa e Doris Shor, pelas linhagens C-91pl e MT-2 e ao Dr. Carlos Gil Ferreira, pelas linhagens MCF-7, GLC-4 e H460.

REFERÊNCIAS

1. **Bartek J., Bartkova J., Vojtesek B., *et al*.** Aberrant expression of p53 oncoprotein is a common feature of wide spectrum of human malignancies. *Oncogene*. 6:1699-1703, 1991.
2. **Beroud C. and Soussi T.** p53 gene mutation:software and database. *Nucleic Acids Res*. 26(1):200-204, 1998.
3. **Rotter V. and Prokocimer M.** p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res*. 53:257-272, 1991.
4. **Wang X. W., Harris C.C.** p53 tumor-supressor gene:Clues to molecular carcinogenesis.*J Cell Physiol*. 173:247-255, 1997.
5. **Harris C. H. and Hollstein M.** Clinical implications of the p53 tumor supressor gene. *N Engl J Med*. 239:1318-1326, 1993.
6. **Fenaux P.** The clinical significance of the *p53* supressor gene in haematological malignancies. *Brit J Haematol*. 98:502-511, 1997.
7. **Imamura J., Miyoshi I. and Koeffler P.** p53 in hematologic malignancies. *Blood*. 84(8):2412-2421, 1994.
8. **Preudhomme C. and Fenaux P.** *p53* et hemopathies malignes. *Pathol Bio*. *I*, 45(10):777-908, 1997.
9. **Martinez-Delgado B.; Robledo M.; Arranz E.; *et al.*** Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas. *Am J Hematol*. 55:1-8, 1997.
10. **Paydas S.** p53 protein expression in leukemias. *Acta Oncol*. 1995; 34 (1):23-26, 1995.
11. **Konikova E. and Kusenda J.** p53 protein expression in leukemia and lymphoma cells. *Neoplasma*. 48 (4):290-298, 2001.
12. **Kitagawa M., Yoshida S., Kumata T., Tanizawa T. and Kamiyama R.** p53 expression in myeloid cells of myelodysplastic syndromes. Association with evolution of overt leukemia. *Am J Pathol*. 145(2):338-344, 1994.
13. **Prokocimer M. and Rotter V.** Structure and function of *p53* in normal cells and their aberrations in cancer cells:projection on the hematologic cell lineages. *Blood*. 84(8):2391-2411, 1994.
14. **Martin A.** Le géne suppresseur de tumeur p53 (1re partie):structure, function et mécanismes d'inativation. *Ann Pathol*. 15 (3):178-183, 1995.
15. **Lane D. P.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*., 558:15-16, 1992.
16. **Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I, Wiesmüller L, Grosse F. and Deppер W.** The dual role model for p53 maitaining genomic integrity. *Cell Mol L Sci*. 55:12-27, 1999.
17. **Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D. *et al.*** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 51:6304-6311, 1991.
18. **Cavalcanti Júnior, G. B., Klumb, C. E. and Maia R. C.**-p53 e as hemopatias malignas. *Rev Bras Can*. 48 (3):419-427, 2002.
19. **Klumb C. E. and Cavalcanti Júnior G. B.** Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Rev. Bras. Hematol. e Hemoterapia*. 24 (2):111-125, 2002.
20. **Dowell S. P.; Wilson P. O. G.; Derias N.W.; *et al.*** Clinical utility of the immunocytochemistry detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res*. 54:2914-2918, 1994.
21. **Logullo A. F.; Pereira de Moura, R.; Nonogaki, S.; Kowalski, L. P.; Nagai, M. A. and Simpson, A. J. G.** A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-Based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. *Diag. Mol. Pathol*. 91:35-40, 2000.
22. **Turpeinen M.; Serpi R; Rahkolin M. and Vähäkangas K.** Comparison of anti p53 antibodies in immunoblotting. *Bioch. Boph. Res. Communications*. 293:850-856, 2002.
23. **Oliveira M. S. P.** Citometria de fluxo em imunofenotipagem celular I. Perfil imunológico de linfócitos circulares. *Bol. Soc. Bras. Hematol Hemoterapia*. 163 (15), 59-67, 1993.
24. **Ormerod, M. G.,** *in: Flow Cytometry*, 2º edição, Bios Scientific Publishers, 1999.
25. **Santos Rodrigues C.; Lins de Queiros M. G.; Farias Sales V.S.; Souza Brito T. N.; Macedo da Fonseca H. E.; Souza Paiva A.; Fernandes M. Z.; Araújo Lopes M. C.; Cavalcanti e Silva D. G. K. and Cavalcanti Júnior G. B.** Estudo comparativo entre duas técnicas de contagem de subpopulação de células T em indivíduos infectados e não infectados com o vírus da imunodeficiência humana, *Rev. Bras. Anál. Clín*. 34(2):95-101, 2002.
26. **Konikova E., Kuseuda O. and Babusikova I.** Flow cytometry of p53 protein expression in some hematological malignancies. *Neoplasma*. 46 (6):368-376, 1999.
27. **Fillippini G.; Griffin S.; Uhr M.; *et al.*** A novel flow cytometry method for the quantification of p53 gene expression. *Cytometry*. 31:180-186, 1998.
28. **Kimura O.; Sugamura K.; Kijima T.; Makino M.; Shigeru T.; Ito H. and Kaibara N.** Flow cytometry examination of p53 protein in primary tumors and metastases to the liver and lymphonodes of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum*. 39 (12):1428-1433, 1996.
29. **Faharat N.; van der D. P.; Praxedes M; *et al.*** Demonstration of cytoplasmic and nuclear antigens in acute leukaemia using flow cytometry. *J. Clin. Phatol*. 47:843-849, 1994.
30. **American Type Culture Collection (ATCC):**http:// www.atcc.org, capturado em março de 2003.
31. **Maynadié M.; Picard F.; Husson B.; Chatelain B.; Cornet Y.; le Roux G.; Campos L.; Dromelet A.; Lapelley P.; Jouaut H.; Imbert M.; Michelle R.; vergé V.; Bissiàres P.; Raphael M.; Berne M. C. and Feulllard J.** Immunophenotypic clustering of syndromes. *Blood*. 100(7):2349-2356, 2002.
32. **Law J. C.; Ritke M. K.; Yalowich J. C.; Leder G. H. and Ferrell R. E.** Mutational inactivation of p53 gene in the human erithroid leukemic K562 cell line. *Leuk. Research*. 17 (12):1045-1050, 1993.
33. **Runjaneck V. M., Trindade G. S., Wagner-Souza K., Melete de Oliveira M. C., Marques Santos L. F., Maia R. C. I.** Multi-drug resistance in tumor cells:characerization of the multi-drug resistant cell line K562-Lucena. *Ann Acad. Bras. Ci*. 73:57-69, 2001.
34. **Gaidano G., Ballerini P., Gong J. Z., Inhirami G., Neri A., Newcomb E. W., Magrath I. T., Knowles D. M. and Dalla-Favera, R.**-p53 mutation in human lymphoid malignncies:Association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:5413-541, 1991.
35. **Duthu A.; Debuire B.; Romano J.; Ebrhart, J.; Fiscella , M., May E.; Appella E. and May, P.**- p53 mutations in Raji cells:Characterizations and localizations relative to other Burkitt's lymphomas. *Oncogene*. 7(11):2161-2167, 1992.
36. **Horne G.M., Anderson J. J., Tiniakos D. G., McIntosh G. G., Thomas M. D., Angus B., Henry J. A., Iennard T. W. J. and Horne C. H. W.**- p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma:A comparison of four antibodies for immunohistochemistry. *British J. Cancer*. 73:29-35, 1996.
37. **Vojetesek B. and lane D. P.** Regulation of p53 protein expression in human breast cancer cell lines. *Journal of Cell Sc*.105, 607-612, 1993.
38. **Kazuhide T. and Suzuki K.** Association of insulin-like growth-factor-I-Iduced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Cancer*.55:453-458, 1993.
39. **Vojtesek B., Bártek J., Midgley C. A. and Lane D. P.** An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods.*151:237-244, 1992.
40. **Ferreira C. G., Tolis C., Span S. W., Peters G. J., van Lopik, Kummer A. J., Pinedo H. M. and Giocone G.** Drug-induced apoptosis in lung cancer cells is not mediated by Fas/FasL (CD95/APO1) signaling pathway. *Clin. Cancer Research*. 6:203-212, 2000.
41. **Mahieux R.; Pise-Masison C. A., Nicot C., Green P., Hall W. W. and Brady J. N.** Inactivation of p53 by HTLV type I and HTLV-type 2 Tax *trans*-Activators. *Aids Res. Human Retroviruses*. 16(16):1677-1681, 2000.
42. **Prockocimer M., Shakai M., Ben Bassat H., Wolf D., Goldfinger N. and Rotter V.** Expression of p53 in human leukemia nas lymphoma. *Blood.* 68 (1):113-118, 1986.
43. **Siles E., Villalobos M., Valenzuaela M.T., Núñez M. I., Gordon A., McMillan T. J., Pedraza V. and Ruiz de Almadovar J. M.** Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour celll lines *Brit. J. Cancer*. 73:581-588, 1996.
44. **Danova M., Giordano M., Mazzini G. and Riccardi A.** Expression of p53 protein during the cell cycle measured by flow cytometry in human leukemia. *Leuk. Research*. 14 (5):417-422, 1990.
45. **Bonsing B. A., Cover W. E., Gorsira M. C. B., van Viet M., oud P.S., Cornelisse C. J. and Fleuren G. J.** Specific of seven Monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western bltting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy and flow cytometry. *Cytometry*. 28:11-24, 1997.
46. **Fleckentein D. S., Uphoff C. C., Drexler H.G. and Quentmeier H.** Detection of p53 gene mutation by single strand conformational polymorphism (SSCP) in human acute myeloid leukemia-derived cell lines. *Leuk. Research*. 26:207-214, 2002.

Endereço para correspondência
Drª Raquel C. Maia
Laboratório de Hematologia Celular e Molecular, Serviço de Hematologia,
Hospital do Câncer I
Praça da Cruz Vermelha, 23, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, 20.230-130
E-mail:rcmaia@inca.gov.br

Vantagens da citologia de monocamada em preventivos de câncer de colo de útero

Monolayer citology advantages in preventive examination from the col cancer of the uterus

Patrícia Haas[1]; Rodrigo Ferreira Paludo[2]; Luciane Anita Savi[2] & Marcelo Lehmkuhl Miranda[2]

RESUMO – O controle do câncer do colo do útero continua sendo o rastreamento através do exame preventivo, sendo fundamental que os serviços de saúde orientem sobre o que é e qual a importância do exame preventivo, pois a sua realização periódica permite reduzir em 70% a mortalidade por câncer do colo do útero na população de risco. A metodologia da monocamada minimiza os problemas causados pelo excesso de muco, sangue e restos celulares que, freqüentemente, estão presentes no esfregaço convencional. O exame consiste em processar a amostra acondicionada em líquido conservante com centrifugações seriadas. O resultado é um concentrado de células que serão colocadas sobre a lâmina, em uma camada fina e uniforme. Dessa forma, além da amostra representar de forma fiel o colo do útero, as alterações celulares tornam-se mais evidentes. O novo teste foi aprovado em 1999 pelo FDA, órgão americano de controle de medicamentos, e vem sendo amplamente usado nos Estados Unidos.

PALAVRAS-CHAVE – Monocamada, Papanicolaou, câncer do colo do útero.

SUMMARY *– The control of the col cancer of the uterus is being the tracking through the preventive examination to the health jobs guide on what or which is it important, therefore its periodic accomplishment permits to reduce in 70% the mortality for col cancer of the uterus in the risk population. The monolayer methodology minimizes the problems caused by the mucus excess, blood and cellular remaining portions, frequently present in the Papanicolaou. The examination consists in processing sample conditioned in conservation liquid with seriates centrifugalizations. Its result a cells concentrate that will be placed on the blade in an uniform fine layer. In this form, the sample gets a faithful of the col uterus form, as well as the cellular alterations become evident. The new test was approved in 1999 for the FDA, american agency of medicine control and being widely used in the United States.*

KEYWORDS *– Monolayer, Papanicolaou, col cancer of the uterus.*

INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que o câncer do colo do útero seja o terceiro mais comum na população feminina, sendo superado pelo câncer de pele não melanoma e pelo de mama. Este tipo de câncer representa 10% de todos os tumores malignos em mulheres. É uma doença que pode ser prevenida, estando diretamente vinculada ao grau de subdesenvolvimento do país. De acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de colo do útero foi responsável pela morte de 3.693 mulheres no Brasil em 1998. Em 2001, a incidência e mortalidade por câncer foi 3.725 novos óbitos (INCA, 2001).

O câncer do aparelho genital feminino é uma das principais causas de morte no mundo e no Brasil. Particularmente,em nosso meio, o câncer do colo uterino acomete muitas mulheres em importante fase da vida. Embora os progressos no tratamento do câncer não estejam propiciando a melhora que se deseja no combate a doença, algumas conquistas permitem uma diminuição da incidência e previnem a morte. O câncer do colo uterino é um bom exemplo, à medida em que exames preventivos periódicos, de baixo custo, (citologia e colposcopia), conseguem detectar precocemente a doença, em fases em que o tratamento é simples e eficaz. O câncer não aparece de um dia para o outro. Ele leva, no caso do colo do útero, uma média de dez anos para se desenvolver a partir de lesões pré-cancerosas, não existindo sintomatologia aparente ou mudanças físicas que permitam a portadora descobrir a doença, até que esteja em estados avançados do câncer, onde os sintomas incluem freqüentemente hemorragia vaginal anormal (Tenconi *et al*,, 2000; FDA, 2001; INCA, 2001).

Também, há uma porcentagem pequena de mulheres que desenvolvem uma forma rara de câncer cervical agressivo que pode desenvolver para uma fase avançada em menos de um ano. O câncer cervical continuará acontecendo em mulheres que não fizerem exames ginecológicos regulares e testes laboratoriais para a detecção da doença. A maioria dos profissionais de saúde recomendam que todas as mulheres que são ou foram sexualmente ativas ou alcançaram idade de 18 anos, façam o exame anualmente ou, dependendo dos fatores de risco que estão expostas, façam o teste a cada três anos (FDA, 2001).

Existe a possibilidade real de se reduzir significativamente a incidência de câncer ginecológico, poupando-se muitas vidas. Basta estruturar um programa eficaz de combate ao câncer, com campanhas educativas para a população feminina de risco, viabilizar os meios para o diagnóstico precoce em postos de saúde bem

Recebido em 24/3/2003
Aprovado em 8/4/2003
[1]Professora do Departamento de Análises Clínicas – UFSC; [2]Acadêmicos do Curso de Farmácia Bioquímica – Análises Clínicas – UFSC

aparelhados, e tratar adequadamente em hospitais especializados. Um princípio fundamental em oncologia, é o de que quanto mais inicial a doença, quanto mais precoce o diagnóstico, mais chances temos de vencê-la. Daí a importância das visitas periódicas ao ginecologista, uma ou duas vezes ao ano, que possibilitam a detecção das lesões pré-cancerosas ou fases iniciais, com boa chance de cura. As mulheres devem ser motivadas e conscientizadas de que não precisam esperar por sinais da doença para procurarem o médico, pois esta inicia-se silenciosamente, sem sintomas definidos (Sogimig, 2001).

Devido à grande quantidade de resultados "falso-negativos", no diagnóstico por Papanicolaou, pode atrasar o tratamento da doença. As diferenças entre as duas técnicas começam já no consultório, quando o médico faz a coleta das células do colo do útero. No Papanicolaou, apenas 20% do material é aproveitado. Boa parte dele se perde na hora de preparar as lâminas que serão analisadas no laboratório. Apesar do método de Papanicolaou convencional resultar num declínio da mortalidade por câncer cervical, ele continua crescendo, sendo o câncer cervical o 3º mais comum em mulheres nos EUA e em algumas partes do mundo é o primeiro ou o segundo. O Brasil ainda apresenta uma alta taxa de mortalidade feminina com câncer de colo uterino em função da não-prevenção. A maioria dos profissionais concorda que a taxa de mortalidade pode ser reduzida pela maior freqüência no *screening*, 1 vez por ano, portanto a importância de programas de prevenção de câncer cérvico-uterino com maior abrangência, em todas as mulheres que tem ou tiveram vida sexual ativas e aumento na sensibilidade do método papanicolaou convencional.

No caso da citologia de monocamada, a própria escovinha utilizada para a esfoliação celular é enviada para exame dentro de um saco plástico. No laboratório, o material colhido é colocado numa espécie de centrífuga. O aparelho separa todos os elementos que podem dificultar o diagnóstico, como muco cervical e leucócitos. O resultado é um concentrado de células que serão colocadas sobre a lâmina, em uma camada fina e uniforme. Dessa forma, além de a amostra representar, de forma fiel, o colo do útero, as alterações celulares tornam-se mais evidentes. O novo teste foi aprovado em 1999 pelo FDA, órgão americano de controle de medicamentos, e vem sendo amplamente usado nos Estados Unidos (Revista Veja, 1996; FDA, 2001; Pró-Célula, 2001).

Câncer do colo do útero

Ao contrário dos países desenvolvidos, onde as taxas de mortalidade por essa doença vêm caindo, no Brasil as taxas de mortalidade continuam altas, porém relativamente estáveis desde 1985. Em 1997, a taxa bruta de mortalidade era de 4,23/100 mil mulheres. Embora o câncer do colo do útero possa ser prevenido por meio do exame Papanicolaou e curado quando tratado precoce e adequadamente, suas taxas de mortalidade e incidência estão entre as mais elevadas entre as mulheres brasileiras. Levando-se em consideração o seu longo período de evolução (quando detectado em estágio pré-maligno, demora cerca de 15 anos para se tornar um câncer) o alto índice de mortes por esta doença, quando comparado a países com programas de controle estabelecido, sugere que a cobertura do exame preventivo na população foi baixa no passado. Um esforço para superar esse quadro está sendo feito pelo Ministério da Saúde sob a coordenação do INCA, pela aplicação de um programa de abrangência nacional para o diagnóstico precoce e tratamento oportuno dos casos detectados. No norte e no nordeste, também, o câncer do colo do útero é o de maior incidência, provavelmente por causa da falta de informação sobre o exame preventivo, preconceito e falta de acesso aos serviços de saúde (INCA, 2003).

Fatores de risco

Evidências coletadas durante as últimas décadas sugere que alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, incluem fatores sociais, ambientais e os hábitos de vida, tais como baixas condições sócio-econômicas, início de atividade sexual antes dos 18 anos de idade, tendo vários parceiros sexuais, ou tendo um parceiro sexual que previamente teve uma relação sexual a longo prazo com uma mulher que teve câncer cervical (FDA, 2001; INCA, 2001).

Pesquisas sugerem que alguns tipos de vírus do papiloma humano (HPV), (há mais de 60 tipos diferentes), e o Herpes vírus Tipo II (HSV) têm papel importante no desenvolvimento da displasia das células cervicais e na sua transformação em células cancerosas, podendo ativar o crescimento de células anormais no colo uterino e representar um papel chave no desenvolvimento de câncer cervical. Mulheres que têm HPV ou parceiros portadores de HPV têm maior risco de desenvolver câncer cervical. O vírus do papiloma humano (HPV) está presente em 94% dos casos de câncer do colo do útero, pode ser transmitido por contato sexual e pode ser um precursor do câncer cervical. Não há nenhum tratamento específico para uma infecção de HPV, mas o vírus pode ser controlado através de medicamento ou interferon, e as verrugas podem ser removidas por criocirurgia, tratamento de laser ou cirurgia convencional (Silva *et al.*, 2000; Coalizão Nacional de Câncer Cervical, 2001; FDA, 2001; INCA, 2003).

Hormônios também podem influenciar o desenvolvimento de câncer cervical. Alguns estudos acharam maior incidência de câncer cervical em mulheres que usam pílulas para controle da natalidade. Fumantes elevam o índice do risco de câncer cervical, que sobe com o número de cigarros que a mulher fuma cada dia e com o número de anos que ela fumou. Mulheres expostas à fumaça de tabaco de outras pessoas também podem desenvolver câncer cervical. Pesquisa sugere que as mulheres possam reduzir o risco de câncer cervical usando métodos de barreira de contracepção, como o diafragma com espermicida e preservativos, provavelmente porque tais métodos diminuem o risco de infectar-se por uma doença sexualmente transmissível (FDA, 2001; INCA, 2003).

Prevenção

Apesar do conhecimento cada vez maior nesta área, a abordagem mais efetiva para o controle do câncer do colo do útero continua sendo o rastreamento através do exame preventivo. É fundamental que os serviços de saúde orientem sobre o que é e qual a importância do exame preventivo, pois a sua realização periódica permite reduzir em 70% a mortalidade por câncer do colo do útero na população de risco. O Instituto Nacional de Câncer, por intermédio do Pro-Onco (Coordenadoria de Programas de Controle de Câncer) tem realizado diversas campanhas educativas para incentivar o exame preventivo tanto voltado para a população quanto para os profissionais da saúde (INCA, 2001).

Exame preventivo

O exame preventivo do câncer do colo do útero, conhecido popularmente como exame de Papanicolaou, é indolor, barato e eficaz, podendo ser realizado por qualquer profissional da saúde treinado adequadamente, em qualquer local do país, sem a necessidade de uma infra-estrutura sofisticada. Ele consiste na coleta de material para exame, que é tríplice, ou seja, da parte externa do colo (ectocérvice), da parte interna do colo (endocérvice) e do fundo do saco posterior da vagina. O material coletado é afixado em lâmina de vidro, corado pelo método de Papanicolaou e, então, examinado ao microscópio. Para a coleta do material introduz-se um espéculo vaginal e procede-se à escamação ou esfoliação da superfície do colo e da vagina com uma espátula de madeira. Em mulheres grávidas, deve-se evitar a coleta endocervical. A fim de garantir a eficácia dos resultados, a mulher deve evitar relações sexuais um dia antes do exame, não usar duchas, medicamentos vaginais ou anticoncepcionais locais nos três dias anteriores ao exame e não se submeter ao exame durante o período menstrual (INCA, 2001).

Na citologia de monocamada, a própria escovinha utilizada para a esfoliação celular é enviada para exame dentro de um saco plástico. No laboratório, o material colhido é colocado numa centrífuga. O aparelho separa todos os elementos que podem dificultar o diagnóstico, como muco cervical e leucócitos. O resultado é um concentrado de células que serão colocadas sobre a lâmina do microscópio em uma camada fina e uniforme. Dessa forma, além de a amostra representar de forma fiel o colo do útero, as alterações celulares tornam-se mais evidentes (Revista Veja, 1996; FDA, 2001; Pró-Célula, 2001).

Quando fazer o preventivo

Toda mulher com vida sexual ativa deve se submeter periodicamente ao exame preventivo, do início da sua vida sexual aos 60 anos de idade. Inicialmente o exame deve ser feito a cada ano. Se dois exames anuais seguidos apresentarem resultado negativo para displasia ou neoplasia, o exame pode passar a ser feito então a cada três anos. O exame também deve ser feito nas seguintes eventualidades: período menstrual prolongado, além do habitual, sangramentos vaginais entre dois períodos menstruais, ou após relações sexuais ou lavagens vaginais. O exame deve ser feito 10 ou 20 dias após a menstruação, pois a presença de sangue pode alterar o resultado. Mulheres grávidas também podem realizar o exame. Neste caso, são coletadas amostras do fundo-do-saco, vagina posterior e da ectocérvice, mas não da endocérvice, para não estimular contrações uterinas (INCA, 2001).

SINTOMAS

Quando não se faz prevenção e o câncer do cólo do útero não é diagnosticado em fase inicial, ele progredirá ocasionando sintomas. Os principais sintomas do câncer do colo do útero já localmente invasivo são o sangramento no início ou no fim da relação sexual e a ocorrência de dor durante a relação (INCA, 2001).

Método Papanicolaou

1. Limitações na coleta do Papanicolaou convencional
(FDA, 2001; Pró-Célula, 2001)

- Só 10% ou 20% das células colhidas são colocadas na lâmina;
- A lâmina deve ser apropriadamente fixada em 15 a 30 segundos;
- Esfregaços irregulares (extensão e distribuição do material), esfregaços espessos, purulentos, intensa citólise, dessecamento da amostra, esfregaços hemorrágicos, lâminas fragmentadas;
- Dificuldades no controle de qualidade.

2. Falso-negativos do Papanicolaou convencional
(FDA, 2001; Pró-Célula, 2001; Sogimig, 2001)

Causas dos resultados falsos negativos (15% a 54% das lesões cervicais não são detectadas pelo método convencional):

- Lesões epiteliais que forneçam amostra celular escassa (lesões ceratinizadas, displasia muito leve, lesões pequenas, mucosa ressecada, esfregaços citolíticos, ducha vaginal, parte da amostra fica na espátula e/ou escova), deficiência no controle de qualidade;
- Artefatos criados pela fixação da amostra, esfregaço espesso (por sobreposição celular e muco), esfregaços hemorrágicos, muito inflamatórios (purulentos inclusive), muito muco, restos celulares, material necrosado, pode causar interpretação subjetiva.

3. Falso-positivos e amostras insatisfatórias do método convencional
(FDA, 2001; Pró-Célula, 2001)

Os resultados falsos-positivos do método convencional:

- Causam a volta da paciente para repetir a coleta da amostra;
- Resultam em custos adicionais;
- Resultam em ansiedade da paciente.

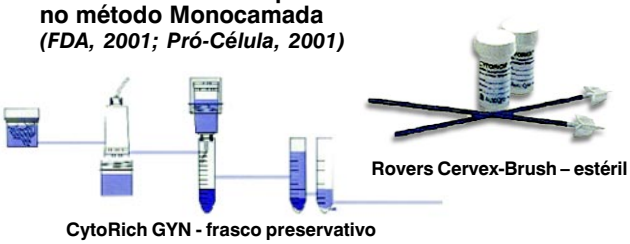
Método de monocamada

A metodologia da monocamada minimiza os problemas causados pelo excesso de muco, sangue e restos celulares. O exame consiste em processar a amostra acondicionada em líquido conservante, com centrifugações seriadas, e finalizando na utilização do *"pellet"* livre dos grandes interferentes. O Kit contém reagentes e aparelhos necessários para processar 480 amostras (DMED, 2001).

1. Solução de coleta
(FDA, 2001; Pró-Célula, 2001)

- 100% das células colhidas ficarão preservadas para análise;
- Procedimento tão fácil quanto o convencional;
- Da escova direto para o frasco preservativo com células preservadas sem artefatos;
- Amostra preservada em temperatura ambiente permanece estável por 60 dias.

2. Material necessário para coleta da amostra no método Monocamada
(FDA, 2001; Pró-Célula, 2001)



Rovers Cervex-Brush – estéril

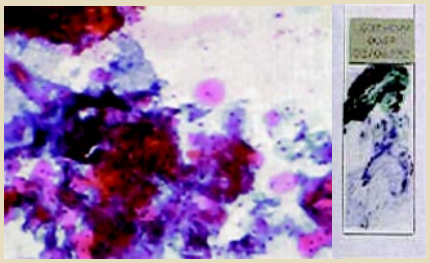
CytoRich GYN - frasco preservativo

3. Processamento da amostra
(Pró-Célula, 2001)

- Simples, sem necessidade de pessoal adicional;

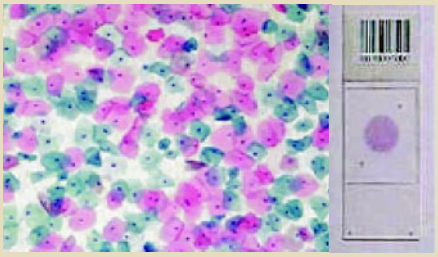
- Amostra será limpa de muco, excesso de leucócitos, etc. - simples, rápido, mais preciso na leitura;
- O *pellet* é estável por 14 meses, para fazer lâminas adicionais com corantes especiais, ou outros exames como biologia molecular (PCR, Captura Híbrida, imunocitoquímica).

Papanicolaou Convencional



Esfregaço espesso (sobreposição celular), distribuído irregularmente.

Citologia de Monocamada



Monocamada, fundo limpo e de fácil identificação dos elementos celulares

FIG. 1 - Resultados dos dois métodos: Papanicolaou e Monocamada. - Fonte: *Pró-Célula*, 2001.

4. Vantagens do método Monocamada em relação ao Papanicolaou *(FDA, 2001; Pró-Célula, 2001)*

- Permite ao patologista ler e interpretar com facilidade, as células atípicas na amostra. Em Novembro de 1996, o governo dos EUA, concordou que o método é mais efetivo e seguro em 65%, no diagnóstico de células pré-cancerosas, que podem se transformar em câncer;
- Possibilita uma redução de 44% na incidência de amostras limitadas e redução de 39% de amostras insatisfatórias;
- Permite eficiência mais elevada na detecção de alterações epiteliais cérvico-uterina relacionadas com o câncer e lesões precursoras;
- O mesmo tempo que se gasta na leitura de uma lâmina com amostra (sem atipias celulares) pelo método convencional, pode-se ler de 3 a 5 pelo método Monocamada.

CONCLUSÃO

A citologia de monocamada permite ao patologista ler e interpretar com facilidade, as células atípicas na amostra. Em Novembro de 1996, o governo dos EUA, concordou que o método é mais efetivo e seguro em 65%, no diagnóstico de células pré-cancerosas, que podem se transformar em câncer, reduz em 44% na incidência de amostras limitadas e redução de 39% de amostras insatisfatórias, possibilita uma eficiência mais elevada na detecção de alterações epiteliais cérvico-uterina relacionadas com o câncer e lesões precursoras e no mesmo tempo que se gasta na leitura de uma lâmina com amostra (sem atipias celulares) pelo método convencional, pode-se ler de 3 a 5 pelo método Monocamada.

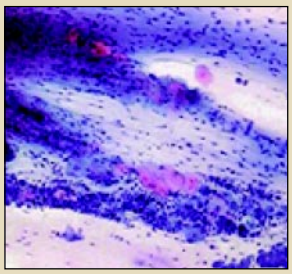
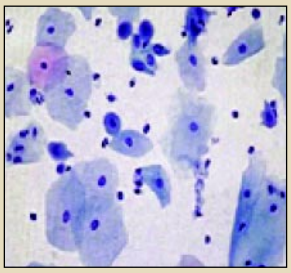
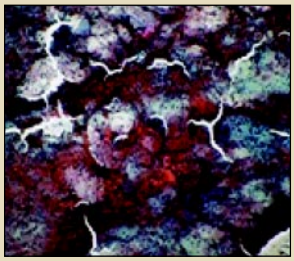
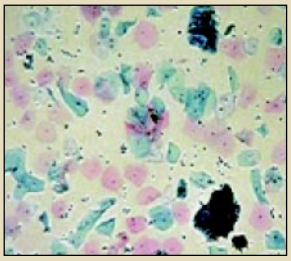
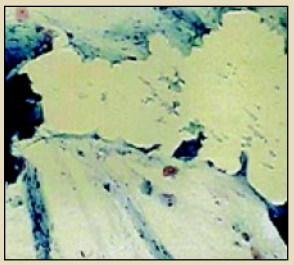
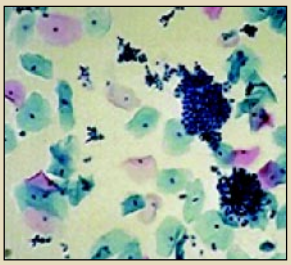
Papanicolaou Convencional	Citologia de Monocamada
	
Massa grossa e confluente de células escamosas enchendo metade do espaço do campo. Sobreposição, excesso de muco mesclado com leucócitos, dificultam ou mesmo impossibilitam a análise dos elementos celulares individualizados.	A lâmina mostra a predominância de células intermediárias, algumas células epiteliais escamosas superficiais e metaplásicas, que estão acompanhadas de poucas células inflamatórias distribuídas em monocamada contra um fundo limpo.
	
O esfregaço convencional espessado, entrecortado por artefatos quebradiços e agrupamentos de células epiteliais com um fundo obscurecido por sangue, muco e leucócitos.	Lâmina com grupos de células colunares endocervicais, bem distribuídas entre células escamosas intermediárias e superficiais; fundo com pequeno número de células inflamatórias, ocasionais células metaplásicas e endocervicais colunares separadas.
	
Esfregaço de baixa celularidade por excesso de muco: poucas células epiteliais escamosas podem ser identificadas contra um fundo de muco espesso.	Monocamada bem definida de células endocervicais colunares normais agrupadas, alguns neutrófilos que tendem a formar agrupamentos. Células epiteliais escamosas intermediárias, bem distribuídas, contra um fundo claro.

FIG. 2 - Comparação visual entre o método Papanicolaou e Monocamada. - Fonte: *Pró-Célula*, 2001.

REFERÊNCIAS

1. **Coalizão Nacional de Câncer Cervical.** Disponível em: *http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/00050479.htm*, 2001.
2. **DMED, Material Médico.** Disponível em: *http://www.dmed.com.br/capricorn1.htm#TOP1*, 2001.
3. **FDA.** Food and Drug. Disponível em: *http://www.fda.com*, 2001.
4. **INCA.** Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: *http://www.inca.org.br*, 2001.
5. **INCA.** Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: *http://www.inca.org.br*, 2003.
6. **Pró-Célula - Exames Citopatológicos.** Disponível em: *http://www.pro-celula.com.br/index.htm*, 2001.
7. **Revista Veja, Saúde.** Edição 1697, São Paulo: Editora Abril S.A., 1996.
8. **Silva, S. A., Ropelatto, C., Fillippini, A. F. C., Bianchini, E., Thiesen, K., Heck, H. V., Tenconi, P., Haas, P.** Papiloma vírus humano como fator epidemiológico central no câncer de colo de útero, 2000. *NewsLab*. Edição 43 – 2000, São Paulo: Editora Sky/Anima, 2000.
9. **SOGIMIG.** Sociedade de Obstetrícia e Ginecologia de Minas Gerais. Disponível em: *http://www.sogimig.org.br*, 2001.
10. **Tenconi, P.; Becker, T.; Pasini, A., Haas, P.** Estudo da incidência de câncer de colo de útero nas regiões da grande Florianópolis e Sul do Estado de Santa Catarina e análise da metodologia utilizada para realização do exame, 2000. *NewsLab*. Edição 40 – 2000, São Paulo: Editora Sky/Anima, 2000.

Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral

Laboratory preservation of filamentous fungi by mineral oil method

Paulo Murillo Neufeld[1] & Maria Inêz de Moura Sarquis[2]

RESUMO – A preservação de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral foi avaliada. Noventa e duas amostras de fungos foram mantidas sob óleo mineral estéril à temperatura ambiente por um período máximo de 38 anos na Coleção de Culturas do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. A taxa de viabilidade geral foi de 65,2% e o percentual de recuperação por grupo de fungo foi de 60% para os Ascomycota, 81,2% para os Zygomycota, 61,9% para os fungos anamórficos (80% para os anamorfos demáceos e 48,8% para os anamorfos hialinos). Neste trabalho, a longevidade das culturas preservadas oscilou entre 1 e 20 anos. A técnica do óleo mineral é de fácil aplicação, de baixo custo e adequada a estocagem de vários grupos de fungos.

PALAVRAS-CHAVE – Fungos filamentosos, óleo mineral, preservação, viabilidade.

SUMMARY *– The preservation of filamentous fungi by mineral oil method was evaluated. Ninety-two fungal samples were kept under sterile mineral oil at room temperature for a maximum period of 38 years in the Culture Collection of Oswaldo Cruz Institute. The general viability rate was 65.2% and the recovery percentage for fungal group was 60% for the Ascomycota, 81.2% for the Zygomycota, and 61.9% for the anamorphic fungi (80% for the dematiaceous anamorphs and 48.8% for the hyaline anamorphs). In this study, the longevity of the preserved cultures ranged between 1 and 20 years. The mineral oil technique is easy to apply, low costing and suitable to storage of various fungi groups.*

KEYWORDS *– Filamentous fungi; mineral oil; preservation; viability.*

INTRODUÇÃO

A cultura de fungos é um elemento essencial na produção de alimentos, fármacos e químicos; nos ensaios sobre a qualidade, potência e segurança de muitos produtos usados no diagnóstico e tratamento de micoses que afetam o homem e os animais; nos estudos taxonômicos e comparativos de novos isolados e no treinamento de pessoal especializado (Haynes *et al*., 1955). Contudo, para o desenvolvimento de todas essas atividades é necessária a preservação de cepas em bom estado de higidez (Heckly, 1978).

A preservação de culturas fúngicas tem como objetivo manter a completa viabilidade e estabilidade dos organismos estocados (Smith e Onions, 1983). Isso é conseguido basicamente pela paralisação ou o retardamento do metabolismo celular (Grivell e Jackson, 1969). Nesse sentido, inúmeros processos físicos podem ser utilizados: estocagem sob óleo mineral esterilizado (Buell e Weston, 1947); estocagem em água destilada esterilizada (Castellani, 1967); estocagem em terra argilosa esterilizada (Bakerspigel, 1953); liofilização (Raper e Alexander, 1945); congelamento a baixas temperaturas (Carmichael, 1956) e nitrogênio líquido (Hwang, 1960).

A técnica de preservação sob óleo mineral tem sido indicada como eficiente na manutenção de culturas fúngicas (Cavalcanti, 1990). Esse método consiste em se cobrir uma cultura jovem e vigorosa, que esteja se desenvolvendo em meio sólido adequado, com uma camada de 1 cm de altura de óleo mineral esterilizado por autoclavação (Wernham, 1946; Stockdale *et al*., 1989). A camada de óleo previne a desidratação das culturas e, pela redução da tensão do oxigênio, diminui a atividade metabólica e o crescimento dos fungos (Buell e Weston, 1947; Edwards *et al*., 1947).

O primeiro a informar o uso do óleo mineral como preservativo de culturas fúngicas foi Sherf (1943). Posteriormente, outros autores também relataram a aplicação do óleo mineral na armazenagem de culturas de fungos de diversas origens taxonômicas (Hesseltine *et al*., 1960; Perrin, 1979; Zhongqing e Yanyan, 1981; Lal e Mathur, 1989). O propósito do presente trabalho é avaliar a viabilidade e estabilidade morfológica de 92 cepas de fungos filamentosos estocados sob óleo mineral no período de 1960 à 1998.

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismos: um total de 92 isolados fúngicos compreendendo 5 cepas de Ascomycota, 16 cepas de Zygomycota e 71 cepas de fungos anamórficos (30 cepas de anamorfos demáceos e 41 cepas de anamorfos hialinos) preservados em camada alta de *Potato Dextrose Agar* (PDA) sob óleo mineral à temperatura ambiente na Coleção de Cultura de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, por longos períodos de tempo, foram avaliados.

Recebido em 17/2/2003
Aprovado em 17/4/2003
[1]Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
[2]Laboratório de Coleção de Culturas, Departamento de Micologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Viabilidades: as culturas estocadas foram removidas do óleo mineral e subcultivadas em *Sabouraud Dextrose Agar* - SDA (Oxoid, Hampshire, England) e *Potato Dextrose Agar* - PDA (Oxoid, Hampshire, England) e mantidas à temperatura ambiente por períodos de até um mês para a determinação das viabilidades (Borba *et al*., 1992).

Morfologia: microcultivos em lâmina (Riddel, 1950) foram procedidos para a avaliação da estabilidade morfológica dos subcultivos viáveis.

RESULTADOS

Sessenta (65,2%) das 92 cepas examinadas permaneceram viáveis e mantiveram inalterados os seus principais aspectos micromorfológicos. A longevidade das culturas com data de estocagem conhecida sob óleo mineral variou entre 1 e 20 anos. Os grupos de fungos estudados, as datas de preservação dos isolados e as viabilidades sob óleo mineral são apresentados na Tabela I. Considerando individualmente cada grupo de fungo, observou-se que das 5 cepas de Ascomycota, 3 (60%) permaneceram viáveis depois de 6 a 18 anos de estocagem; das 16 cepas de Zygomycota, 13 (81,2%) permaneceram viáveis depois de 3 a 16 anos de estocagem sob óleo mineral; das 71 cepas de fungos anamórficos, 44 (61,9%) permaneceram viáveis depois de 1 a 20 anos de estocagem. Dentro dos anamorfos, a avaliação em separado das viabilidades dos fungos demáceos e hialinos mostrou que das 30 cepas de fungos demáceos, 24 (80%) mantiveram-se viáves depois de 5 a 20 anos de estocagem; e das 41 cepas de fungos hialinos, 20 (48,8%) mantiveram-se viáveis depois de 1 a 16 anos de estocagem. As cepas com data de preservação desconhecida apresentaram taxa de viabilidade de 36%.

As cepas que apresentaram as maiores longevidades foram, entre os Ascomycota: *Pseudoallescheria boydii*-IOC 2996 (16 anos) e *Pseudoallescheria boydii*-IOC3672 (18 anos); entre os Zygomycota: *Cunninghamella echinulata*-IOC3143 (16 anos), *Cunninghamella echinulata*-IOC3697 (16 anos), *Mucor circinelloides*-IOC3299 (16 anos), *Mucor hiemalis*-IOC2232 (16 anos), *Mucor mucedo*-IOC1013 (16 anos) e *Rhizopus microsporus*-IOC3771 (14 anos); entre os fungos demáceos: *Bipolares* sp.-IOC3742 (14 anos), *Cladophialophora carrionii*-IOC3750 (14 anos), *Exophiala der-*

TABELA I
Viabilidade dos cultivos preservados sob óleo mineral

Fungos	IOC Nº	Data de preservação	Viabilidade
Ascomycota			
Chaetomium sp.	3800	d	(-)
Emmericella nidulans	3888	1992	(+)
Leptosphaeria senegalensis	3773	1984	(-)
Pseudoallescheria boydii	2996	1982	(+)
Pseudoallescheria boydii	3672	1980	(+)
Zygomycota			
Absidia corymbifera	2131	d	(-)
Absidia corymbifera	2132	d	(+)
Absidia corymbifera	2134	d	(+)
Absidia corymbifera	2135	d	(+)
Absidia glauca	4035	1995	(-)
Circinella sp.	4034	1995	(+)
Conidiobolus Coronatus	3808	1989	(+)
Cunninghamella echinulata	3143	1982	(+)
Cunninghamella echinulata	3697	1982	(+)
Mucor circinelloides	3299	1982	(+)
Mucor hiemalis	2232	1982	(+)
Mucor mucedo	1013	1982	(+)
Mucor sp.	4033	1995	(+)
Rhizopus microsporus	3771	1984	(+)
Rhizopus microsporus	3801	1988	(+)
Rhizopus stolonifer	1805	1982	(-)
Anamorfos demáceos			
Alternaria alternata	3922	1992	(+)
Alternaria solani	3869	d	(-)
Bipolares sp.	3742	1984	(+)
Cladosporium carrionii	3750	1984	(+)
Cladosporium cladosporioides	4010	d	(-)
Cladosporim herbarum	3979	1993	(+)
Curvularia clavata	3876	1991	(+)
Curvularia trifolii	3934	1993	(+)
Drechslera australiensis	3804	1988	(+)
Drechslera sacchari	3939	1993	(+)
Epiccocum nigrum	3868	1990	(+)

Fungos	IOC Nº	Data de preservação	Viabilidade
Anamorfos demáceos			
Exophiala jeanselmei	3747	1984	(+)
Exophiala dermatitidis	3772	1984	(+)
Exophiala werneckii	3881	1991	(+)
Exophiala spinifera	3686	1980	(+)
Fonsecaea compacta	3687	1980	(+)
Fonsecaea pedrosoi	3759	1984	(+)
Helminthosporium sp.	3137	1981	(+)
Humicola fuscoatra	3907	1993	(-)
Madurella grisea	3378	d	(+)
Madurella mycetomatis	3776	1984	(+)
Nigrospora sphaerica	3904	1992	(+)
Phialophora richardsiae	3887	1992	(-)
Phialophora verrucosa	1993	1978	(+)
Phialophora verrucosa	3744	1984	(+)
Piedraia hortae	3754	1984	(+)
Rhinocladiella atrovirens	3910	1993	(+)
Rhinocladiella cellaris	3892	1992	(-)
Scopulariopsis brevicaulis	3923	1992	(-)
Stachybotrys citrus	3846	1990	(+)
Anamorfos hialinos			
Acremonium nepalense	3938	1993	(-)
Acremonium recifei	1669	1982	(-)
Acremonium strictum	3937	1993	(-)
Aspergillus clavatus	4013	1994	(-)
Aspergillus flavus	3974	1994	(-)
Aspergillus flavus	4102	1997	(-)
Aspergillus flavus	4123	1997	(+)
Aspergillus fumigatus	3941	1992	(-)
Aspergillus fumigatus	4091	1997	(-)
Aspergillus giganteus	3960	1994	(+)
Aspergillus nidulans	3696	d	(-)
Aspergillus niger	4003	1994	(+)
Aspergillus tamarii	4005	1994	(+)
Aspergillus terreus	4007	1994	(+)

(continuação)

TABELA I
Viabilidade dos cultivos preservados sob óleo mineral

Fungos	IOC Nº	Data de preservação	Viabilidade
Anamorfos hialinos			
Chrysosporium inops	2579	d	(-)
Emmonsia crescens	3756	1984	(-)
Emmonsia parva	2915	1960	(-)
Fusarium moniliforme	4063	1995	(-)
Fusarium oxysporum	4069	1995	(+)
Fusarium solani	4066	1995	(-)
Fusarium sporotrichoides	4089	1997	(+)
Gliocladium roseum	4094	1997	(+)
Gliocladium catenulatum	3968	1994	(-)
Graphium penicillioides	3870	1990	(-)
Monilia sitophila	3933	1993	(+)
Paecilomyces clavisporus	4095	1997	(+)
Paecilomyces variotii	4103	1997	(-)
Paecilomyces viridis	3760	1984	(-)
Penicillium chrysogenum	4101	1997	(+)
Penicillium citreonigrum	3931	1993	(+)
Penicillium griseofulvum	3972	1992	(+)
Penicillium puberulum	3953	1994	(+)
Penicillium purpurogenum	4143	1997	(+)
Penicillium viridicatum	3912	1992	(+)
Phoma jolyana	3894	1992	(+)
Pyrenochaeta romeroi	3695	1982	(-)
Scedosporium apiospermum	2796	1982	(+)
Scedosporium apiospermum	3767	1984	(+)
Trichoderma aureoviride	3842	1990	(+)
Trichoderma polysporum	3854	1990	(-)
Verticillium dahliae	3324	d	(-)

Nota: (+) viabilidade positiva; (-) viabilidade negativa; d, data de estocagem desconhecida.

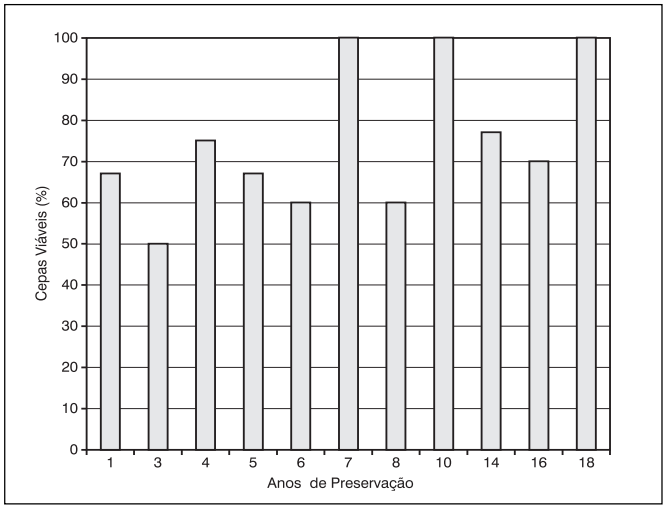


FIG. 1 - Taxa de viabilidade anual

matitidis-IOC3772 (14 anos), *Exophiala jeanselmei*-IOC3747 (14 anos), *Exophiala spinifera*-IOC3686 (16 anos), *Fonsecaea pederosoi*-IOC3687 (16 anos), *Fonsecaea pedrosoi*-IOC3759 (14 anos), *Helminthosporium* sp.-IOC3137 (17 anos), *Madurella mycetomatis*-IOC3776 (14 anos), *Phialophora verrucosa*-IOC1993 (20 anos), *Phialophora verrucosa*-IOC3744 (14 anos), *Piedraia hortae*-IOC3754 (14 anos); entre os fungos hialinos: *Scedosporium apiospermum*-IOC2796 (16 anos), *Scedosporium apiospermum*-IOC3767 (14 anos) e *Pyrenochaeta romeroi*-IOC3695 (16 anos). Contudo, os isolados de *Aspergillus flavus*-IOC4123, *Aspergillus fumigatus*-IOC4091 e *Paecilomyces variotii*-IOC4103 não sobreviveram, depois de apenas um ano de preservação sob óleo mineral. A cepa *Emmonsia parva*-IOC-2915 não apresentou viabilidade depois de 38 anos de armazenamento. A Figura 1 mostra a taxa de viabilidade anual das cepas com data de estocagem conhecida.

DISCUSSÃO

A técnica do óleo mineral é largamente empregada na preservação de culturas de fungos de interesse médico e industrial. Avaliações sobre o comportamento dos diferentes gêneros e espécies fúngicas, frente ao tratamento com o óleo mineral, portanto, são fundamentais para uma melhor aplicação da técnica e obtenção de resultados mais satisfatórios.

Elevadas taxas de sobrevivência sob óleo mineral têm sido relatadas por diversos investigadores (Gutter e Barkai-Golan, 1967; Little e Gordon, 1967; Tandon *et al.*, 1987). Os resultados aqui obtidos mostram que depois de um período máximo de 38 anos de preservação, 65,2% de todos os isolados apresentaram viabilidades e mantiveram estáveis seus atributos morfológicos mais importantes. Segundo Mendes da Silva *et al.* (1994), os mecanismos envolvidos na sobrevivência da célula fúngica durante o processo de preservação sob óleo mineral são muito complexos e pouco conhecidos. Contudo, está bem estabelecido que o óleo mineral previne a perda de água e reduz a quantidade de oxigênio disponível, diminuindo o metabolismo celular (Buell e Weston, 1947; Edwards *et al.*, 1947). Com isso, ocorre um menor acúmulo de substâncias tóxicas e deletéreas que podem afetar a viabilidade e estabilidade do organismo preservado (Hartsell, 1956).

Dos três grupos de fungos estudados, os Mucorales foram os que apresentaram as maiores taxas de viabilidade sob óleo mineral. Schönborn (1989) também obteve bons níveis de viabilidade para Zygomycota da ordem Mucorales estocados por esse método. Cepas de *Mucor* e *Rhizopus* testadas por Smith e Onions (1983) apresentaram igualmente viabilidade com bom crescimento e esporulação, após 19-20 anos de preservação. Fennel *et al.* (1950), em estudo comparativo com 245 culturas de Mucorales preservadas por liofilização, em terra de jardim, sob óleo mineral e por subcultivos periódicos, demonstraram que esse grupo de fungos responde bem ao uso do óleo mineral como preservativo.

Níveis intermediários de viabilidades foram observadas para o grupo dos Ascomycota. Todavia, Tandon *et al.* (1987), trabalhando com alguns Ascomycota entre outros fungos, informaram que esse grupo pode ser convenientemente mantido sob óleo mineral com bons padrões de sobrevivência e livres de contaminações por ácaros. Crescimento e esporulação de boa qualidade foram da mesma forma relatados por Smith e Onions (1983) para a maioria dos Ascomycota testados. De acordo com Cavalcanti (1990), o método parece ser eficiente também para a preservação de Basidiomycota.

Os menores percentuais de cepas viáveis sob óleo mineral foram encontrados nos fungos anamórficos. Resultados positivos quanto à viabilidade das culturas anamórficas estocadas sob óleo mineral, contudo, têm sido freqüentemente relatados por outros autores (Ajello *et al*., 1951; Fernandes, 1982; Lima, 1990; Neufeld, 2000). Apesar dos baixos percentuais de sobrevivência observados para este grupo, a análise individual das viabilidades mostrou taxas bastante elevadas para os fungos anamórficos demáceos e taxas relativamente modestas para os fungos anamórficos hialinos. Os fatores que determinaram essa grande diferença entre os percentuais de recuperação dos dois grupos não estão muito claros, tendo vista serem semelhantes as datas de preservação sob óleo mineral. Todavia, interferências nas viabilidades dos isolados podem ocorrer em função de inóculos constituídos por células senescentes; características genéticas e individuais; período do ciclo biológico em que houve a paralização ou retardamento do metabolismo; e acúmulo de metabólitos tóxicos ou de indutores de transformações morfo-fisiológicas (Borba *et al.*, 1992; Fennel, 1960; Heckly, 1978; Mendes da Silva *et al*., 1994)

A taxa de viabilidade anual das cepas estocadas sob óleo mineral foi variável, não sendo possível estabelecer correlações entre viabilidade e ano de preservação dentro ou entre os grupos de fungos estudados. Muitos dos fatores que interferem com a sobrevivência das cepas podem estar aqui também envolvidos. Entretanto, segundo Capriles *et al*. (1989), o estado da cepa no momento do tratamento com o preservativo fúngico e as condições de armazenagem são pontos críticos e condicionam fortemente o percentual de viabilidade.

Algumas técnicas, como a liofilização (Ellis e Roberson, 1968) e o nitrogênio líquido (Hwang, 1966), apresentam melhores rendimentos do que o óleo mineral (Butterfield *et al*., 1974). Porém, o valor dessa técnica reside no fato de poder ser empregada por qualquer tipo de laboratório, inclusive como uma técnica suplementar, já que é de fácil execução, não onerosa e indicada para a preservação de um grande número de espécies de fungos.

BIBLIOGRAFIA

1. **Ajello, L.; Grant, V. Q.; Gutzke, M. A.** Use of mineral oil in the maintenance of cultures of fungi pathogenic for humans. *Archives of Dermatology and Syphilology.* 63: 747-749, 1951.
2. **Bakerspigel, A.** Soil as a storage medium for fungi. *Mycologia.* 45:596-604, 1953.
3. **Borba, C. M.; Mendes da Silva, A. M.; Oliveira, P. C.**1992. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporotrix schenkii* strains. *Mycoses.* 35:185-188.
4. **Buell, C. B.; Weston, W. H.** Application of the mineral oil conservation method to maintaining collection of fungous cultures. *American Journal of Botany.* 34:555-561, 1947.
5. **Butterfield, W.; Jong, S. C. and Alexander, M. T.** Preservation of living fungi pathogenic for man and animal. *Canadian Journal of Microbiology.* 20:1665-1673, 1974.
6. **Capriles, C. H.; Mata, S.; Middelveen, M.** Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia.* 106:73-79, 1989.
7. **Carmichael, J. W.** Frozen storage for stock cultures of fungi. *Mycologia.* 46:378-381, 1956.
8. **Castellani, A.** Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 70:181-184, 1967.
9. **Cavalcanti, M. A. Q.** Viabilidade de culturas de Basidiomycotina preservados em óleo mineral. *Revista Latinoamericana de Microbiologia.* 32:265-268, 1990.
10. **Edwards, G. A.; Buell, C. B.; Weston, W. H.** The influence of mineral oil upon the oxygen consumption of *Sordaria fimicola*. *American Journal of Botany.* 34:551-555, 1947.
11. **Ellis, J. J.; Roberson, J.** Viability of cultures preserved by lyophilization. *Mycologia.* 9(2):399-405, 1968.
12. **Fennel, D. I.** Conservations of fungous cultures. *Botanical Reviews.* 26:79-141, 1960.
13. **Fennel, D. I.; Raper, K. B. and Flickinger, M. H.** Further investigations on the preservation of mold cultures. *Mycologia.* 42:135-147, 1950.
14. **Fernandes M. J. S.** Preservação dos fungos Dematiaceae em óleo mineral. *Revista de Microbiologia.* 13(3): 211-214, 1982.
15. **Grivell, A. R.; Jackson, J. F.** Microbial culture preservation with silica gel. *Journal of General Microbiology.* 8:423-425, 1969.
16. **Gutter, Y.; Barkai-Golan, R.** Observations on some fungi and other microorganisms preserved under mineral oil for 15 years. *Israel Journal of Botany.* 16:105-107, 1967.
17. **Hartsell, S. E.** Maintenance of cultures under paraffin oil. *Applied Microbiology.* 4:350-355, 1956.
18. **Haynes, W. C.; Wickerhan, L. J.; Hesseltine, C. W.** Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Applied Microbiology 3:361-372, 1955.
19. **Heckly, R. J.** Preservation of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology.* 24:1-53, 1978.
20. **Hesseltine, C. W.; Bradle, B. J.; Benjamin, C. R.** Further investigation on the preservation of molds. *Mycologia.* 52:762-774, 1960.
21. **Hwang, S. W.** Effects of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia.* 52:527-529, 1960.
22. **Hwang, S. W.** Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Applied Microbiology.* 14:784-788, 1966.
23. **Lal, S. P.; Mathur, N.** Preservation of culture of fungi and Actinomycetes under liquid paraffin. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology.* 19(1):196, 1989.
24. **Lima D. M. M.** Preservação de espécies de *Fusarium* sob óleo mineral. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 26(6):853-855, 1991.
25. **Little, G. N.; Gordon, M. A.** Survival of fungus cultures maintained under mineral oil for twelve years. *Mycologia.* 59:733-736, 1967.
26. **Mendes da Silva, A. M.; Borba, C. M.; Oliveira, P. C.** Viability and morphological alterations of *Paraccocidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. *Mycoses.* 37:165-169, 1994.
27. **Neufeld, P. M.** Preservação em laboratório de cepas fúngicas sob óleo mineral. *Resumos do XXVII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.* pág. 154, 2000.
28. **Perrin, P. W.** Long-term storage of cultures of wood-inhabiting fungi under mineral oil. *Mycologia.* 71:867-869, 1979.
29. **Raper, K. B.; Alexander, D. F.** Preservation of molds by the lyophil process. *Mycologia.* 37:499-525, 1945.
30. **Riddel RW.** Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia.* 42:265-270, 1950.
31. **Schönborn, C.** Beobachtungen über Langzeit-Überleben von Dermatophyten und Schimmelpilzen unter Paraffinöl. *Mycoses.* 32(2): 349-353, 1989.
32. **Sherf, A. F.** A Method for maintaining *Phytomonas sepedonica* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology.* 33:330-332, 1943.
33. **Smith, D.; Onions, A. H. S.** Comparison of some perservations techniques for fungi. *Transactions of British Mycologycal Society.* 81(3):535-540, 1983.
34. **Stockdale, P. M.; Smith, D.; Campbell, C. K.** The maintenance and preservation of fungi. *In:* **Evans, E. G. V.; Richadson, M. D. (ed.).** *Medical Mycology: a practical approach.* Oxford: IRL Press. p. 187-200, 1989.
35. **Tandon, G. P.; Dayal, H. M.; Mehta, K.; Pant, H. C.; Pandey, R. S.; Trivedi, J. P.** Observation on preservation of fungal cultures by serial subculturing and liquid paraffin. *Current Science.* 56(17): 895-896, 1987.
36. **Wernhmam, C. C.** Mineral oil as a fungus culture preservative. *Mycologia.* 38:691-692, 1946
37. **Zhongqing, L.; Yanyan, C.** An evaluation of mineral oil seal for preservation of Basidiomycetes cultures. *Acta Microbiologica Sinica.* 21(1): 52, 1981.

Endereço para correspondência
Prof. Paulo Murillo Neufeld
Laboratório de Micologia Clínica - Faculdade de Fármacia - UFRJ
CCS, Bl. A, 2º andar, sala 25
Cidade Universitária, Rio de Janeiro - RJ - 21941-590
E-mail: pneufeld@pharma.ufrj.br

III Encontro de Militares da Área de Análises Clínicas

Os preparativos para o próximo encontro já estão em andamento, podendo os contatos serem feitos através do Rio de Janeiro e Ceará.

Rio de Janeiro
Dr. Rogério Dias
Tel.:(0xx21)3657-1984 e 9965-1307
E-mail: equipedias@aol.com

Ceará
Dr. Francisco Einstein Nascimento
Tel.:(0xx85)256-2867
e-mail: einstein@mcanet.com.br

Avaliação citológica da mucosa nasal de portadores *de Staphylococcus aureus*[*]

Staphylococcus aureus' carriers nasal mucosal cytologic evaluation

Daniella Marques Tellarolli[1]; Naidileia Cristina Ferreira[1]; Maria Stella Gonçalves Raddi[2] & Christiane Piena Soares[2]

RESUMO – Voluntários (32) que atuam profissionalmente na recepção de Postos de Saúde da cidade de Araraquara participaram desse estudo. Para a coleta do lavado nasal, 5 mL de solução salina estéril foram instilados em cada narina e recolhidos em recipiente estéril. O fluído recuperado foi centrifugado e o sedimento ressuspendido em solução fisiológica (1,5 mL). Uma alíquota foi cultivada em agar sangue de carneiro (5%) objetivando o isolamento de *S. aureus*. As cepas isoladas foram submetidas ao teste de susceptibilidade a alguns antimicrobianos. A contagem total de células presente foi realizada em câmara de Neubauer e a citologia diferencial através de esfregaços corados pelo método de Grunwald-Giemsa. Os resultados demonstraram que portadores do microrganismo apresentam neutrófilos polimorfonucleares em quantidade significativamente aumentada em relação aos não portadores, indicando resposta celular aguda. *S. aureus* é o agente mais comum de infecções piogênicas e apresentam vários componentes de superfície que contribuem para a quimiotaxia de leucócitos, justificando assim o aumento desse tipo celular.

PALAVRAS-CHAVE – *Staphylococcus aureus,* portadores, lavado nasal, citologia.

SUMMARY *– Volunteers (32), who attend patients in Public Health Centers of Araraquara (SP), were recruited to participate in this study. To collect the nasal wash samples, five milliliters of sterile saline solution were instilled in each nasal cavity and placed into sterile flasks. The recuperated fluid was centrifuged and the sediment was suspended in sterile physiologic solution. An aliquot of this sample was cultured on trypticase soy agar with 5% sheep blood. The microorganisms identified as* S. aureus *were submitted to antimicrobial susceptibility testing. The total cell counting in the nasal wash was done in a Neubauer chamber and the differential cytology smears were evaluated by May Grunwald-Giemsa's methodology.* S. aureus *carriers showing more neutrophils than non-carriers, indicating acute inflammatory response.* S. aureus *also is the most common agent of piogenic infections and it surface components collaborate to leukocytes migration, explaining the high number of this type of cells.*

KEYWORDS – Staphylococcus aureus*, carrier, nasal wash, citology.*

INTRODUÇÃO

O principal reservatório de *Staphylococcus aureus* é o ser humano que quando colonizado pelo microrganismo, por um período prolongado, sem apresentar sintomas é designado de portador assintomático e, dependo da frequência com que alberga o microrganismo, de portador persistente ou intermitente[20]. Estima-se que 70% dos indivíduos carreiem esse microrganismo, como parte da microbiota nasal, em algum momento de suas vidas[13].

A colonização das fossas nasais de profissional da saúde por *S. aureus* é apontada como importante via de disseminação do microrganismo. Entretanto, a identificação e tratamento de portadores que atuam em unidades hospitalares não é rotineira, favorecendo a disseminação desse agente infeccioso[17].

Os *S. aureus* adquirem, facilmente, resistência aos antimicrobianos. Quanto maior a resistência da cepa maior condição de sobrevivência, não só em ambientes hospitalares, como também em ambientes extra-hospitalares[2]. Cerca de 70% dos *S. aureus* isolados nos principais hospitais brasileiros são resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos[16]. Várias penicilinas beta-lactamases resistentes surgiram no inicio da década de 60, entre elas, a meticilina e oxacilina que são indicadas no tratamento de infecções estafilocócicas. Entretanto, cepas resistentes a esses antimicrobianos vêm sendo isoladas e se observa que *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA) também é resistente a inúmeros outros antimicrobianos, incluindo betalactâmicos, macrolídeos, lincosaminas, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclinas, sendo a vancomicina considerada droga de escolha para o tratamento de infecções por cepas multirresistentes[5].

A aderência do microrganismo à células epiteliais da mucosa nasal é um processo complexo que requer alto grau de especificidade[18]. Vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de elucidar os fatores envolvidos no mecanismo de adesão, visto ser o evento inicial para a colonização. Esse processo envolve a interação específica de estruturas da superfície do microrganismo (adesinas) com componentes das células epiteliais do hospedeiro. A fibronectina, importante proteína da matriz, parece ser o maior ligante no estágio inicial da infecção. Um grupo de adesinas, conhecidas por "componentes da superfície bacteriana que reconhecem moléculas adesivas da matriz" (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules – MSCRAMMs*), reconhece e liga-se à fibronectina[8].

Recebido em 11/7/2003
Aprovado em 11/8/2003
[*]Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP
[1]Bolsista do Programa de Aprimoramento Profissional (FUNDAP)
[2]Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara- UNESP

A composição do fluído nasal parece influenciar no estado de portador do microrganismo[3]. A secreção respiratória consiste numa mistura de mucoglicoproteínas (mucina), produtos glandulares, proteínas plasmáticas e outras proteínas como albumina, IgG, IgA secretora, lactoferrinas, IgA não secretora, IgM e inibidores de leucoproteases[9]. A aderência *do S. aureus* à mucina, maior componente do muco nasal, é fator importante de colonização, sendo esta interação mediada por proteínas específicas[18]. Assim, a atividade antimicrobiana das secreções nasais possui papel importante na prevenção da colonização microbiana. Alterações dessas substâncias podem induzir patologias de vias aéreas, tais como bronquite e sinusite, modificando a composição da microbiota nasal. A diminuição da ação mucociliar também pode explicar a permanência do *S. aureus* na cavidade nasal, mas não tem significado direto com a multiplicação bacteriana[3].

A mucosa nasal é um ambiente biologicamente complexo. O epitélio é composto por células escamosas em vários graus de queratinização, células de epitélio transicional e epitélio colunar ciliado, incluindo células secretoras de muco (células caliciformes). Os leucócitos estão presentes em pequeno número, presumivelmente, representando uma expressão do baixo nível de inflamação da mucosa nasal, visto essas células representarem a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, poluentes e partículas atmosféricas[12].

A análise das células presentes na mucosa nasal tem sido utilizada, na clínica médica, para avaliar a resposta inflamatória em indivíduos com asma e rinite alérgica[15]. A quantidade de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) pode ser de importância fundamental na determinação de um processo infeccioso, predizendo a resposta do hospedeiro à colonização pelo microrganismo.

Nesse trabalho comparamos o perfil citológico do lavado nasal de portadores e não-portadores de *S. aureus* de profissionais atuantes na área de saúde e a susceptibilidade do microrganismo a alguns antimicrobianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Participaram do estudo 32 indivíduos que atuam profissionalmente na recepção de pacientes atendidos em Postos de Saúde da cidade de Araraquara.

Coleta do material – Os voluntários permaneceram sentados, com a cabeça inclinada para trás e 5ml de solução fisiológica estéril foi instilada em cada narina enquanto o indivíduo mantinha sua respiração suspensa. A suspensão celular com volume mínimo de 8ml, recolhida das narinas em frasco de polipropileno, foi transferida para um tubo de centrífuga e vigorosamente agitada por 1 minuto. Em seguida foi submetida à centrifugação de 3800rpm por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido num volume final de 0,5ml. O sedimento obtido foi utilizado para a execução dos exames microbiológicos e citológicos.

***Isolamento e identificação de* S. aureus -** Com auxílio da alça bacteriológica, uma alíquota do sedimento foi semeada em placas de Petri contendo agar sangue de carneiro a 5% e agar salgado manitol (Difco). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em microaerofilia (jarra de vela) após o que as colônias suspeitas foram identificadas segundo métodos usuais[10]. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (penicilina, ampicilina, oxacilina, vancomicina, cefalotina, ciprofloxacina, clindamicina, gentamicina, cloranfenicol, sulfametoxazol), pela técnica da difusão, seguiu metodologia descrita por Bauer *et al*[1].

Exame citológico do lavado nasal - A avaliação quantitativa das células presentes no material seguiu recomendações de Cruz & Carvalho[4] sendo o resultado emitido em número de células/mm^3. Para a contagem diferencial de leucócitos, com a mesma suspensão, foram confeccionados esfregaços em citocentrífuga (Citospin 248-Fanem), a 1000 rpm por 50 segundos, sobre lâminas previamente silanizadas. Após secagem, as lâminas foram coradas pelo método de May Grünwald-Giemsa. Observou-se de 100 a 400 células, dependendo do número presente, estabelecendo-se a porcentagem dos elementos celulares: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Análise estatística – O teste t de Student para duas amostras, presumindo variâncias diferentes, foi utilizado para a análises dos resultados ($p<0,05$).

RESULTADOS

A taxa de portadores de *S. aureus* nos profissionais amostrados foi de 43,8%. Das 14 cepas isoladas e submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos, 12 apresentaram o mesmo padrão de sensibilidade, sendo resistentes à penicilina e ampicilina. Duas cepas demonstraram padrões diferentes das demais, sendo uma sensível a todos antimicrobianos testados e outra apresentou resistência à penicilina, ampicilina, oxacilina, cloranfenicol, gentamicina e sulfametoxazol. A contagem das células no lavado nasal dos indivíduos amostrados é apresentada na Tabela I, diferenciando-os em grupo portador e não-portador de *S. aureus*. Observa-se que portadores de *S. aureus* demonstraram aumento significativo ($p<0,05$) no número total de leucócitos quando comparado aos não-portadores; entretanto, não houve alterações dos tipos celulares específicos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) entre os grupos (Tabela II).

TABELA I
Células presentes no lavado nasal de profissionais da saúde portadores e não-portadores de *S. aureus* dos Centros de Saúde de Araraquara

Parâmetro	Nº de células/mm^3		p
	Portadores (n=14)	Não-portadores (n=18)	
Leucócitos	118,21 ± 38,74*	31,55 ± 8,18	0,046
Células epiteliais	59,64 ± 17,04	62,77 ± 13,64	0,088
Hemáceas	12,78 ± 9,68	5,77 ± 3,17	0,501

** média ± desvio padrão*

TABELA II
Diferenciação específica dos leucócitos polimorfonucleares presentes no lavado nasal de profissionais da saúde portadores e não-portadores de *S. aureus*

Parâmetro	Nº de células/mm^3		p
	Portadores (n=14)	Não-portadores (n=18)	
Neutrófilos	95,14 ± 1,50*	93,13 ± 2,57	0,507
Eosinófilos	1,07 ± 0,85	2,93 ± 2,09	0,419
Linfócitos	3,43 ± 1,14	3,93 ± 1,20	0,771
Monócitos	0,36 ± 0,20	0 ± 0	0,096

** média ± desvio padrão*

DISCUSSÃO

A cavidade nasal é a área anatômica onde o *S. aureus* é frequentemente encontrado, sendo o portador uma importante fonte de disseminação do microrganismo[17]. Estudos recentes demonstram variações na taxa de portadores nasais persistentes e intermitentes, sendo estas de aproximadamente 20%[3] e 60%[11], respectivamente. Nesse estudo, portadores persistentes e intermitentes não foram diferenciados, sendo de 43,8% a taxa de portadores do microrganismo dentre os profissionais amostrados. Alguns trabalhos relacionam a freqüência de isolamento à densidade de colonização, idade, sexo e sasonalidade[2,7], o que poderia justificar os diferentes índices descritos na literatura.

A alta porcentagem de indivíduos colonizados por nós observada, pode estar relacionada com a técnica de coleta do material. A maioria dos trabalhos utiliza *swab*, método que não garante a amostragem de todo o vestíbulo nasal. A técnica do lavado nasal permite a retirada das células, de forma não agressiva, de toda a cavidade o que poderia justificar a alta taxa de portadores do microrganismo.

Um aspecto relacionado ao microrganismo que merece destaque, é o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas. O padrão de resistência dos microrganismos reflete a freqüência com que os antibióticos são utilizados na comunidade. Cepas sensíveis a penicilina e ampicilina, atualmente, são bastante raras. A oxacilina, introduzida por Doyle e col., em 1961, sob a designação de penicilina BRL 1400, é hoje o antimicrobino utilizado no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* penicilina e ampicilina resistentes[19], todavia a incidência de infecções por cepas resistentes vêm aumentando, principalmente quando de origem hospitalar[5]. A constatação de que profissionais colonizados disseminam o microrganismo é uma das razões para linhagens resistentes a muitos antibióticos confinarem-se em hospitais[14].

Cepas oxacilina resistentes também podem exibir resistência a vários aminoglicosídeos, incluindo a gentamicina. Nossos achados revelam a presença de *S. aureus* resistente a oxacilina e gentamicina, simultaneamente, bem como, a resistência à penicilina, ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol em um indivíduo que presta serviço em Centro de Saúde de Araraquara, demonstrando a presença de cepas multirresistentes na comunidade. Apenas uma, dentre as 14 cepas isoladas, foi sensível a todos os antimicrobianos testados.

As bactérias contam com recursos genéticos de transmissão e aquisição de resistência aos antimicrobianos que vêm superando, rapidamente, a disponibilidade de novos agentes terapêuticos. Após o reconhecimento de que a colonização nasal por *S. aureus* favorece infecções invasivas, numerosas tentativas para a erradicação do estado de portador, através da utilização de antibióticos tópicos, orais e parenterais têm sido realizadas, mostrando, contudo, ter eficácia limitada devido à recolonização do hospedeiro pelo microrganismo[18].

Nossos resultados revelam que 43% dos portadores de *S. aureus* possuiam $>10^5$ PMNs/mL de lavado nasal e apenas 5% dos indivíduos não-portadores apresentaram quantidades semelhantes. Koren, Hatch & Graham[12] avaliando lavado nasal de 200 voluntários sadios, observaram que 50% desses indivíduos possuíam $<10^4$, 10% possuíam $>10^5$, enquanto que os demais (40%) apresentaram quantidades que variaram de 10^4 a 10^5 PMN/mL.

Outros trabalhos mostram a resposta inflamatória nasal, através do aumento de PMNs, quando da inalação do ozônio, conhecido oxidante poluente do ar, sugerindo que a via aérea nasal possa servir como um marcador para os efeitos da inalação de poluentes. Graham & Koren[6] avaliam 10 voluntários, sem história de doenças respiratórias, à exposição de 0,4 ppm de ozônio. Os autores observaram aumento de 6 vezes no número de PMNs após 18 horas da exposição em relação ao material colhido dos mesmos pacientes antes da exposição. Nossos resultados mostram que portadores de *S. aureus* possuem cerca de 4 vezes mais PMNs do que os não-portadores.

Não encontramos relatos que associam a presença do *S. aureus* em portadores assintomáticos com a resposta inflamatória aguda da cavidade nasal. Esse estudo aponta que portadores do microrganismo apresentam PMNs em quantidade significativamente aumentada, indicando resposta celular aguda. O *S. aureus* é o agente mais comum de infecções piogênicas, apresentando vários componentes de superfície que contribuem para a quimiotaxia de leucócitos, sendo responsável pelo aumento desse tipo celular. Apesar dos portadores serem designados assintomáticos, eles apresentam sinais de infecção.

AGRADECIMENTOS

À Roseli Aparecida Cavestré pela compilação dos resultados e análises estatística.

REFERÊNCIA

1. **Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turkc, M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-6, 1966.
2. **Cardoso, D. D. P.** *Staphylococcus aureus*: Incidência em pacientes hospitalizados e profissionais de saúde vinculados ao Hospital das Clínicas de Goiânia/ UFG- Caracterização das amostras isoladas pela fagotipagem e antibiograma. *Rev. Pat. Trop.*, 18: 99-158, 1989.
3. **Cole, A. M.; Devan, P.; Ganz, T.** Inate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect. Immun.*, 67: 3267-75, 1999.
4. **Cruz, A. A.; Carvalho, E. M.** Citologia nasal quantitativa simplificada (CNQS). *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.*, 20:56-74, 1997.
5. **Farias, W. V. L.; Sader, H. S.; Leme, I. L.; Pignatari, A. C.** Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. *Rev. Ass. Méd. Brasil.*, 43: 199-204, 1997.
6. **Graham, D. E.; Koren, H. S.** Biomarkers of inflamation in ozone-exposed humans. *Am. Ver. Respir. Dis.*, 142: 152-6, 19990.
7. **Harrison, L. M.; Morris, J. A.; Telford, D. R.; Brown, S. M.; Jones, K.** The nasopharyngeal bacterial flora in infancy: effects of age, gender, season, viral upper respiratory tract infection and sleeping position. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.,* 1: 19-28, 1999.
8. **Joh, D.; Wann, E. R.; Kreikemeyer, B.; Speziale, P.; Hook, M.** Role of fribronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix. Biology*, 18: 211-13, 1999.
9. **Kaliner, M. A.** Human nasal host defense and sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90:424-30, 1992.
10. **Kloos, W. E. & Bannerman, T.L.** *Staphylococcus* and micrococos *In:* **Murry, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. Yolken, R. H.** (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 6ª ed, Washington: AMS Press , 1995, 1481p.
11. **Kluytmans, J.** Reduction of surgical site infections in major surgery by elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.*, 40:25-9, 1998.
12. **Koren, H. S.; Hatch, G. E.; Grahan, D. E.** Nasal lavage as a tool in assessing acute inflamation in response to inhaled pollutants. *Toxicology*, v.60, p.15-25, 1990.
13. **Marangoni, D. V.** *Staphylococcus aureus. In:* Rodrigues, **E. A. C.; Mendonça J. S.; Amarante J. M. B.; Filho, M. B. A.; Grinbaum, R. S.; Richtmann, R.** (eds). *Infecção Hospitalar*. São Paulo: Sarvier, 1997, p.573-88.
14. **Mulligan, P. K.** Americanization of our health care. *Can.Farm. Physician.* , 44: 2351-2364, 1998
15. **Peden, D. B.** The use of nasal lavage for objective measurement of irritant-induced nasal inflamation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 24: 76-8, 1996.
16. **Sader, H. S.; Pignatari, A. C.; Hollis, R. J.; Leme, I.; Jones, R. N.** Oxacillin and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 14:260-4, 1994.
17. **Santos, B. M. O.; Aguillar, O. M.; Takakura, M. S.** Colonização simultânea de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal e mãos de portadores sãos de um hospital escola. *Rev. Microbiol.*, 21:309-14, 1990.
18. **Shuter, J.; Hatcher, V. B.; Lowy, F. D.** *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. *Infect. Immun.*,.64: 310-18, 1996.
19. **Tavares, W.** *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 253-78.
20. **Vandenbergh, M. F. Q.; Yzerman, P. F.; Van Belkum, A.; Boelens, H. A. M.; Sijmons, M.; Verbrugh, H. A.** Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 3233-40, 1999.

Endereço para correspondência:
Profª Drª Christiane Pienna Soares
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP/CP 502
14801-902 - Araraquara-SP

Diversidade e perfil antimicrobiano de cepas de *Listeria* sp. e o comportamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal em um rio poluído do trópico semi-árido (Paraíba)*

Antimicrobian and profile diversity of stumps from *Listeria* sp. and indicative bacterias behavior of fecal contamination in a polluted river from semi-arid tropic (Paraíba)

Nícia Stellita da Cruz Soares[1]; Beatriz Susana O. de Ceballos[2] & Raíssa Mayer Ramalho Catão[3]

RESUMO – A detecção de *Listeria* sp. em águas superficiais apresenta particular relevância por ser uma bactéria emergente e causadora de doenças de grande interesse na saúde pública. Este trabalho objetivou avaliar a diversidade e o perfil antimicrobiano de *Listeria* sp. e o comportamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal. O local de estudo foi a microbacia do Rio Bodocongó sendo analisadas 12 amostras de água no período de dezembro de 1999 a fevereiro de 2000. Coliformes fecais foram quantificados seguindo a APHA (1998): *Listeria* sp. foi isolada em caldo LEB (24/48h 30°C), seguido de semeio em Agar Oxford a 37°C/24h. De 42 cepas de *Listeria*, 35 foram identificadas em nível de espécie, com predominância de *L. grayi* (15 cepas- 42,8%) e três cepas (8,6%) de *L. monocytogenes*. Dentre as 35 cepas testadas frente a 8 antimicrobianos de uso rotineiro na clínica médica, observou-se que todas foram resistentes à Oxacilina e a maior parte (94,3%) sensíveis à Vancomicina. Esses padrões de resistência são semelhantes aos encontrados em cepas de origem humana. Conclui-se que o rio Bodocongó não apresenta condições sanitárias adequadas para os usos aos quais se destina, constatadas pela alta freqüência e diversidade de *Listeria* sp.

PALAVRAS-CHAVE – *Listeria* sp., diversidade, antimicrobianos.

SUMMARY *– The detection of* Listeria *spp. in superficial waters presents private relevance for being an emergent bacteria to diseases with great interest to the public health. This work evaluate the diversity and the antimicrobial profile of* Listeria *spp. as well as the indicative bacterias behavior of fecal contamination. The study were made at the basin of Bodocongó river with 12 samples analyzed from December, 1999 to February, 2000. Fecal coliforms were quantified according to APHA (1998)* Listeria *spp. were isolated in LEB broth (24/48h 30°C), followed by spreading in Agar Oxford for 37°C/24h. From 42 strains of* Listeria*, 35 were identified as the species level, with* L. grayi *(15 strains–42.8%) and 3 strains (8.6%) as* L. monocytogenes. *Among those 35 strains tested against 8 antimicrobial drugs used in medical clinic, all were resistant to Oxaciline and 94.3% were sensitive to Vancomicine. Those resistance patterns are similar in strains found in human origin. The Bodocongó river did not achieve appropriate sanitary conditions for the uses as it destines expressed by the high frequency and diversity of* Listeria *spp.*

KEYWORDS – Listeria *spp., diversity, antimicrobial.*

INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico, aliado ao aumento da capacidade tecnológica do homem que provocam a alteração do ambiente, estão comprometendo a disponibilidade dos recursos hídricos que atendem as necessidades básicas dos seres vivos. Os suprimentos das cidades, o consumo humano, animal e a irrigação vêm sendo prejudicados e nesse aspecto o Brasil ocupa um lugar único e estratégico no contexto mundial: destaca-se pela grande descarga de água doce dos seus rios (177.900 m^3/s e 73.100 m^3/s da Amazônia internacional), o que representa 53% da produção de água doce do continente sulamericano e 12% do total mundial. No entanto, enfrenta problemas atuais de abastecimento decorrentes da combinação do crescimento exagerado das demandas localizadas e da degradação da qualidade das águas, como conseqüência da expansão desordenada dos processos de urbanização e industrialização, verificados a partir da década de 1950 (Tundisi, 1999; Rebouças, 1999).

As doenças de veiculação hídrica são responsáveis pela maioria dos casos de morbidade e mortalidade nas Américas. Em particular, nas regiões áridas e semi-áridas, ocorre forte contaminação dos escassos recursos hídricos pelo seu uso intensivo e extensivo. O Nordeste do Brasil está inserido nesse quadro (Dias & Marengo, 1999).

Recebido em 19/2/2003
Aprovado em 13/3/2003

*Trabalho realizado no Lab. de Saneamento da Univ. Fed. de Campina Grande (UFCG) – Área de Eng. Sanitária e Ambiental (AESA) – Depto. de Eng. Civil (DEC).
[1]Profª de Fisiologia do Departamento de Farmácia e Biologia (DFB) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Univ. Estadual da Paraíba (UEPB); [2]Profª de Microbiologia Ambiental (AESA/CCT/UFCG); [3]Profª de Microbiologia e Imunologia (DFB – CCBS - UEPB).

Os estudos da qualidade das águas superficiais na região Nordeste são importantes, pois estas águas têm usos diversos: consumo humano, irrigação irrestrita, lavagem de roupas, recreação de contato primário, entre outros.

O Rio Bodocongó atravessa uma região semi-árida do estado de Paraíba, com aproximadamente 75 Km de extensão que forma parte da microbacia do Médio Paraíba, o principal rio do estado. Atualmente este rio recebe descargas pontuais de esgotos sanitários, efluentes industriais, matadouros clandestinos e impactos difusos que chegam com o escoamento superficial de áreas agropastoris. Contudo, o rio é um importante recurso hídrico para a população que habita nas suas proximidades, constituindo com seus múltiplos usos, sério risco para a saúde pública.

As bactérias do gênero *Listeria* estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido isoladas de insetos, solo, material fecal, esgotos, água de rio, efluentes de abatedouro, aves, pescados e animais domésticos (Uboldi Eiroa, 1990). A freqüência e a diversidade de ambientes nos quais *a Listeria* sp. vem sendo encontrada, levam a considerar este microrganismo como ubiqüitário sendo capaz de se desenvolver em ampla faixa de temperatura (0 a 44°C), elevada tolerância ao sal (até 10,5%) e facilidade de crescimento em substratos com baixo pH e atividade de água (Pereira & Rocourt, 1993). A listeriose emerge como uma nova doença transmitida por água, alimentos e esgotos. Seu impacto social e econômico é um do mais elevados entre os agentes de doenças veiculadas por água e alimentos (Hoffer,1999).

O uso indiscriminado de antibióticos tanto na clínica como na alimentação dos animais, provoca a proliferação de linhagens resistentes às drogas normalmente usadas no tratamento das infecções humanas.

Os coliformes fecais têm sido parâmetros de avaliação do comprometimento da água, sendo utilizados convencionalmente como critérios de risco da água ao consumo humano. São um subgrupo caracterizado pela termotolerância (APHA,1995) e são bons indicadores de enterobactérias patogênicas, mas pouco indicam sobre novas bactérias (patógenos emergentes) como *Listeria* sp. e vírus.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou investigar a presença e diversidade de *Listeria* sp., avaliar sua sensibilidade frente aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na clínica médica e o comportamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal, em um rio poluído do trópico semi-árido (Paraíba).

MATERIAL E MÉTODOS

O local de estudo foi a microbacia de Rio Bodocongó, situada na Região Nordeste do Estado de Paraíba, com área de aproximadamente 981 Km^2.

Os locais de coleta (7 pontos) em diferentes trechos do rio, foram selecionados "in loco" levando-se em consideração as atividades desenvolvidas na bacia de drenagem e a facilidade de acesso.

O período de amostragem foi de 11/12/1999 a 22/02/2000, sendo coletadas 12 amostras de água.

O isolamento de *Listeria* sp. foi feito filtrando-se a amostra de água (5 litros) em aparelho de filtração "Sterifil" (Milipore) conectado a uma bomba de vácuo, usando-se membrana de 0,45µm de porosidade por 142mm de diâmetro. Foi utilizado caldo LEB (24/48h-30°C) para o isolamento, seguido de semeio em meio seletivo Ágar Oxford com incubação a 37°C/24h. As colônias típicas foram submetidas a provas bioquímicas.

A quantificação de coliformes fecais foi feita por membrana filtrante e semeio em m-FC com incubação a 44,5°C/24h (APHA, 1998).

O antibiograma foi realizado pelo método de difusão de discos segundo Kirby-Bauer (1966), em agar Mueller-Hinton. Os antibióticos testados foram: Amicacina (AM), Cefalotina (CF), Cindamicina (CL), Eritromocina (EI), Oxacilina (OX), Penicilina (PN), Tetraciclina (TT) e Vancomocina (VN).

RESULTADOS

Das 42 cepas de *Listeria* sp., 35 foram identificadas bioquimicamente como: 15 (42,8%) L. *grayi;* 12 (34,2%) *L.welshimeri;* 3 (8,6%) *L. monocytogenes;* 3 (8,6%) *L. innocua e* 2 (5,7%) *L. seeligeri.*

A Figura 1 evidencia o comportamento de cepas de *Listeria* frente aos antimicrobianos. Observa-se que as 35 cepas foram resistentes a dois ou mais antibióticos. Constatou-se que OX foi o antimicrobiano que apresentou maior número de cepas resistentes: 35 (100%), seguido de CL 34 (97,15%), TT (34,3%), VN (31,4%), EI (28,6%), CF (25,7%) e AM (11,4%). A menor resistência bacteriana e nenhum limite intermediário, foi verificado para VN (2 – 5,7%), sendo este, portanto, o antimicrobiano mais eficaz para o controle de *Listeria* sp. isoladas de ambiente aquático.

A Figura 2 mostra os valores percentuais de aparecimento de *Listeria.* sp. e os valores logarítmicos médios de coliformes fecais no Rio Bodocongó. Observou-se que *Listeria* sp. foi isolada em todos os pontos que apresentaram altas concentrações de coliformes fecais (P1, P2 e P4), como também nos pontos com menores concentrações (P6 e P7). Verificou-se também, que no ponto P5, onde se observa uma diminuição dos valores de coliformes fecais, houve uma alta freqüência de isolamento de *Listeria* sp. (60%), sugerindo maior resistência que aqueles, aos fatores ambientais.

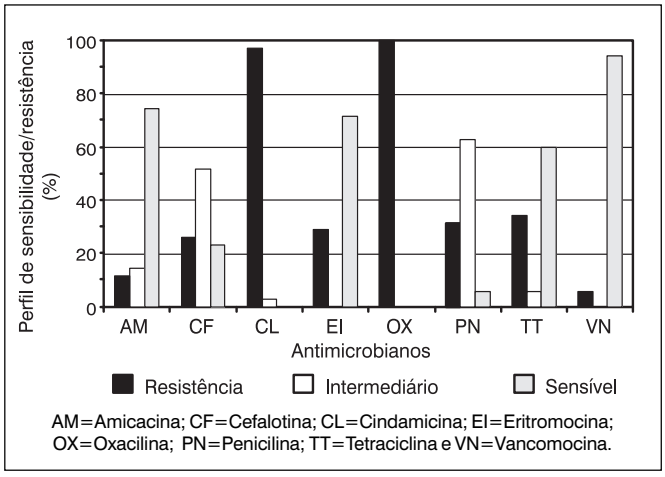


FIG. 1 - Perfil antimicrobiano das cepas de *Listeria* frente aos antimicrobianos testados.

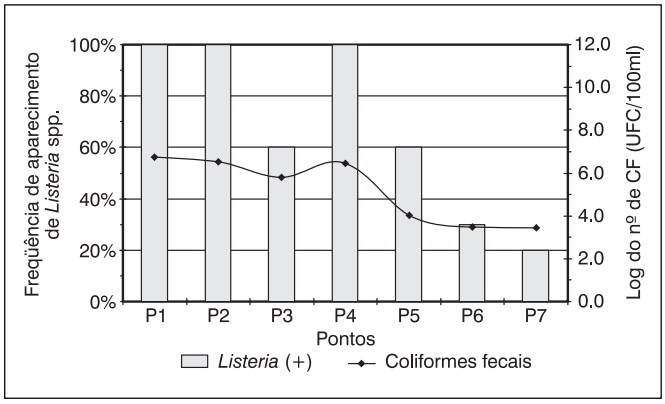


FIG. 2 - Freqüência de aparecimento de *Listeria* sp. e distribuição dos valores logarítmicos médios de coliformes fecais no Rio Bodocongó (PB) no período de dez/1999 a fev/2000.

DISCUSSÃO

Este estudo permitiu avaliar a biodiversidade de *Listeria* sp. em águas poluídas com esgotos domésticos do semi-árido nordestino, assunto este, que apresenta poucos relatos na literatura.

A diversidade de *Listeria* sp. no Rio Bodocongó, foi semelhante à documentada por Hofer, Ribeiro & Feitosa (2000), que identificaram grande diversidade de *Listeria* sp., em diferentes fontes de infecção (humano, alimentos e componentes ambientais), solo, efluentes de indústrias de carne e de esgotos, coletadas de diferentes lugares do Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás) no período de 1971 a 1997, as quais foram identificadas como: *L. monocytogenes* (24,8%), *L. innocua* (72,9%) *L. seeligeri* (1,1%), *L. welshimeri* (0,7%), *L. grayii* (0,2%) e *L. ivanovii* (0,03%).

Na literatura consultada não foram encontrados relatos de testes de sensibilidade aos antimicrobianos para *Listeria* sp. isolada de ambientes aquáticos. Entretanto, comparando-se os resultados dos antibiogramas desta pesquisa com os de Hofer, Nascimento & Oliveira (1998), de casos de meningite bacteriana por *Listeria monocytogenes* no Distrito Federal, foi constatado que as três amostras apresentaram-se resistentes à Oxacilina e sensíveis à Vancomicina. Estes resultados estão em concordância com os encontrados na presente pesquisa onde 100% (35 cepas) foram resistentes à Oxacilina e apenas 5,7% (2 cepas) foram resistentes à Vancomicina.

CONCLUSÃO

Listeria. sp. e *Listeria monocytogenes* estiveram presentes nas águas do Rio Bodocongó com freqüência de isolamento de 83,4% e 8,6% respectivamente.

A maior diversidade de espécie de *Listeria* correspondeu a *Listeria grayi* (42,8%).

A maioria das cepas de *Listeria* apresentaram elevada resistência a um ou mais antimicrobianos. Todas foram resistentes à Oxacilina e os antimicrobianos mais eficazes foram: Vancomicina, Amicacina, Eritromicina e Tetraciclina.

São necessários estudos mais aprofundados com relação ao comportamento de bactérias ambientais frente aos antimicrobianos, uma vez que não se sabe se esta resistência é intrínseca ou adquirida.

Listeria sp. foi isolada em todos os pontos que apresentaram concentrações altas de coliformes fecais, como também nos pontos de menor concentração, sugerindo maior resistência para os fatores ambientais que o coliformes.

O rio mostrou-se altamente contaminado com *Listeria* sp. constituindo sério risco à saúde da população que usa esta água.

AGRADECIMENTOS

Ao PICD-CAPES, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. **APHA – American Public Health Association.** *Standard methods for the examination of water and wastewater.* 19th ed. Washington DC. 953p, 1995.
2. **APHA – American Public Health Association.** *Standard methods for the examination of water and wastewater.* 20th ed., Washington DC. 1155p, 1998.
4. **Bauer, A. W.; Kirby, E. M.** Antibiotic susceptibility testing by standarized single disk method. *Am. J. Clin. Path.* 45p, 1966.
5. **Dias, P. L. S.; Marengo, J. A.** Águas atmosféricas. *In: Águas doces no Brasil.* São Paulo. p.65-115, 1999.
6. **Hofer, E.; Nascimento, R. S.; Oliveira, M. A.** Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relatos de casos em pacientes do Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 31(2):173-177, 1998.
7. **Hofer, E.** *Listeria. Brochura do Laboratório de Zoonoses Bacterianas.* Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. 5p, 1999.
8. **Hofer, E.; Ribeiro, R.; Feitosa, D. P.** Species and serovars of the *Listeria* genus isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95(5):615-620, 2000.
9. **Pereira, M. L.; Rocourt, J.** *Listeria monocytogenes* – uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. *Hig. Alim. 7*, (26):5-12, 1993.
10. **Rebouças, A. C.; Braga, B.; Tundisi, J. G.** *Águas doces no Brasil: catálogo ecológico, uso e conservação.* São Paulo: Ed. Escrituras. p.717, 1999.
11. **Tundisi, J. G.** Limnologia no século XXI: perspectivas e desafios. *In:* **VII Congresso Brasileiro de Limnologia,** *Resumo...* São Carlos, SP. p.24, 1999.
12. **Uboldi Eiroa, M. N.** Listeria monocytogenes – *características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos.* Colet. ITAL, Campinas, 20(1):13-22, 1990.

Endereço para correspondência
Nícia Stellita da Cruz Soares
Rua João Machado, 456 – Prata – Campina Grande, PB – 58101-300
Tel. (0xx83)322-3034
E-mail: niciastellita@ig.com.br

XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS
IV CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA
CENTRO DE CONVENÇÕES DA BAHIA
6 A 10 DE JUNHO DE 2004

Acompanhamento domiciliar de pacientes chagásicos tratados etiologicamente*

Patients home attendance with Chagas' disease etiologically treated

Aurea Regina Telles Pupulin[1]; Silvana Marques Araújo[1]; Mônica Lucia Gomes[1]; Sandra Vieira da Silva[2] & Ivan Aparecido Carrashi[3]

RESUMO – A doença da Chagas é uma doença estigmatizante que pode desenvolver mudanças significativas na vida de seus portadores. Até o momento não conta com tratamento completamente eficaz e livre de efeitos colaterais. O laboratório de Doença de Chagas – DAC – UEM atende pacientes chagásicos de Maringá e região realizando diagnóstico, tratamento e controle de cura. Durante o tratamento deve ser assegurado ao paciente o acompanhamento e a identificação de efeitos colaterais. Através de visitas domiciliares e entrevistas utilizando os instrumentos de abordagem da família foram acompanhados no período de dois anos, cinqüenta e um pacientes submetidos a tratamento etiológico. Pôde-se verificar a desinformação dos pacientes no que diz respeito a sua doença e o tratamento. A atenção dispensada individualmente aos pacientes foi importante no sentido de diminuir a ansiedade dos mesmos, no processo de adesão ao tratamento e controle de cura e no controle de reações adversas ao medicamento utilizado.

PALAVRAS-CHAVE – Doença de Chagas, acompanhamento domiciliar, tratamento etiológico

SUMMARY *– Chagas' disease is a stigmatizing disease that can develop significant changes in the life of their bearers. Until the present time there is no completely effective treatment and from free side effects. The Chagas' Laboratory Disease/DAC/UEM attend patients with Chagas's disease from Maringá and area doing diagnosis, treatment and cures control. During the treatment it should be insured to the patient the management and the identification of side effects. Through home visits and interviews as well the family approaches, 51 patients were submitted to etiological treatment for two years. It could be verify the patients' disinformation and the treatment in relation to his/her disease . The individually care attention to the patients was important to reduce their anxiety in the adhesion process for treatment, cure control and medicine adverse reactions used.*

KEYWORDS *– Chagas' disease, home attendance, etiological treatment.*

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas constitui ainda hoje no Brasil e em diversos países da América Latina um problema social grave, atingindo cerca de 5 milhões de habitantes. O Inquérito Nacional para Doença de Chagas/ 1980 (Camargo *et al.*, 1984) aponta a prevalência de 4% de reações positivas para o *Trypanosoma cruzi,* no Paraná, por estimativa, 166.511 indivíduos infectados. Investigações sorológicas mais recentes realizadas pelo setor de Parasitologia Básica-UEM detectou taxa de 6,25% de indivíduos com sorologia positiva em cinco municípios da região Noroeste do Paraná (Gomes *et al.*, 1992). O benznidazol (Rochagan) é a droga de escolha para o tratamento específico da doença de Chagas, sendo indicado para o tratamento da fase aguda, onde observa-se altos índices de cura parasitológica e sorológica e, sob estrita supervisão médica e acompanhamento prolongado, para pacientes na forma indeterminada da fase crônica da doença (Cançado,1991).

Segundo a Fundação Nacional de Saúde (FNS), durante o tratamento etiológico, deve ser assegurado ao paciente o acompanhamento e identificação de efeitos colaterais bem como o acompanhamento por pelo menos 5 anos para a avaliação do controle de cura (Tratamento Etiológico da Doença de Chagas, FNS-1997).

Os ensaios clínicos usualmente aplicados ao estudo da toxicidade dos fármacos utilizados na terapêutica humana, não são capazes de detectar as reações que só aparecem após tratamentos prolongados, as que tem baixa incidência ou aquelas que se manifestam em grupos específicos da população (Barros,1992).

A possibilidade do benznidazol causar reações adversas graves impõe o dever de acompanhar de perto o paciente. Na prática, o obstáculo é maior quando o paciente faz o tratamento em casa, ou em outra cidade, o que é bastante comum. Torna-se então necessário um melhor esclarecimento sobre a doença e o tratamento por parte do paciente e seus familiares. Além disso, há marcadas controvérsias sobre o que significam as instruções dos médicos, que podem ser magnificadas pela família e pelo paciente e interpretadas de uma maneira totalmente pessoal.

Além disso, abordagem clínica tradicional, baseada no modelo biomédico, está centrada na patologia e não na pessoa. Isto não deixa espaço para as dimensões sociais, econômicas, psicológicas e comportamentais da doença, que podem ser manifestadas pelo indivíduo. Neste século, de modo especial, o modelo tradicional de abordagem clínica, centrado na doença, não satisfaz a necessidade do ser humano quando se trata de recuperar ou manter a saúde.

Recebido em 9/4/2003
Aprovado em 30/7/2003
Departamento de Análises Clínicas Universidade Estadual de Maringá – de Parasitologia Básica/Laboratório de Chagas.
[1] Docentes; [2] Técnico de Laboratório; [3] Acadêmico

Este trabalho teve como objetivo dar suporte ao paciente chagásico e seus familiares, facilitando o processo terapêutico, além de identificar e acompanhar reações adversas aos fármacos utilizados, de modo que uma intervenção precoce diminua os efeitos tóxicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes: O Laboratório de Doença de Chagas – Parasitologia Básica – DAC-UEM atende pacientes chagásicos encaminhados pelo SUS, estes são provenientes de unidades básicas de saúde e bancos de sangue. Este laboratório realiza diagnóstico, tratamento e controle de cura destes pacientes. Semanalmente são atendidos 5 novos pacientes; destes, pelo menos 2 iniciam o tratamento etiológico com benznidazol (Rochagan). Os pacientes constantes neste trabalho são os que foram submetidos ao tratamento etiológico.

Acompanhamento domiciliar: Foram realizadas visitas domiciliares semanais, quinzenais ou mensais conforme a necessidade individual. Foi também disponibilizada uma linha telefônica para atendimento do paciente.

Instrumentos de abordagem: Para abordagem da família foram utilizados os instrumentos preconizados pelo Programa Saúde da Família constando de Genograma, Practive e modelo Firo (Doherty,1986; Doherty & Colangelo,1984).

Para o acompanhamento clínico-laboratorial foram utilizadas as informações contidas nos prontuários dos pacientes.

A ocorrência de Reações Adversas a Medicamentos (RAM) foi avaliada utilizando-se formulário específico (Fig.1).

Através destes métodos foi possível agrupar dados relacionados à história familiar, condições de saúde-doença anteriores e uso de medicamentos, definindo-se um perfil do paciente e sua família. Utilizando-se estas informações fez-se as orientações quanto à doença, uso correto de medicamentos, reações adversas e mudanças de hábitos visando melhoria da qualidade de vida. Estas intervenções foram feitas através de conversas particulares e esclarecimentos dados ao paciente e membros da família envolvidos com este.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de dois anos (2000 a 2002) foram acompanhados 51 pacientes submetidos a tratamento etiológico com Rochagan. Através do modelo humanizado de abordagem clínica foi possível colher informações do paciente e orientá-lo. Nas entrevistas pôde-se verificar a desinformação em 100% dos pacientes e seus familiares no que diz respeito á Doença de Chagas e o tratamento etiológico. Todos mostraram em suas respostas um estigma de morte e uma grande expectativa com relação ao tratamento. As frases comumente usadas foram: "É a maior tristeza do mundo, choro todo dia porque tenho esta doença"; "É a pior coisa que pode existir"; "É a coisa mais triste do mundo"; "É um empecilho na vida"; "É muito grave"; " Tudo perde a graça"; "É uma preocupação, falta de paz"; "Acaba com a vida"; "É muito complicado".

Com relação às características de vida do paciente ressalta-se que 78,43% tem grau de escolaridade médio incompleto, 17,6% tem ensino médio completo e 1,96% ensino superior incompleto e 1,96 são analfabetos. A maioria dos pacientes (96%) trabalham ativamente e apenas dois (3,9%) aposentaram-se devido à doença (Tabela I).

No que diz respeito à avaliação clínica destaca-se que 94,1% dos pacientes apresentaram RX tórax normal enquanto 5,9% apresentaram RX de tórax alterado, ECG normal em 98,1% para 1,9% com ECG alterado e RX de esôfago normal para 100% dos pacientes (Tabela II).

Com relação à ocorrência de reações adversas a medicamentos observou-se que 29,4% dos pacientes apresentaram algum tipo de reação adversa, sendo que as mais freqüentes foram: urticária, irritação na garganta, descamação do pé e formigamento, alergia respiratória, emagrecimento, ce-

Universidade Estadual de Maringá

Laboratório de Doença de Chagas – Parasitologia Básica B. I-90

CONFIDENCIAL

Notificação de suspeita de reação adversa a medicamento

Não deixe de notificar por desconhecer uma parte da informação que estamos pedindo

Nome do paciente _____ Sexo _____ Idade _____ Peso(Kg) _____

Paciente Hospitalizado: S ❒ N ❒ Nº do Prontuário _____ Hospital _____

Medicamento(s)* (nome comercial)	Dose Diária	Via de Adm.	Data		Motivo prescrito
			Início	Fim	

*Para as vacinas, indique Nº de lote

Reação Suspeita	Data		Evolução (p.ex: mortal, recuperado, seqüelas, etc.)
	Início	Fim	

Informações adicionais (tratamento, história médica, altura, queixa técnica, etc.)

Profissional notificador/profissão:

Nome:

Endereço: Fone:

Cidade/Estado:

Assinatura Data _____/_____/_____

Figura 1

TABELA I
Características de vida do paciente

		Nº	%
Escolaridade	Analfabeto	01	1,96
	Ensino médio completo	09	17,65
	Ensino médio incompleto	40	78,43
	Ensino superior incompleto	01	1,96
Trabalho	Ativo	49	96,1
	Aposentado	02	3,9
Total		**51**	**100**

TABELA II
Avaliação clínica

	Alterados		Valores dentro da normalidade	
	%	Nº	%	Nº
Sorologia para Chagas	100	51	-	-
RX Tórax	5,9	3	94,1	48
RX Esôfago	0	0	100	51
ECG	1,9	1	98,1	50

faléia, intolerância gastrointestinal, fadiga e mal estar (Tabela III).

TABELA III
Ocorrência de reações adversas a medicamentos

Reação	Nº
Fadiga e mal estar	3
Urticária	2
Descamação do pé e formigamento	1
Irritação da garganta	3
Alergia respiratória	1
Emagrecimento	1
Cefaléia	2
Intolerância gastrointestinal	2
Total de Pacientes	10
Total %	**29,4%**

Quanto ao cumprimento do tratamento: 92,1% cumpriram o tratamento, 3,9% pararam o tratamento devido reações adversas e 3,9% pararam o tratamento sem causa aparente.

Através das fichas de reações adversas observou-se que 50% dos pacientes faz uso de outros medicamentos além de Rochagan, tais como pepsogel, captopril, digoxina, dorflex, somalium, tetroid, biofenac, premarim, meticorten, dolamin, vertizine, adalat, voltaren, aldomed, hidrocortizol e hidroclorotiazida, além de chás e remédios homeopáticos.

TABELA IV
Evolução do paciente com o acompanhamento

	Nº	%
Sentiram-se satisfeitos e mais animados	47	92,1
Abandonaram o tratamento	04	7,8
Relataram melhorar nos sintomas falta de ar, cansaço e dor no peito.	11	21,6

Todos os pacientes acompanhados relataram sentirem-se mais confiantes e animados para enfrentar a doença e 21,6% (Tab. IV) deles relataram melhora de sintomas tais como falta de ar, cansaço e dor no peito, após o tratamento com benzanidazol.

O tratamento parasiticida é indicado para pacientes assintomáticos e com comprometimento clínico de pouca expressão, na tentativa de minimizar as possíveis lesões que poderiam comprometer a qualidade e quantidade de vida destes indivíduos. Embora poucos pacientes tenham relatado melhora do quadro clínico após o tratamento, não foi relatado nenhum caso de piora dos sintomas.

As principais reações de toxicidade relatadas na literatura devido ao uso do benzanidazol são alterações hematológicas, dermatopatias por hipersensibilidade e polineuropatia dose-dependente. Apesar do grupo de pacientes ser pequeno, observa-se neste estudo que as reações adversas relatadas pelos pacientes são indicativas de uma provável toxicidade do fármaco utilizado e não devido a interações medicamentosas, mesmo que os pacientes façam uso de diversos medicamentos diferentes.

O fato dos pacientes mostrarem-se satisfeitos e mais animados, terem uma adesão alta ao tratamento e até relatarem melhora de sintomas confirma a proposta deste trabalho de que o esclarecimento sobre a doença e seu tratamento utilizando-se uma abordagem humanista, ou seja, mais próxima do seu contexto de vida, realmente é eficaz na melhoria da qualidade de vida.

Os pacientes acompanhados e seus familiares demonstraram uma progressiva melhora no entendimento da doença, cuidados da saúde e uso de medicamentos.

Têm-se ainda observado uma maior adesão dos pacientes ao controle de cura que deve ser feito a cada 6 meses, todos os pacientes que concluíram o tratamento mantêm-se constantes nas visitas ao laboratório para fazer os exames indicados.

Outro ponto a ser destacado foi a dificuldade por parte dos acadêmicos do curso de Farmácia participantes do trabalho, na abordagem do paciente. Há por parte dos acadêmicos dificuldade quanto ao atendimento humanizado, dificultando assim uma análise aprofundada dos aspectos psicológicos de cada paciente, impossibilitando muitas vezes um diálogo mais dinâmico, produtivo e direcionado, o que levaria talvez a intervenções mais eficazes. Este fato mostra uma lacuna a ser preenchida pelos atuais currículos dos cursos de Farmácia, já que a abordagem clínica humanizada é uma tendência mundial.

CONCLUSÕES

A visita domiciliar é um dos instrumentos mais indicados para se trabalhar o indivíduo, colocando a família e a comunidade na prestação de assistência à saúde (Mazza,1994). Além disso, visando a família amplia-se a noção de atendimento integral da saúde, em que a partir de um paciente, as ações são desdobradas para o grupo, com a organização de práticas preventivas coletivas e de promoção à saúde.

A atenção dispensada através deste método vem sendo importante no sentido de diminuir a ansiedade dos pacientes e no processo de adesão ao tratamento e controle de cura. Promove-se ainda um aumento da auto-estima do paciente.

Este trabalho também evidencia a possibilidade de redução de efeitos tóxicos do medicamento pela intervenção precoce junto ao paciente, além de possibilitar a identificação de novas reações adversas a este fármaco e/ou interações medicamentosas.

Nas últimas décadas tem-se evidenciado uma forte tendência a mudar o modelo clínico de atendimento centrado na doença para um modelo humanizado centrado no paciente. É necessário que se forme profissionais capazes de atuar dentro deste modelo. Este trabalho tem permitido aos acadêmicos de Farmácia o desenvolvimento de novas habilidades, principalmente a prática da comunicação, usando seus conhecimentos técnicos para suavizar a tensão temporária dos pacientes. Desse modo o trabalho contribui grandemente para a formação do profissional de saúde, além da melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

BIBLIOGRAFIA

1. **Barros, J. C.** A preocupação com os efeitos indesejáveis dos medicamentos. *Saúde* nº 36, outubro 1992.
2. **Camargo, M. E.** Prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975-1980. *Revista Int. Med. Trop*. S.Paulo, 26(4): 192-204, 1984 **Ilda, G. R.; Castilho, E.; Silveira, A. C.** *Inquérito sorológico*.
3. **Cançado, J. R.** Eficácia da terapêutica do bensonidazol na doença de Chagas aguda humana. *Revista Soc. Bras. Med. Trop*., 24(suplI):20-21,1991.
4. **Doherty, W. J., Baird, Mª.** Developmental levels in family-centred medicl care. *Fam. Med.* 1985; 18:153-6
5. **Doherty, W. J.; Colangelo, N.** The family firo MODEL; a proposal for organizing family treatment. *J. Marital Fam. Ther.* 1984;1(1):19-9
6. **Gomes, M. L.; Bertolini, D.; Silveira, T. G. V.; Lonardono, M. C. V.; Arraes, S. M.** Investigação sorológica da doença de Chagas e isolamento do *Trypanosoma cruzi* em indivíduos de cinco municípios da região Noroeste do Paraná. *Revista da Soc. Bras. Med. Trop.* 25 (supl.III),94,1992.
7. **Mazza, M. M. P. R.** A visita domiciliária como instrumento de assistência à saúde. Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano (*RBSDH*)v. IV, n. 2,Jul/dez., 1994

Endereço para correspondência
Profª Áurea Regina Telles Pupulin
Universidade Estadual de Maringá, DAC - Parasistologia Básica
Av. Colombo, 5790 - 87020.900 - Maringá - PR