

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Definindo Infecção Fúngica Invasiva: sumário de um consenso internacional	67
<i>Paulo Murillo Neufeld</i> Defining Invasive Fungal Infection: summary of an international consensus	
Avaliação do InstantScreen na rotina, um ensaio ultra rápido para detecção de anticorpos anti-HIV-1/2.	71
<i>Leonardo R. Motta; Ricardo S. de Souza; Vicent Wong; Orlando Gómez-Marin; Charles D. Mitchell & Heinrich H. Repke</i> Evaluation of InstantScreen under routine, an ultra rapid HIV-1/2 assay for the detection of HIV antibodies	
Deteção de Escherichia coli Shiga Toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes Stx	73
<i>Fabiana De Toni, Emanuel M. de Souza, Giseli Klassen, Liu Un Rigo, Maria Berenice R. Steffens, Cristina R. da Cruz, Geraldo Picheth, Sônia M.S.S. Farah & Cyntia M.T. Fadel-Picheth</i> Detection of Shiga Toxigenic Escherichia coli (STEC) by amplification of Stx genes	
Suscetibilidade antimicrobiana de Salmonellas isoladas de ambiente aquático	79
<i>Maricelma Ribeiro Moraes; Raissa Mayer Ramalho Catão & Beatriz Susana O. de Ceballos</i> Salmonellas' antimicrobial susceptibility isolated from aquatic environments	
Efeitos da terapia de reposição hormonal sobre os níveis dos lipídeos e da atividade da butirilcolinesterase no soro	83
<i>Maria Teresa G. Lang, Vânia M. Alcântara, Geraldo Picheth, Marileia Scartezini & Eleidi A. Chautard-Freire-Maia</i> Effects of hormonal replacement therapy on the lipid levels and on butyrylcholinesterase activity in serum	
Ação da frutose-1,6-bisfosfato sobre a toxicidade aguda do ácido nicotínico	87
<i>Adroaldo Lunardelli, Marina Dornelles Camargo & Jarbas Rodrigues de Oliveira</i> Fructose-1,6-bisphosphate action in nicotinic acid acute toxicity-induced	
Comparação entre o perfil lipídico de pacientes atendidos em laboratórios privados e públicos da 18ª Regional de Saúde de Santa Catarina	91
<i>Kenya Thiesen, Jorge Amaral & Liliete Canes Souza</i> Lipid profile comparison among private and public laboratory patients from the 18ª Health Zones of Santa Catarina State	
Análise comparativa de métodos para identificação do Streptococcus pyogenes em secreção de orofaringe de escolares em Recife-PE, Brasil	95
<i>Amélia Maciel; Ana Catarina de Souza Lopes; Elizabeth Malagueño; Gildete Patriota de Andrade & Ivanize da Silva Aca</i> Comparative analysis of methods for identification of Streptococcus pyogenes in throat secretion of school children in Recife-PE, Brazil	
Aspectos importantes na determinação do nível de alumínio no sangue de pacientes em tratamento regular de hemodiálise	99
<i>Denise Bohrer, Sandra M.R. de Oliveira, Denise Bertagnoli, Paulo C. do Nascimento, Solange C. G. Pombum & Leandro M. de Carvalho</i> Aluminium level in serum analysis and its importance in hemodialysis treatment	
Avaliação da interferência in vitro do extrato seco de berinjela (Solanum melongena L.) em testes laboratoriais	105
<i>E.G. Brietzig; M.B. Falkenberg & S.F.T. Freitas</i> In vitro interference evaluation from dry eggplant extract (Solanum melongena L.) in laboratorial tests	
Método de Papanicolaou em material cérvico-vaginal para a triagem de infecção por Candida sp., Trichomonas vaginalis e Chlamydia trachomatis	111
<i>Andréa Emilia Marques Stingham; Aginaldo José do Nascimento & Maria Suelly Soares Leonard</i> Papanicolaou method in cervical smears to diagnosis of Candida sp., Trichomonas vaginalis and Chlamydia trachomatis infections	
Otimização da detecção do polimorfismo Ala 677 - Val do gene que codifica a metilenetetraidrofolato redutase (MTHFR)	117
<i>Darlene Camati Persuhn, Sandra S. Melo, Carlos L. Maccagnan P. Besen, Fabiano Sansão & Iriane Eger Mangrich</i> Optimization of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism detection	
Artigo de revisão	
Aconselhamento ao paciente infectado pelo vírus linfotrópico de células-T humanas do tipo I e II (HTLV-I/II)	121
<i>Fred Luciano Neves Santos</i> Advising to human T-cell lymphotropic virus type I and II (HTLV-I/II) infected persons	
Avaliação bioquímica do líquido hidrocelico em indivíduos residentes em área endêmica de Wuchereria bancrofti	125
<i>Alexandre B.; Guilherme L.; Sandra Alves; Zulma M.; Ana A. Santos; José Luis; Ulisses Montarroyos & Abraham Rocha</i> Biochemically of hydrocele fluid from individuals living in endemic areas with bancroftian filariasis	
Perfil de sensibilidade de cepas Staphylococcus aureus e Staphylococcus coagulase negativo isolados em pacientes internados	129
<i>Jucelene Marchi Blatt & Carmela Elandia Piazza</i> Sensitivity profile of Staphylococcus aureus and Staphylococcus negative coagulase strains isolated from inpatients	
<i>E mais...</i> Temas Livres do XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2004 e do IV Congresso Brasileiro de Citologia Clínica	

2

VOLUME 36

2004

Definindo Infecção Fúngica Invasiva: sumário de um consenso internacional

Defining Invasive Fungal Infection: summary of an international consensus

Paulo Murillo Neufeld*

RESUMO – Recentemente, o Grupo de Infecções Fúngicas Invasivas da Organização Européia de Pesquisa e Tratamento do Câncer (*EORTC*) e o Grupo de Estudos de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos da América (*NIAID*) apresentaram uma proposta de padronização de critérios para o diagnóstico das infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos. Três níveis de probabilidades foram propostos (provada, provável e possível) tendo como base fatores relacionados ao hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos.

PALAVRAS-CHAVE – Infecção fúngica invasiva, paciente imunocomprometido, critérios de diagnóstico.

SUMMARY – Recently the Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (*EORTC*) and the Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the United States of America (*NIAID*) proposed a criterion standardization of invasive fungal infection diagnosis in immunocompromised patients. Three levels of probability were proposed (proven, probable, and possible) on the basis of host factors, clinical features, and, microbiological factors.

KEYWORDS – Invasive fungal infection, immunocompromised patient, diagnosis criteria.

INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado dramaticamente e o espectro dos agentes etiológicos tem apresentado alterações (Singh, 2001). As novas técnicas de transplante de célula-tronco, a melhoria das práticas de transplante de órgãos sólidos, os novos métodos de diagnóstico, o uso de novos medicamentos imunossuppressores, os avanços da quimioterapia anti-tumor, a profilaxia com antimicrobianos e o aprimoramento nas medidas de suporte de doentes críticos são os principais determinantes de mudanças no padrão epidemiológico das micoses sistêmicas (McNeil *et al.*, 2001).

Diante deste novo quadro, as infecções fúngicas oportunistas tornaram-se a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes graves. O reconhecimento desses processos, muitas vezes, é difícil e controverso (Donnelly, 2002; Maertens *et al.*, 2001). Recentemente, o Grupo de Infecções Fúngicas Invasivas da Organização Européia de Pesquisa e Tratamento do Câncer (*EORTC*) e o Grupo de Estudos de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos da América (*NIAID*) apresentaram uma proposta de padronização de critérios de diagnóstico para as infecções fúngicas invasivas oportunistas (Denning *et al.*, 2003). Com base em revisões de literatura e em um consenso internacional, um conjunto de definições para as infecções sistêmicas mais frequentemente observadas e estudadas em pacientes imunocomprometidos foram desenvolvidas, a partir de elementos patológicos e laboratoriais.

O Comitê formado pelo *EORTC* e *NIAID* restringiu o escopo das definições aos pacientes imunocomprometidos com câncer e aos transplantados de medula óssea. Um esforço foi feito por esse Comitê no sentido

de diferenciar clinicamente os processos fúngicos de outros processos infecciosos e de qualificar a amostra clínica e as técnicas de investigação utilizadas para a evidência micológica de infecção (Ascioglu *et al.*, 2002).

• Definição de infecção fúngica

A definição de infecção fúngica invasiva compreende três elementos principais, representados pelos fatores relacionados ao hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos (Tab. I). Associados à amostra clínica (Fig. 1), esses fatores permitem o estabelecimento de níveis de probabilidade de infecção (Holzheimer & Dralle, 2002). Os fatores relacionados ao hospedeiro e os fatores clínicos são prontamente discerníveis, já que são rotineiramente empregados para o reconhecimento de pacientes de risco. Do mesmo modo, a aplicação dos critérios microbiológicos não apresenta maiores dificuldades, pois são classicamente baseados na demonstração tecidual dos patógenos e na cultura dos espécimens clínicos (Ascioglu *et al.*, 2002).

Fatores relacionados ao hospedeiro

- a) Neutropenia (menos de 500 neutrófilos/mm³ por mais de 10 dias).
- b) Febre persistente por mais de 96 horas, a despeito do uso de antibiótico de largo espectro.
- c) Temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C associada com uma das seguintes condições predisponentes: neutropenia prolongada (mais de 10 dias), uso de agentes imunossuppressores, ocorrência de infecção fúngica invasiva provada ou provável nos episódios iniciais de neutropenia e coexistência com AIDS.
- d) Doença enxerto contra hospedeiro severa (grau ≥2) ou extensa doença crônica.
- e) Prolongado uso de corticoesteróides (por mais de 3 semanas).

Recebido em 27/10/2003

Aprovado em 18/2/2004

*Coordenador de Desenvolvimento e Extensão - Faculdade de Farmácia - UFRJ

Chefe do Laboratório de Micologia Clínica - Faculdade de Farmácia - UFRJ

pneufeld@pharma.ufrj.br

TABELA I
Definição de Infecção Fúngica Invasiva

Fatores	Definição
Fatores do Hospedeiro	<ul style="list-style-type: none"> • Persistente estado febril • Baixa contagem de neutrófilos • Corticoterapia • Terapia imunossupressora • Doença enxerto contra hospedeiro
Fatores Clínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Infecções do trato respiratório, seios nasais e sistema nervoso central <i>Diagnóstico por imagem</i> <i>Sinais e sintomas clínicos</i> • Infecções fúngicas disseminadas <i>Lesões cutâneas e oculares</i> • Candidíases disseminadas crônicas <i>Diagnóstico por imagem</i> <i>Abscessos hepatoesplênicos</i> • Candidemias <i>Não existem definições</i>
Fatores Microbiológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Exame direto e cultura positivos para <i>Aspergillus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Scedosporium</i> sp., <i>Zygomycota</i>, <i>Cryptococcus</i> sp. • Testes com antígenos positivos para <i>Aspergillus</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Histoplasma capsulatum</i>

Ascioglu et al. (2002).

Fatores clínicos

a) Infecção no Trato Respiratório Inferior

Manifestação Clínica Principal: em imagem na tomografia computadorizada: sinal de ar-crescente e sinal do halo e cavidades com áreas de consolidação.

Manifestação Clínica Secundária: sintomas de infecção (tosse, dor no peito, hemoptise, dispnéia), achados clínicos de atrito pleural, efusão pleural e outros infiltrados.

b) Infecção Nasal e dos Seios Nasais

Manifestação Clínica Principal: evidência radiológica de infecção nos seios nasais (erosão da parede dos seios nasais, extensa infecção de estruturas adjacentes e extensa destruição da base do crânio).

Manifestação Clínica Secundária: sintomas de infecção em trato respiratório superior (descarga nasal, congestão), ulceração da mucosa nasal ou epistaxe, inchaço periorbital, dor temporomandibular, lesões necróticas negras e/ou perfuração do palato duro.

c) Infecção do Sistema Nervoso Central (SNC)

Manifestação Clínica Principal: evidência radiológica de infecção no SNC (mastoidites ou outro foco parameningeal, empiema extradural, massa no parênquima cerebral ou coluna vertebral).

Manifestação Clínica Secundária: sintomas neurológicos focais: convulsões, hemiparesia, paralisia, confusão mental, sintomas de irritação de meninges e alteração bioquímica e celular do líquido cefalorraquidiano.

d) Infecção Fúngica Disseminada

Lesões cutâneas nodulares ou papulares sem causa determinada e achados intraoculares sugestivos de coriorretinite hematogênica fúngica ou endoftalmite.

e) Candidíase Disseminada Crônica

Abscessos pequenos e periféricos no fígado e/ou baço demonstrados por tomografia ou ultra-sonografia e elevado nível de fosfatase alcalina. Critérios microbiológicos não são requeridos na categoria provável.

f) Candidemia

Critérios clínicos não são requeridos para candidemia provável. Não existe definição para candidemia possível.

Fatores microbiológicos

a) Resultados positivos para cultura de escarro ou lavado broncoalveolar para fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* ou *Zygomycota*); *Cryptococcus neoformans* e patógenos endêmicos.

b) Resultados positivos para cultura ou exame microscópico direto/citológico de aspirados de seios nasais para fungos filamentosos.

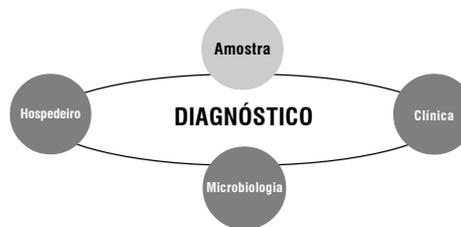


FIG. 1 - Elementos para o diagnóstico de infecção fúngica invasiva.

c) Resultados positivos para exame microscópico direto/citológico de escarro e lavado broncoalveolar para fungos filamentosos ou *Cryptococcus* sp.

d) Resultados positivos para antígenos de *Aspergillus* em lavados broncoalveolares e líquido cefalorraquidiano ou em pelo menos 2 amostras de sangue.

e) Resultados positivos para antígenos de *Cryptococcus* no sangue (Reações falso-positivas podem ocorrer com *Trichosporon beigellii*, *Stomatococcus mucilaginosus*, fator reumatóide circulante e processos malignos concomitantes e devem ser descartadas se o teste para antígenos fúngicos for a única prova positiva no fator microbiológico).

f) Resultados positivos para elementos fúngicos em exame microscópico direto/citológico de espécimens estéreis (*Cryptococcus* sp. em líquido cefalorraquidiano).

g) Resultados positivos para antígenos de *Histoplasma capsulatum* no sangue, urina ou líquido cefalorraquidiano.

h) Dois resultados positivos de cultura de urina para leveduras na ausência de cateter urinário.

i) Elementos de *Candida* sp. em urina na ausência de cateter urinário.

j) Resultados positivos para *Candida* sp. em hemoculturas.

Pela precocidade e rapidez do diagnóstico, as técnicas de avaliação por imagem e as técnicas de detecção de antígenos têm sido cada vez mais valorizadas, sendo colocadas atualmente no mesmo nível dos critérios microbiológicos, apesar de serem métodos indiretos de evidência. Contudo, as técnicas de detecção de ácidos nucleicos, por não estarem suficientemente desenvolvidas, ainda não são consideradas métodos validados de diagnóstico (Donnelly, 2002).

• Níveis de probabilidade de infecção fúngica

Os sinais e sintomas de infecção fúngica invasiva raramente são específicos e testes micológicos convencionais com frequência não são suficientes para o diagnóstico (Ascioglu et al., 2002). Apoiadas nos fatores do hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos, três categorias de probabilidade de infecção foram formuladas para aqueles pacientes com câncer e transplantados de célula-tronco: provada, provável e possível (Tab. II).

A categoria de provada infecção (Fig. 2) é composta por critérios que permitem que a infecção fúngica invasiva seja diagnosticada de maneira definitiva. De acordo com o Comitê da EORTC e NIAID, o mais alto nível de certeza no diagnóstico é dado pela presença do fungo no tecido. Contudo, para alguns agentes, a detecção de antígenos foi aceita como um critério de provada infecção (Donnelly, 2002).

As categorias de provável e possível infecção (Fig. 2) apresentam um conjunto de informações suficientes para sugerir uma infecção fúngica invasiva e subsidiar o estabelecimento de algumas formas de terapia antifúngica empírica (Ascioglu et al., 2002). Pacientes dessas categorias são frequentemente febris, a despeito da antibioticoterapia de largo-espectro e podem ter um foco potencial de infecção. Para uma infecção ser considerada provável, o nível de consideração dos crité-

TABELA II
Níveis de Probabilidade de Infecção Fúngica Invasiva

Categoria	Descrição
Infecção Fúngica Provada	<p>Critérios</p> <ul style="list-style-type: none"> Fatores do hospedeiro Fatores clínicos; Fatores microbiológicos <p>Processos Sistêmicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Infecções profundas <ul style="list-style-type: none"> Exame direto e histopatologia positivos Cultura de espécimens clínicos positiva Diagnóstico por imagem positivo Testes com antígenos positivos para <i>Cryptococcus sp.</i> Fungemia <ul style="list-style-type: none"> Hemocultura positiva Sinais e sintomas compatíveis Infecções Endêmicas <ul style="list-style-type: none"> Exame direto e histopatologia positivos Cultura/hemocultura positivas Testes com antígenos positivos Sinais e sintomas compatíveis
Infecção Fúngica Provável	<p>Critérios</p> <ul style="list-style-type: none"> Fatores do hospedeiro Fatores clínicos Fatores microbiológicos
Infecção Fúngica Possível	<p>Critérios</p> <ul style="list-style-type: none"> Fatores do hospedeiro Fatores clínicos ou fatores microbiológicos (ausência de um dos dois fatores)

Modificado de Holzheimer & Dralle (2002).

rios é menos profundo, apesar dos três elementos (fatores do hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos) estarem presentes (Donnelly, 2002). Na categoria possível, o critério relacionado ao hospedeiro está presente, mas há ausência de um dos outros dois (fatores clínicos ou fatores microbiológicos) provavelmente por não terem sido feitos ou serem negativos (Ascioglu *et al.*, 2002).

Infecção fúngica provada

a) Infecção Fúngica Profunda

Fungos Filamentosos: exame microscópico direto ou histopatologia de aspirados ou biopsia, mostrando hifas e evidência de destruição tecidual (microscopia e imagem) associada ou resultados positivos de cultura para amostras obtidas assepticamente de sítios anatómicos estéreis e/ou sítios com aspectos clínicos e radiológicos anormais consistentes com infecção (excluindo urina e/ou membranas mucosas).

Fungos Leveduriformes: exame microscópico direto ou histopatologia de aspirados e biopsia (excluindo membranas mucosas), mostrando células de levedura (*Candida sp.* pode também mostrar pseudo-hifas ou hifas verdadeiras) ou resultados positivos de cultura para amostras obtidas assepticamente de sítios anatómicos estéreis e/ou sítios com aspectos clínicos e radiológicos anormais consistentes com infecção (excluindo urina, seios nasais e membranas mucosas) ou ainda microscopia positiva (tinta da China, mucicarmim de Mayer) e/ou resultados positivos para antígenos de *Cryptococcus sp.* em líquido cefalorraquidiano.

b) Fungemia

Fungos Filamentosos: cultura de sangue positiva para fungos, excluindo-se *Aspergillus sp.* e espécies de *Penicillium* diferente de *Penicillium marneffeii* em pacientes com sinais clínicos e sintomas compatíveis com infecção fúngica.

Fungos Leveduriformes: cultura de sangue positiva para *Candida sp.* e outras leveduras em pacientes com sinais clínicos e sintomas compatíveis com infecção fúngica.

c) Infecções Fúngicas Endêmicas

Infecções sistêmicas ou confinadas ao pulmão: deve ser provada por cultura do sítio anatómico afetado e com sintomas atribuídos à infecção fúngica. Se resultados de culturas são negativos ou inaccessíveis, a demonstração por exame microscópico direto ou histopatologia é considerada suficiente para os fungos dimórficos (espécies de *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoc-*

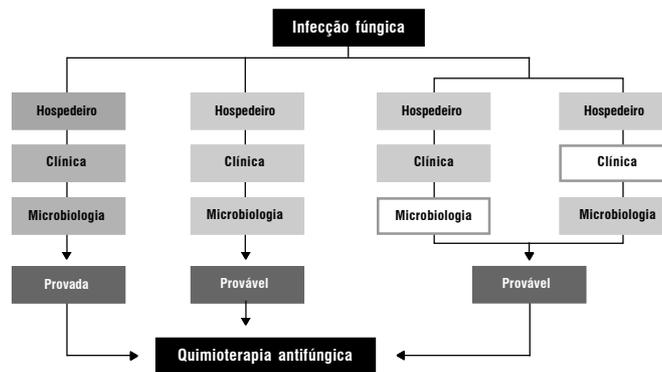


FIG.2 - Fluxograma de evidências de infecção fúngica invasiva.

cidioides). O *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* pode lembrar *Candida glabrata*.

Infecção Disseminada: pode ser estabelecida por hemocultura positiva ou teste positivo para antígenos na urina ou soro por radioimunoensaio.

Infecção fúngica provável

Estão presentes os fatores relacionados ao hospedeiro, fatores microbiológicos (com exceção de exame direto e histopatologia positivos para fungos e prova para antígenos de *Cryptococcus sp.* positiva) e fatores clínicos (principal ou dois secundários) em um sítio anatómico com alterações consistentes com infecção.

Infecção fúngica possível

Os fatores relacionados ao hospedeiro estão normalmente presentes, todavia, um dos outros dois critérios, fatores microbiológicos (com exceção de exame direto e histopatologia positivos para fungos e prova para antígenos de *Cryptococcus sp.* positiva) ou fatores clínicos (principal ou dois secundários), está ausente.

CONCLUSÃO

Objetivamente, segundo o Comitê da EORTC e NIAID (Ascioglu *et al.*, 2002), essas definições, apesar de ainda controversas, pretendem identificar grupos homogêneos de pacientes para a pesquisa clínica, além de estimular a discussão sobre o problema das micoses invasivas e subsidiar desenhos de ensaios clínicos e a interpretação de novos protocolos terapêuticos de controle das infecções fúngicas oportunistas em pacientes submetidos à quimioterapia antitumor ou a transplantes de célula-tronco.

REFERÊNCIAS

- Ascioglu, S.; Rex, J. H.; Pauw, B.; Bennett, J. E.; Bille, J.; Crokaert, F.; Denning, D. W.; Donnelly, J. P.; Edwards, J. E.; Erjavec, Z.; Fiere, D. Lortholary, O.; Maertens, J.; Meis, J. F.; Patterson, T. F.; Ritter, J.; Selleslag, D.; Shah, P. M.; Stevens, D. A. & Walsh, T. J. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patient with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An International Consensus. *Clinical Infectious Diseases* 34: 07-14, 2002.
- Denning, D. W.; Kibbler, C. C. & Barnes R. A. British Society for Medical Mycology Proposed Standards of Care for Patients with Invasive Fungal Infections. *Lancet Infectious Diseases* 3: 230-240, 2003.
- Donnelly, J. P. Symptoms and Diagnosis of Nosocomial Fungal Infections: State-of-The-Arts. *European Journal of Medical Research* 7: 192-199, 2002.
- Holzheimer, R. G. & Dralle, H. Management of Mycoses in Surgical Patients: Review of the Literature. *European Journal of Medical Research* 7: 200-226, 2002.
- Maertens, J.; Vrebo, M. & Boogaerts, M. Assessing Risk Factors for Systemic Fungal Infections. *European Journal of Cancer Care* 10: 56-62, 2001.
- McNeil, M. M.; Nash, S. L.; Hajjeh, R. A.; Phelan, M. A.; Conn, L. A.; Plikaytis, B. D. & Warnock, D. W. Trends in Mortality due to Invasive Mycotic Disease in the United States, 1980-1997. *Clinical Infectious Diseases* 33: 641-647, 2001.
- Singh, N. Trends in the Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections: Predisposing Factors and the Impact of Antimicrobial Use Practices. *Clinical Infectious Diseases* 33: 1692-1696, 2001.

Avaliação do InstantScreen na rotina, um ensaio ultra rápido para detecção de anticorpos anti-HIV-1/2*

Evaluation of InstantScreen under routine, an ultra rapid HIV-1/2 assay for the detection of HIV antibodies

Leonardo R. Motta¹; Ricardo S. de Souza¹; Vicent Wong²; Orlando Gómez-Marin³; Charles D. Mitchell³ & Heinrich H. Repke²

RESUMO – Objetivo: Avaliar o InstantScreen Rapid HIV-1/2 (GAIFAR GmbH, Alemanha), em condições de rotina em Caxias do Sul, RS, Brasil. Métodos: 781 amostras de soro foram coletadas de doadores de sangue, de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), de gestantes e de crianças (<12 meses de idade) atendidas em instituições de saúde locais. Os testes foram realizados entre o dia 1º de abril até 20 de dezembro de 2001. O soro foi pesquisado para a presença de anticorpos anti-HIV pelo InstantScreen assim como por testes de referência (Genscreen HIV-1/2 Version 2, Sanofi Pasteur; ICE HIV-1.0.2, Murex Diagnostics; e Abbott AxSYM HIV-1/HIV-2, Abbott Diagnostics). Resultados: 780 amostras testadas obtiveram os seguintes dados de desempenho: sensibilidade (IC = 95%) 160/160 = 100% (98-100%); especificidade (IC=95%) 620/620=100% (99-100%). Conclusão: O teste se mostrou de alta confiabilidade. As membranas do teste podem ser removidas, servindo de opção para a documentação permanente. Devido a facilidade de execução o teste é adequado para ser utilizado nas mais variadas condições de trabalho.

PALAVRAS-CHAVE – Diagnóstico, teste rápido, vírus da imunodeficiência humana.

SUMMARY – Objective: To evaluate InstantScreen Rapid HIV-1/2 (GAIFAR GmbH, Germany) under routine conditions in Caxias do Sul, Brazil. Methods: 781 sera samples collected from blood donors, patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), pregnant women and children (<12 months of age) attending local health centres. Tests were conducted between April 1, and December 20, 2001. Serum was screened for the presence of antibodies to HIV by InstantScreen as well as reference tests (Genscreen HIV-1/2 Version 2, Sanofi Pasteur; ICE HIV-1.0.2, Murex Diagnostics; and Abbott AxSYM HIV-1/HIV-2, Abbott Diagnostics). Results: 780 samples were tested resulting in the following performance data: sensitivity (95% CL) 160/160 = 100% (98-100%); specificity (95% CL) 620/620=100% (99-100%). Conclusion: The reliability of the test exceeds that of most laboratory assays. The test membranes can be removed, providing the option for permanent documentation. Accordingly, the test is suitable for use in any setting.

KEYWORDS – Diagnostics, rapid test, human immunodeficiency virus.

INTRODUÇÃO

A Síndrome Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), HIV tipo 1 (HIV-1)¹ e HIV tipo 2 (HIV-2)². A SIDA se propagou rapidamente, sendo que a maioria das infecções ocorrem em países em desenvolvimento pela transmissão através das transfusões de sangue³, contato sexual⁴, uso de drogas intravenosas⁵ ou através da transmissão perinatal⁶.

Como a transmissão do HIV é prevenível, o exame para HIV é uma importante estratégia de prevenção. O teste garante um diagnóstico precoce que, em caso de resultado positivo, pode retardar o aparecimento de doenças e faz com que o indivíduo deixe de transmitir o vírus involuntariamente.

O diagnóstico do HIV pode ser realizado através das seguintes metodologias: ensaio imunoenzimático (EIE ou ELISA), Western Blot, aglutinação de partículas, quimioluminescência, imunofluorescência indireta (IFI), detecção do RNA viral, pesquisa de antígeno p24 e testes rápidos⁷.

Testes sorológicos como ensaio imunoenzimático, ensaios de aglutinação de partículas e Western Blot para detecção de anticorpos anti-HIV tem sido úteis

no screening e no diagnóstico da infecção causada pelo HIV. Embora os ensaios imunoenzimáticos sejam amplamente utilizados por sua excelente sensibilidade, apresentam elevado custo, necessitam instrumentação auxiliar e apresentam metodologia complexa para serem realizados em campo. Os ensaios de aglutinação de partículas são, também, amplamente utilizados já que não requerem instrumentação complexa. Entretanto o tempo para obtenção dos resultados pode ser superior a uma hora, não sendo adequados para o uso em situações de emergência⁸. Considerando as limitações descritas acima, a utilização de um teste rápido para detecção de anticorpos anti-HIV permite a obtenção de resultados rápidos, com baixo custo, sensibilidade e especificidade adequadas, que podem ser utilizados em qualquer instalação.

O objetivo deste estudo foi avaliar um novo teste rápido, mais especificamente, o InstantScreen Rapid HIV-1/2 (GAIFAR GmbH, Alemanha), em condições de rotina em Caxias do Sul, RS, Brasil

MATERIAL E MÉTODOS

No período de 1º de abril a 20 de dezembro de 2001 foram coletadas 781 amostras de soro, provenientes de

Recebido em 10/5/2003

Aprovado em 12/01/2004

*Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em HIV/AIDS da Universidade de Caxias do Sul (UCS)

¹Laboratório de Pesquisa em HIV/AIDS da Universidade de Caxias do Sul (UCS); ²German-American Institute for Applied Biomedical Research GmbH (GAIFAR);

³Division of Immunology/Infectious Diseases - Dept. of Pediatrics - University of Miami

pacientes doadores de sangue, pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, gestantes e crianças (<12 meses de idade) atendidas em instituições de saúde locais. As amostras de sangue foram obtidas através de punção de sangue periférico, em tubos sem anticoagulante, em condições estéreis para obtenção de soro, o qual foi centrifugado e separado no período máximo de 3 horas após a coleta e refrigerado logo em seguida.

O InstantScreen é um teste ultra rápido para detecção de anticorpos anti-HIV-1 e anti HIV-2, que permite a obtenção dos resultados em tempo inferior a um minuto. O InstantScreen utiliza a uma tecnologia proprietária, baseada no uso de antígenos epítipo-combinantes que compreendem as regiões mais preservadas do HIV-1 e HIV-2. A construção deste antígenos utiliza a tecnologia de engenharia genética, o que resultou em um número aumentado de epítipos altamente antigênicos e a eliminação de locais que promovem ligações inespecíficas dos anticorpos.

São necessários 20mL de sangue total ou 10mL de soro ou plasma para execução do teste. A execução do InstantScreen consiste de três etapas que podem ser completadas em menos de um minuto:

(1) misturar a amostra de sangue, soro ou plasma, com o diluente (solução 1) e transferir para a membrana do teste;

(2) adicionar o detector (solução 2) à membrana do teste e;

(3) adicionar a solução de lavagem (solução 3). Todos os materiais acompanham o kit, que conta inclusive com lancetas e capilares para coleta do sangue.

Se a amostra não contiver anticorpos anti-HIV-1 ou anti-HIV-2, aparecerá um ponto azul no lado esquerdo da membrana. Este é controle do teste, indicando que o teste foi executado corretamente. Dois pontos azuis são indicativos de que a amostra analisada contém anticorpos anti-HIV-1 ou anti-HIV-2. Dependendo da titulação ou composição do anticorpo, que varia de paciente para paciente, a intensidade de cor do ponto pode ser mais ou menos intensa que a do ponto controle. O teste é dado como inválido, quando não houver a formação do ponto controle na membrana, indicando que o teste foi executado incorretamente, ou que há um problema com a amostra. Nestes casos, é recomendável coletar uma nova amostra para repetição do teste.

O seu sistema de detecção baseado em OCA-particles (Optimal Catch Avidity Particles) permite que o InstantScreen seja armazenado a temperatura ambiente (-20°C a +45°C).

O resultado obtido pelo InstantScreen, foi comparado aos obtidos através testes de referência (Genscreen HIV-1/2 Version 2, Sanofi Pasteur; ICE HIV-1.0.2, Murex Diagnostics; e Abbott AxSYM HIV-1/HIV-2, Abbott Diagnostics).

RESULTADOS

Das 780 amostras testadas foram obtidos os seguintes dados de desempenho: sensibilidade (IC = 95%) 160/160 = 100% (98-100%); especificidade (IC = 95%) 620/620 = 100% (99-100%).

As amostras que obtiveram resultado positivo foram submetidas ao método confirmatório de Western Blot, obedecendo os critérios propostos pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial da Saúde (OMS).

É digno de nota que um bebê de seis meses de idade, nascido de uma mãe HIV-positiva, obteve resultado negativo pelo InstantScreen, enquanto dois ELISAs e um Western Blot deram resultado positivo. Seis meses mais tarde ambos, os testes de referência e o InstantScreen, confirmaram o status soro-negativo da criança.

DISCUSSÃO

Quando comparado a outros testes rápidos disponíveis comercialmente no Brasil, o InstantScreen demonstrou algumas vantagens. Enquanto a maioria dos testes requer volumes superiores a 50mL de sangue total, o InstantScreen requer apenas 20mL de sangue total, ou apenas 10mL de soro ou plasma. Não requer quaisquer equipamentos além daqueles contidos no kit. Por se tratar de um exame de baixa complexidade na execução, o InstantScreen não necessita pessoal altamente especializado. Outra característica marcante é a leitura visual do resultado em menos de 1 minuto.

Os testes são embalados individualmente e apresentam longo prazo de validade (2 anos), permitindo a realização do teste em laboratórios que apresentam número pequeno de testes. Além disso, o InstantScreen não requer refrigeração, podendo ser armazenado a temperatura ambiente (-20°C a +45°C). Essa característica é importante para o uso do mesmo em zonas rurais ou de difícil acesso, nas quais eletricidade ou refrigeração podem não estar disponíveis.

O teste ideal para o diagnóstico rápido do HIV seria um teste de fácil e rápida execução, baixo custo, com alta sensibilidade e especificidade, em que os resultados sejam fáceis de interpretar, que possa ser armazenado a temperatura ambiente, que apresente amplo prazo de validade e que não necessite equipamentos auxiliares para execução⁹. O InstantScreen preenche esses critérios e provou ser uma importante ferramenta no diagnóstico da infecção causada pelo HIV.

REFERÊNCIAS

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., et al. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from patient at risk for acquired immunodeficiency virus (AIDS). *Science* 220: 868-971. 1983.
2. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Charmaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferrera, M.O., et al. Isolation of a new human retrovirus from W. Africa patients with AIDS. *Science* 233:343-346. 1986.
3. Carson, J.L., Russel, L.B., Taragin, M.I., Sonnenberg, F.A., Duff, A.E., Bauer, S. The risk of blood transfusion: the relative influence of acquired immunodeficiency syndrome and non-A, non-B hepatitis. *Am. J. Med.* 92: 45-52. 1992.
4. Mastro, T.D., Satten, G.A., Nopkesorn, T., Sangkharomya, S., Longini Jr., I.M. Probability of female-to-male transmission of HIV-1 in Thailand. *Lancet* 343: 204-207. 1994.
5. Gibbs, D.A., Hamill, D.N., Magruder-Habib, K. Populations at increased risk of HIV infection: current knowledge and limitations. *J. Acquir Immune Defic Syndr* 4(9): 881-889. 1991.
6. Sherwen, L.N. Human immunodeficiency virus infection during the perinatal period: a review of literature concerning pregnant women and neonates. *J. Perinatol* 15(1): 54-66. 1995.
7. Ferreira, A.W., Ávila, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996.
8. Arai, H., Petchclai, B., Khupulsup, K., Kurinura, T., Takeda, K. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for Detection of Antibodies to Human Immunodeficiency Virus. *J. Clin. Microbiol.* 37(2): 367-370. 1999.
9. Malone, J.D., Smith, E.S., Sheffield, J., Bigelow, D., Hyams, K.C., Beardsley, S.G., Lewis, R.S., Roberts, C.R. Comparative evaluation of six rapid serological tests for HIV-1 antibody. *J. Acquir Immune Defic. Syndr.* 6:115-119. 1993.

Endereço para correspondência

Leonardo R. Motta

Lab. de Pesquisa em HIV/AIDS - Univ. de Caxias do Sul (UCS) - S/502 - Bl. S

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Bairro Petrópolis

Caxias do Sul - RS - Brasil CEP: 95001-970

e-mail: lrmotta@terra.com.br

Detecção de *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *Stx**

Detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* (STEC) by amplification of *Stx* genes

Fabiana De Toni¹, Emanuel M. de Souza², Giseli Klassen³, Liu Un Rigo², Maria Berenice R. Steffens², Cristina R. da Cruz⁴, Geraldo Picheth¹, Sônia M.S.S. Farah⁵ & Cyntia M.T. Fadel-Picheth¹

RESUMO – As *Escherichia coli* Shiga Toxigênicas (STEC) são patógenos emergentes, causadores de diarreia e doenças graves como colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica. As STEC diferenciam-se das demais estirpes de *E. coli* pela produção de um ou dois tipos de toxina denominada toxina Shiga 1 e 2, codificadas pelos genes *Stx*₁ e *Stx*₂, respectivamente. O diagnóstico microbiológico das infecções causadas por STEC é dificultado pelo rápido decréscimo no número de organismos excretados nas fezes após o início dos sintomas e pela diversidade bioquímica e sorológica das estirpes de STEC. O objetivo deste trabalho é estabelecer um protocolo de PCR para a detecção de STEC que seja adequado para a rotina dos laboratórios clínicos. As culturas de estirpes de STEC e outros organismos usados como controles, e das amostras de fezes diarreicas foram realizadas em ágar MacConkey e incubadas a 36°C por 18-24 horas. A extração de DNA foi realizada pelo método da fervura. Na PCR foi utilizado um único par de iniciadores, ATACAGAGGGA/GGA/GATTTTCGT e CC/ATGATGATGG/ACAATTCAG, capaz de detectar os genes *Stx*₁, *Stx*₂ e seus variantes numa mesma reação através da amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 220 pares de base (pb). A PCR foi realizada em volume de 50mL contendo 10mL de DNA, tampão Taq 1X; MgCl₂ 1,5mM; dNTP 200mM; iniciadores 1mM cada; Taq DNA Polimerase 2U. Empregou-se 1 ciclo de 94°C por 5 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 47°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 2%. DNA extraído das estirpes de STEC O157:H7 (*Stx*₁, *Stx*₂) e O111 (*Stx*₁) permitiu a amplificação de um fragmento de cerca de 220 pb, mas nenhum produto de amplificação foi produzido quando o DNA de *E. coli* ATCC 25922 e de outros organismos controle não produtores de *Stx* foi utilizado. Foram analisadas 123 culturas de fezes e 3 apresentaram amplificação do fragmento de DNA de cerca de 220 pb, sugerindo a presença de *Stx*. O protocolo descrito neste trabalho mostrou-se sensível, específico e adequado ao laboratório clínico.

PALAVRAS CHAVE – *Escherichia coli* Shiga Toxigênica, Toxina Shiga, genes *Stx*, *Stx*.

SUMMARY – Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) are emergent pathogens known to cause diarrhea and serious diseases as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. STEC differ from other *E. coli* because of the production of Shiga toxins 1 and 2, encoded by *Stx*₁ and *Stx*₂ genes respectively. The microbiological diagnosis of STEC infections is complicated by a rapid decrease in the number of excreted pathogens in feces after the onset of symptoms and by STEC serotype and biochemical diversity. The aim of this work is to establish a PCR protocol for STEC detection useful for clinical laboratories. Cultures of STEC strains and other control organisms, as well as the stool samples were realized in MacConkey and incubated at 36°C for 18-24 hours. DNA extraction was done by the boiling method. A primer pair, ATACAGAGGGA/GGA/GATTTTCGT and CC/ATGATGATGG/ACAATTCAG, capable to detect *Stx*₁, *Stx*₂ and variant genes was used in PCR producing a 220 bp DNA fragment. PCR was realized in a final volume of 50 mL containing 10 mL DNA, 1X buffer Taq; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 mM; primers 1mM each; Taq DNA Polimerase 2U. The following conditions were used 1 cycle at 94°C for 5 min. and 35 cycles at 94°C for 1 min., 47°C for 30s and 72°C for 30s, followed by one cycle at 72°C for 10 min. The products were detected by gel electrophoresis. STEC strains O157:H7 (*Stx*₁, *Stx*₂) and O111 (*Stx*₁) showed a 220 bp amplification fragment, no product was detected when DNA from *E. coli* ATCC 25922 and other non Shiga producing organisms was tested. 123 stools cultures were analysed and 3 showed the amplification fragment of 220 bp, suggesting the presence of *Stx*. This protocol was shown to be sensitive, specific and suitable for clinical laboratories.

KEYWORDS – Shiga Toxigenic *Escherichia coli*, Shiga toxin, *Stx* genes, *Stx*.

INTRODUÇÃO

As *Escherichia coli* Shiga Toxigênicas (STEC) constituem um grupo bioquímico e sorologicamente heterogêneo de *E. coli*, do qual o sorotipo O157:H7 é o mais conhecido, embora existam mais de 100 sorogrupos diferentes de STEC associados com doença (WHO 1997, 1998; Bopp *et al.*, 1999). As STEC podem causar diversos quadros clínicos que variam de diarreia e colite hemorrágica a síndrome urêmico-hemolítica e

púrpura trombocitopênica trombótica (Griffin e Boyce, 1998; Kuntz e Kuntz, 1999).

A patogênese da infecção causada por estes organismos ainda não é completamente compreendida, e as STEC podem apresentar diversos fatores de virulência, cuja ocorrência varia entre as diferentes estirpes (Boerlin *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). Mas a principal característica associada com o desenvolvimento da síndrome urêmico-hemolítica e fator de virulên-

Recebido em 09/4/2003
Aprovado em 05/01/2004

*Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná

¹Curso de Farmácia, Departamento de Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná/UFPR; ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR

³Departamento de Patologia Básica - UFPR; ⁴Departamento de Pediatria/UFPR; ⁵Laboratório Central do Estado do Paraná/LACEN

cia comum a todas as STEC é a produção de toxinas Shiga (Stx), codificadas pelos genes *Stx*. As *Stx* foram originalmente isoladas de *Shigella dysenteriae* tipo I, e a presença de toxinas similares em *E. coli* foi inicialmente descrita por Konowalchuck *et al.* (1977). Posteriormente as estirpes de *E. coli* produtoras de toxinas Shiga foram associadas com casos de colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica (Karmali *et al.*, 1983), relacionadas ao consumo de alimentos contaminados. A partir de então estes organismos emergiram como patógenos veiculados por alimentos e representam um importante problema de saúde pública (Feng, 1995; WHO 1997, 1998). As *Stx* produzidas pelas STEC são classificadas em 2 grupos denominados de *Stx1* e *Stx2*. Os genes estruturais para as toxinas *Stx1* e *Stx2*, denominados respectivamente de *Stx₁* e *Stx₂*, apresentam cerca de 58% de homologia na seqüência de nucleotídeos (Jackson *et al.*, 1987). O grupo *Stx1* é relativamente homogêneo, sendo *Stx1c* a forma que apresenta a maior variação (Paton e Paton, 1998; Zhang *et al.*, 2002). O grupo *Stx2* compreende além de *Stx2* diversas outras formas que podem apresentar considerável variação na sua seqüência (Gannon *et al.*, 1990; Paton *et al.*, 1993; Rüssmann *et al.*, 1994; Piérard *et al.*, 1998).

Casos isolados e surtos de infecção causados por STEC têm sido descritos em várias partes do mundo (WHO, 1998; Karch *et al.*, 1999). No Brasil existem poucos relatos sobre as infecções causadas por STEC, o que possivelmente é devido ao fato de que estes organismos não são pesquisados de rotina nos laboratórios clínicos. Ainda assim, casos de infecção por STEC O157:H7 ou STEC não-O157 foram relatados em pacientes com diarreia ou síndrome urêmica-hemolítica (Cantarelli *et al.*, 2000; Irino *et al.*, 2000, 2002; Guth *et al.*, 2002). A importância da detecção das STEC se reflete nas decisões clínicas adotadas no cuidado do paciente, como evitar o uso de antimicrobianos, uma vez que o uso destes medicamentos pode aumentar a liberação da toxina e levar à piora do quadro clínico (Kimmitt *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000); evitar procedimentos diagnósticos invasivos desnecessários e terapia inadequada no caso de pacientes com colite hemorrágica; o monitoramento dos pacientes quanto ao desenvolvimento de sinais de síndrome urêmica-hemolítica; e na condução das investigações epidemiológicas para detectar casos adicionais de infecção, bem como na implementação de medidas para interromper a disseminação da infecção (Karch *et al.*, 1999).

Diversos métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico da *E. coli* O157:H7, a primeira STEC a ser descrita, e estão comercialmente disponíveis para o diagnóstico deste organismo (Karch *et al.*, 1999; Kehl, 2002). A maioria destes métodos, como o ágar MacConkey Sorbitol e os imunoenaios sorotipos específicos, não detectam as STEC não-O157, que são predominantes em muitos países incluindo o Brasil (Fey *et al.*, 2000; Irino *et al.*, 2000). Ensaio capazes de detectar também os sorotipos não-O157 como a hibridização em colônia, "imunoblotting", pesquisa de toxinas e os ensaios moleculares, apresentam inconvenientes como custo elevado, dificuldades técnicas para a sua realização e o fato de nem todos estarem disponíveis comercialmente (Karch *et al.*, 1999; Kehl, 2002).

A PCR é um método de diagnóstico molecular que está se tornando comum no laboratório clínico, e é o método recomendado atualmente para a detecção das

STEC, embora ainda não esteja comercialmente disponível. O objetivo deste trabalho é propor um protocolo de PCR para a triagem de STEC em amostras de fezes, que seja adequado para o laboratório clínico.

MATERIAIS E MÉTODOS

• Amostra

Bactérias e condições de cultivo. As estirpes de STEC O157:H7 (*Stx₂⁺*), O157:H7 (*Stx₁⁺ Stx₂⁺*) O111:H8 (*Stx₁⁺*), cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz, foram utilizadas como controles positivos. *E. coli* ATCC 25922 (*Stx₁⁻ Stx₂⁻*) foi utilizada como controle negativo. *E. hermannii*, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), estirpes de *E. coli* isoladas de amostras clínicas, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, e *Salmonella choleraesuis* foram utilizadas para avaliar a especificidade do teste. As culturas de *E. faecalis* e *S. aureus* foram realizadas em ágar CLED (Difco), as demais bactérias foram cultivadas em ágar MacConkey (Difco). As culturas foram incubadas em aerobiose a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Amostras clínicas. Foram analisadas 123 amostras de fezes de pacientes apresentando quadro diarréico, provenientes do Hospital de Clínicas da UFPR – Setor de Pediatria, Laboratório do Hospital Pequeno Príncipe, Laboratório Champagnat, Laboratório de Parasitologia / UFPR e Laboratório Central do Estado – Curitiba PR (LACEN). As amostras foram transportadas em Cary-Blair e mantidas à temperatura ambiente até serem inoculadas. As culturas foram realizadas em ágar MacConkey (Difco) e incubadas em aerobiose a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR (protocolo CEP-HC n.º. 062EXT016/2002-10).

• Extração de DNA

Para a extração de DNA uma porção da região de crescimento confluyente da cultura foi retirada com a alça bacteriológica, suspensa em 0,5mL de água destilada estéril e submetida à fervura durante 20 minutos para a lise celular e extração do DNA (Olsvik e Strockbine, 1993). Após a fervura a mistura foi centrifugada a 14000 x g durante 1 minuto e o sobrenadante transferido para um novo tubo, que foi mantido a -20°C até o momento do uso na reação de amplificação.

• Reação em cadeia da polimerase

Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen (SP) e apresentam as seqüências 5'-ATACAGAGA/GGA/GATTTTCGT-3' e 5'-CC/ATGATGATGACAATTCAG - 3'. A seqüência dos iniciadores foi descrita por Paton *et al.*, (1993), mas a seqüência do último foi modificada no presente trabalho para permitir o reconhecimento de mais um alelo de *Stx₂*. A presença de nucleotídeos alternativos em algumas posições possibilita que os iniciadores sejam capazes de detectar *Stx₁* e *Stx₂* e suas principais variantes. Os iniciadores possibilitam a amplificação da região compreendida entre os nucleotídeos 821 a 1034 da subunidade A do gene *Stx₂* (Jackson *et al.*, 1987), produzindo um fragmento de 213 pares de bases (pb) para o genes *Stx₂* e de 216 pb para o gene *Stx₁*. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50µL contendo 10µL de DNA, tampão Taq 1X (LabTrade); MgCl₂ 1,5mM; dNTP 200µM

(Eppendorff); iniciadores 1mM cada; Taq DNA Polimerase 2U (LabTrade). A amplificação foi realizada em termociclador Hybaid Omni Gene utilizando o seguinte programa: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 47°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. As amostras que apresentaram o fragmento de aproximadamente 220pb foram ensaiadas novamente utilizando 52°C como temperatura de anelamento.

• **Detecção dos produtos de amplificação**

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Gibco) a 2% em tampão TBE (Sambrook *et al.*, 1989). 10µL do produto de cada reação foram adicionados de 5µL de "loading dye" (Sambrook *et al.*, 1989), aplicado no gel de agarose a 2% e submetido à corrida eletroforética realizada a 35V durante 90 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5mg/ml) durante 30 minutos e visualizado sob luz UV (312nm). As imagens foram capturadas pelo sistema Kodak Digital Science 1D.

• **Identificação bioquímica**

Nas amostras que apresentaram banda de amplificação de DNA de aproximadamente 220 pb, colônias isoladas obtidas a partir do ágar MacConkey foram utilizadas para confirmar a presença de genes que codificam para as toxinas Shiga e para a identificação bioquímica, empregando o sistema API 20E (bioMérieux) ou o sistema convencional para a identificação de enterobactérias. As *E. coli* assim caracterizadas foram testadas frente ao antisoro anti - O157.

• **Detecção da produção de toxina Shiga**

As bactérias consideradas como portadoras de genes *Stx*₁, *Stx*₂ ou seus alelos através de PCR, foram analisadas em paralelo quanto à produção de toxina Shiga através de aglutinação passiva reversa, empregando látex sensibilizado com anticorpos antitoxinas Shiga 1 e 2. Foram utilizados os reagentes do sistema VTEC-Screen "Seiken" (Denka Seiken Co. Ltda, Japão).

• **Determinação da sensibilidade do método**

Culturas de fezes de controles saudáveis, preparadas como descrito acima e suspensas em 0,5mL de água estéril foram inoculadas com concentrações conhecidas de STEC O157:H7 e submetidas à extração de DNA. 10µL do extrato foram utilizados na reação de amplificação.

RESULTADOS

Com o objetivo de estabelecer um protocolo para triagem de STEC em fezes, que fosse sensível, específico, e de custo acessível ao laboratório clínico, optou-se por um método de extração de DNA simples, rápido e de baixo custo, associado ao uso de iniciadores que permitem a detecção dos genes *Stx*₁, *Stx*₂ e variantes, num único ensaio. Para a extração de DNA foi utilizado o método da fervura descrito em Olsvik e Strockbine (1993). Os iniciadores descritos por Paton *et al.* (1993), com as modificações descritas no presente trabalho, permitiram a amplificação dos genes *Stx*₁ e *Stx*₂, detectada através de fragmentos de DNA de aproximadamente 220 pb como mostrado na Fig. 1. A ampli-

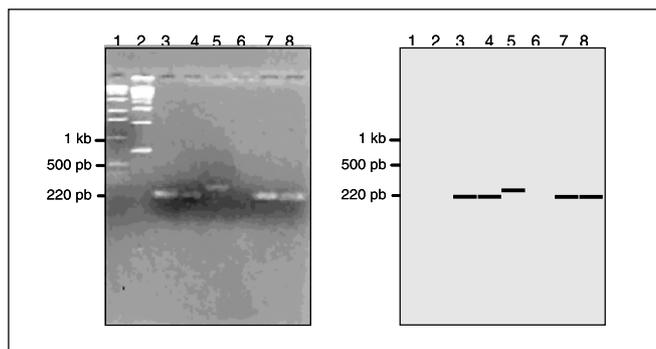


FIG. 1 – Detecção dos produtos de amplificação dos genes *stx*: (1) 1 Kb DNA Ladder; (2) pCB10 digerido com *Hind* III; (3) amostra 3; (4) amostra 83; (5) amostra 104; (6) amostra 95; (7) STEC O111:H8 (*stx*₁⁺); (8) STEC O157:H7 (*stx*₁⁺, *stx*₂⁺). Os fragmentos de DNA de interesse encontram-se em destaque no esquema ao lado.

ficação deste fragmento foi observada com o DNA extraído das estirpes de STEC O157:H7 (*Stx*₁⁺ *Stx*₂⁺), O157:H7 (*Stx*₂⁺) e O111:H8 (*Stx*₁⁺), e mostrou-se reprodutível nas condições de ensaio utilizadas. Quando foi utilizado como molde DNA extraído de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e outras estirpes de *E. coli* isoladas de amostras clínicas, *E. hermannii*, *S. flexneri*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *P. mirabilis*, *A. calcoaceticus*; *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. aureus*, organismos não produtores de *Stx*, nenhum produto de amplificação foi detectado, mostrando a especificidade da reação.

Cento e vinte e três amostras de fezes diarreicas foram analisadas através deste protocolo. Destas, 3 apresentaram bandas de amplificação de aproximadamente 220 pb, compatível com a presença de genes *Stx* (Fig. 1, linhas 3 e 4). Uma das amostras apresentou uma banda de amplificação de tamanho maior que o esperado para *Stx*₁ e *Stx*₂ (Fig. 1, linha 5). Estas bandas persistiram, mesmo quando foi realizada nova PCR utilizando 52°C como temperatura de anelamento, condição de maior estrinência que aumenta a especificidade da reação, sugerindo a presença dos genes *Stx*₁, *Stx*₂ ou seus variantes. Colônias isoladas obtidas a partir das culturas destas amostras em ágar MacConkey foram então analisadas com o intuito de identificar aquelas que apresentavam os genes para a toxina Shiga e caracterizá-las bioquímica e sorologicamente. As bactérias associadas com a produção da banda de aproximadamente 220 pb foram identificadas bioquimicamente como *E. coli*, e não reagiram com o anticorpo anti-O157, sendo caracterizadas como STEC não-O157. Quando analisadas através do imunoensaio "VTEC-Screen Seiken" estas bactérias mostraram uma reação positiva, confirmando a produção das toxinas *Stx*₁ e/ou *Stx*₂, o que reforça a confiabilidade do protocolo de PCR proposto no presente trabalho. A frequência de STEC na amostra estudada foi de 2,4%.

O organismo que apresentou uma banda de aproximadamente 300 pb, maior que o esperado para os genes *Stx*, foi identificado como *Citrobacter freundii*. Quando ensaiado quanto à produção de toxina Shiga, frente aos anticorpos anti-*Stx*₁ e anti-*Stx*₂, apresentou reação negativa.

Em algumas das amostras, foi observada a presença de bandas de amplificação inespecífica, de tamanho maior que o esperado para *Stx*₁ e *Stx*₂ (dados não mostrados) e também muito maiores que o observado para

o *C. freundii*. Estas bandas de amplificação inespecífica desapareceram quando a PCR foi realizada utilizando temperatura de anelamento de 52°C, indicando a ausência daqueles genes nas amostras analisadas.

A sensibilidade para detecção das STEC por PCR foi avaliada utilizando culturas de fezes artificialmente contaminadas com concentrações conhecidas de *E. coli* O157:H7. Com o protocolo proposto foi possível detectar aproximadamente 100UFC de STEC/mL, caracterizando este procedimento como um método sensível.

DISCUSSÃO

A PCR é o método de diagnóstico molecular mais utilizado para a triagem de amostras clínicas para STEC, diversos protocolos estão descritos na literatura. O objetivo deste trabalho foi propor um protocolo de PCR para triagem de STEC em amostras de fezes, adequado para a rotina laboratorial. Este protocolo foi baseado no método descrito por Paton *et al.* (1993), que desenvolveram um procedimento que emprega apenas um par de iniciadores que permite reconhecer especificamente os genes *Stx*₁ e *Stx*₂ e principais variantes em uma mesma reação, entretanto a seqüência de um dos iniciadores foi modificada no presente trabalho para permitir o reconhecimento de mais uma forma variante de *Stx*. Tal abordagem permite a realização de uma única PCR para a detecção das STEC e reduz custos. Paton *et al.* (1993), realizaram as culturas em meios líquidos, por períodos de 4 horas ou mais, possibilitando a redução do tempo de ensaio. Entretanto na etapa de extração de DNA foram utilizados procedimentos que envolvem as enzimas Proteinase K e Lisozima, o que implica em custo elevado. Quando esta técnica foi testada em nossas condições de trabalho verificamos que em algumas amostras de fezes, artificialmente contaminadas com *E. coli* O157:H7, não ocorria amplificação, provavelmente devido à presença de inibidores da Taq DNA Polimerase na reação. As mesmas amostras cultivadas em ágar MacConkey e tratadas paralelamente pelas metodologias de extração de DNA descritas por Olsvik e Strockbine (1993) e Ausubel *et al.* (1999) não apresentaram inibição (dados não mostrados). A extração de DNA através do método da fervura (Olsvik e Strockbine, 1993), mostrou-se atrativa devido à simplicidade, rapidez de execução e baixo custo, e apresentou bom desempenho em termos de sensibilidade e especificidade na PCR o que levou à sua adoção no presente trabalho. Assim o protocolo proposto no presente trabalho emprega procedimentos descritos por Olsvik e Strockbine (1993), e Paton *et al.* (1993), com modificações. A positividade encontrada para STEC foi de 2,4%, embora estes sejam resultados preliminares, e está dentro da faixa de 1,5 a 4,0% descritos por autores que pesquisaram a presença de STEC através de fatores de virulência (Kehl, 2002). A detecção neste trabalho de estirpes de STEC não-O157 não é inesperada e está de acordo com os dados de Irino *et al.* (2000) e Vaz *et al.* (2004), que indicam a predominância das não-O157 no Brasil. A detecção destas estirpes não teria sido possível se o ágar MacConkey Sorbitol, método de diagnóstico mais comumente utilizado nos laboratórios clínicos, tivesse sido empregado para a triagem das amostras.

A estirpe de *C. freundii* isolada apresentou um cres-

cimento intenso a partir da cultura de fezes diarreicas, o que sugere que esteja associada ao processo patológico. O resultado negativo verificado no VTEC-Screen Seiken não exclui a produção de toxina Shiga por este microrganismo devido à variabilidade presente neste grupo de toxinas, e ao desempenho do teste utilizado. Segundo Beutin *et al.* (2002), o teste VTEC-Screen Seiken não foi capaz de detectar *Stx*₂ em todas as amostras de STEC analisadas que apresentavam o gene *Stx*₂ e reagiu fracamente ou não reagiu com algumas das variantes de *Stx*₂. A presença de toxinas Shiga pertencentes ao grupo *Stx*₂, já foi descrita em *C. freundii* (Schmidt *et al.*, 1993). Aquelas toxinas não foram neutralizadas por anticorpos anti-*Stx*₁, apresentaram discreta redução da sua atividade citotóxica quando tratada com anticorpos anti-*Stx*₂, e foram neutralizadas por com anticorpos anti-*Stx*₂vhc (Schmidt *et al.*, 1993), uma variante de *Stx*₂. O resultado da PCR não indica a presença de genes *Stx* neste organismo, mas o seqüenciamento do produto de PCR obtido com DNA de *C. freundii* poderá auxiliar a esclarecer este quadro.

Em síntese, a nossa proposta para estabelecer um protocolo de PCR para a detecção de STEC que seja custo efetivo baseou-se na cultura de fezes em ágar MacConkey, seguida da extração de DNA pelo método da fervura (Olsvik e Strockbine, 1993) e PCR realizada com iniciadores capazes de detectar os genes *Stx*₁, *Stx*₂, e principais variantes em uma única reação. Dessa forma os organismos presentes nas fezes são triados simultaneamente quanto à presença dos genes para as toxinas Shiga. Este procedimento apresentou uma boa especificidade para STEC, independentemente do sorotipo.

A importância da triagem de amostras de fezes para a presença de STEC reflete-se na seleção da terapia do paciente, e o desempenho do laboratório é fundamental nesta situação. O procedimento descrito neste trabalho pode ser uma alternativa prática, eficiente e de custo acessível ao laboratório clínico para a triagem de STEC em amostras de fezes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pelo apoio oferecido no desenvolvimento deste trabalho. À Dr^a. Kinue Irino e ao Instituto Adolfo Lutz pela doação das estirpes de STEC. Ao Laboratório Champagnat, ao Dr Rogério Kopp, ao Dr. Sérgio L. dos Santos, Dr. Cláudio de Biaggi e Dr. Aldir R. Gottardi pela coleta das amostras, e à CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. Short protocols in molecular biology. 4.ed., Nova Iorque, Wiley, 1999.
2. Beutin, L.; Zimmermann, S.; Gleier, K. Evaluation of the VTEC-Screen "Seiken" test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin) –producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 42:1-8, 2002.
3. Boerlin, P.; McEwen, S.A.; BoerlinPetzold, F.; Wilson, J. B.; Johnson, R.P.; Gyles, C.L. Associations between virulence factors of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.*, 37:497-503, 1999.
4. Bopp, C. A.; Brenner, F. W.; Wells, J. G.; Strockbine, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: Murray, Patrick R.; Baron, Ellen Jo; Tenover, Fred C.; Tenover, Fred C.; Tenover, Robert H. Manual of Clinical Microbiology. 7.ed. ASM Press. p. 459-474, 1999.
5. Cantarelli, V.; Nagayama, K.; Takahashi, A.; Honda, T.; Cauduro, P.F.; Dias, C.A.G.; Mezzari, A.; Brodt, T. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)

- serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 31:266-170, 2000.
6. Feng, P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerg. Infect. Dis.*, 1:47-52, 1995.
 7. Fey, P.D.; Wickert, R. S.; Rupp, M. E.; Safranek, T. J.; Hinrichs, S. H. Prevalence of non-O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. *Emerg. Infect. Dis.*, 6:530-533, 2000.
 8. Gannon, V.P.J.; Teerling, C.; Masri, S. A. Gyles, C. L. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.*, 136:1125-1135, 1990.
 9. Griffin, P.M.; Boyce, T. G. In: Scheld, M. W.; Armstrong, D.; Hughes, J. M. Emerging infections. ASM Press. p.137-146, 1998.
 10. Guth, B.E.C.; Souza, R.L.; Vaz, T.M.I.; Irino, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 8:535-536, 2002.
 11. Irino, K.; Gomes, T.A.T.; Vaz, T.I.; Kano, E.; Kato, M.A.M.F.; Dias, A.M.G.; Gonçalves, C. R.; Guth, B.E.C. Prevalence of Shiga toxin and intimin gene sequences among *Escherichia coli* of serogroups O26, O55, O111, O119, and O157 isolated in São Paulo, Brazil. Program & Abstracts of the 4th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections", realizado em Kyoto, Japão de 29 de outubro a 2 de novembro de 2000. p. 107, resumo 226.
 12. Irino, K.; Vaz, T. M. I.; Kato, M. A. M. F.; Naves, Z. V. F.; Lara, R. R.; Marco, M. E. C.; Rocha, M. M. M.; Moreira, T. P.; Gomes, T. A. T.; Guth, B. E. C. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 8:446-447, 2002.
 13. Jackson, M. P.; Neill, R. J.; O'Brien, A. D.; Holmes, R. K.; Newland, J. W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Lett.*, 44:109-114, 1987.
 14. Karch, H.; Bielaszewska, M.; Bitzan, M.; Schmidt, H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 34:229-243, 1999.
 15. Karmali, M. A.; Steele, B. T.; Petric, M.; Lim, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, 1:619-620, 1983.
 16. Kehl, S.C. Role of the laboratory in the diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *J. Clin. Microbiol.*, 40:2711-2715, 2002.
 17. Kimmitt, P. T.; Harwood, C. R.; Barer, M. R. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.*, 6: 2000.
 18. Konowalchuk, J.; Speirs, J. I.; Stavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18:775-779, 1977.
 19. Kuntz, T. B.; Kuntz, S. Enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Prim. Care Update Ob/Gyns.*, 6:192-196, 1999.
 20. Olsvik, O.; Strockbine, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: Persing, D. H.; Smith, T. F.; Tenover, F. C.; White, T. J. Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications, p. 271-276. ASM Press, 1993.
 21. Paton, A. W.; Paton, J. C.; Goldwater, P. N.; Manning, P. A. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31:3063-3067, 1993.
 22. Paton, A. W.; Paton, J. C.; Manning, P. A. Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons. *Microbiol. Pathog.*, 15:77-82, 1993.
 23. Paton, J. C.; Paton, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:450-479, 1998.
 24. Piérard, D.; Muyltermans, G.; Moriau, L.; Stevens, D.; Lauwers, S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 36:3317-3322, 1998.
 25. Rüssmann, H.; Schmidt, H.; Heesemann, J.; Caprioli, A.; Karch, H. Variants of Shiga-like toxin constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.*, 40:338-343, 1994.
 26. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. Nova Iorque, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 27. Schmidt, H.; Montag, M.; Bockemühl, J.; Heesemann, J.; Karch, H. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.*, 61:534-543, 1993.
 28. Schmidt, H.; Geitz, C.; Tarr, P.; Frosch, M.; Karch, H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.*, 179:115-123, 1999.
 29. Vaz, T. M. I.; Irino, K.; Kato, M. A. M. F.; Dias, A. M. G.; Gomes, T. A. T.; Medeiros, M. I. C.; Rocha, M. M. M.; Guth, B. E. C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J. Clin. Microbiol.*, 42:903-905, 2004.
 30. W.H.O. 1997. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/97.6.
 31. W.H.O. 1998. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/97.6.
 32. Wong, C. S.; Jelacic, S.; Habeeb, R. L.; Watkins, S. L.; Tarr, P. I. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *New Eng. J. Med.*, 342:1930-1936, 2000.
 33. Zhang, W.; Bielaszewska, M.; Kuczius, T.; Karch, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*Stx₁*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.*, 40:1441-1446, 2002.

Endereço para correspondência

Prof^o Dr^a Cyntia M. T. Fadel Picheth
 Laboratório de Bacteriologia Clínica - Curso de Farmácia - UFPR
 Rua Lothário Meissner, 3400 - Jardim Botânico - 80210-170 - Curitiba - PR
 fpicheth@ufpr.br

Oportunidade aos professores de análises clínicas

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC, é uma sociedade científica que tem por finalidade congrega 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 congrega 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.

Suscetibilidade antimicrobiana de *Salmonellas* isoladas de ambiente aquático*

Salmonellas' antimicrobial susceptibility isolated from aquatic environments

Maricelma Ribeiro Moraes¹; Raissa Mayer Ramalho Catão¹ & Beatriz Susana O. de Ceballos²

RESUMO – *Salmonella* é um dos enteropatógenos que causam sérios danos à saúde pública. Nos países em desenvolvimento, é comum a presença de espécies de *Salmonella* provenientes de material humano enquanto que espécies oriundas de animais predominam nos países desenvolvidos, devido à industrialização em larga escala de produtos alimentícios e rações para animais que favorecem sua disseminação. Estas *Salmonellas* atingem os reservatórios de águas, tornando-os impróprios ao consumo humano. Além do aumento da contaminação dos recursos hídricos, outro aspecto preocupante diz respeito ao surgimento de novas cepas de *Salmonella* apresentando múltipla resistência aos antimicrobianos. Com o intuito de conhecer o comportamento destes microrganismos frente aos antimicrobianos analisou-se 141 cepas de *Salmonella* sp. isoladas de um rio localizado em Campina Grande (PB) contaminado com esgotos. As análises foram realizadas no Laboratório da Universidade Federal da Paraíba (C. Grande/PB), atual Universidade Federal de C. Grande. A resistência das cepas foi determinada através de antibiograma, por difusão dos discos. Observou-se que o maior número de cepas, 24 (17%) apresentou resistência para Tetraciclina seguido por Sulfazotrim e Cefalotina, com 04 cepas cada um (2,8%). Constatou-se que 04 (2,8%) das cepas apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano. Nenhuma resistência foi verificada frente a Gentamicina e Imipenem.

PALAVRAS-CHAVE – *Salmonella* sp., enteropatógenos, ambiente aquático.

SUMMARY – *Salmonella* is one of the enteropathogenic that cause serious damages to the public health. In the countries in development, it is common the presence of *Salmonella* species coming from human material while species originating from of animals prevail at the developed countries, due to the industrialization in wide scale of nutritious products and rations for animals that favor your dissemination. These *Salmonellas* reach the reservoirs of waters, turning them inappropriate to the human consumption. Besides the increase of contamination of the resources hydric, other preoccupating aspect concerns the appearance of new stumps of *Salmonella* presenting multiple resistance to the antimicrobial. With the intention of knowing the behavior of these microorganisms front to the antimicrobial was analyzed 141 stumps of *Salmonella* sp. isolated of a located river in Campina Grande (PB) polluted with sewers. The analysis were accomplished of the Laboratory of the Federal University of Paraíba (C. Grande/PB), current Federal University of Campina Grande. The resistance of the stumps was determined through test antimicrobial, for diffusion of the disks. It was observed that the largest number of stumps, 24 (17%), to presented resistance Tetraciclina followed by Sulfazotrim and Cefalotina, with 4 stumps each one (2.8%). It was verified that 4 (2.8%) of the stumps presented resistance more than one antimicrobial. No resistance were verified against the Gentamicina and Imipenem.

KEYWORDS – *Salmonella* sp., enteropathogenic, aquatic environment.

INTRODUÇÃO

Entre os microrganismos enteropatogênicos mais frequentes, responsáveis por quadros diarreicos estão as bactérias de gênero *Salmonella*. Sua presença em águas residuárias de origem doméstica é contínua nos países em desenvolvimento, por serem responsáveis por grande número de doenças gastrointestinais veiculadas por água e alimentos. Sua pesquisa tem se tornado indispensável para melhoria da Saúde Pública, portanto, nos últimos anos, inúmeros estudos bacteriológicos foram realizados visando seu isolamento e identificação (Barioni, 2002).

A identificação das *Salmonellas* em subgêneros tem pouca importância para a clínica médica. Entretanto, sua divisão, segundo o esquema de Kauffmann e White, baseado em sorotipos se constitui em importante ferramenta epidemiológica (Toledo, 1998). Seu emprego possibilita a diferenciação dos sorotipos predomi-

nantes em humanos, animais e ambiente, facilitando a identificação do modo de transmissão das *Salmonellas*, permitindo a adoção de medidas específicas para sua prevenção e controle.

A classificação do gênero é bastante complexa e tem variado nos últimos anos, sendo motivo de discussões entre os bacteriologistas (Jawetz, Melnick e Adalberg, 1991). Segundo Murray *et al.* (1992), a classificação inicial limitou a divisão de *Salmonella* numa única espécie: *Salmonella entérica*, que se subdividia nos sorogrupos 1, 2, 3a, 3b, 4 e 5.

Segundo Popoff e Le Minor (1997), a taxonomia atual divide esse microrganismo em duas espécies: *Salmonella entérica* (6 subespécies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) e *Salmonella bongori*.

Estudos posteriores feitos por Kauffmann dividiu-as em subgêneros (I, II, III e IV) e Edwards e Ewing dividiram em três espécies: *S. choleraesuis*, *S. typhi* e *S. enteritidis* (Toledo, 1998).

Recebido em: 19/02/2003

Aprovado em: 8/4/2003

* Laboratório da Universidade Federal de Campina Grande - PB
¹DFB/CCBS/UEPB; ²AESA/CCT/UFCG Campus I

Nos países em desenvolvimento (inclusive o Brasil), é comum a *Salmonella* proveniente de diferentes materiais humanos (fezes, urina, sangue) enquanto que a presença de *Salmonella* oriunda de animais predominam nos países desenvolvidos, devido à industrialização em larga escala de produtos alimentícios e rações para animais que estando contaminadas transformam-se em veículos de infecções para grande número de indivíduos, favorecendo sua disseminação (Miranda *et al.*, 1978).

Várias são as causas que contribuem para o aumento de estirpes de bactérias apresentando resistência ou multirresistência aos antimicrobianos. Seu uso indevido e indiscriminado em medicina, agricultura e veterinária exerce uma forte pressão seletiva favorecendo a sobrevivência e sendo causa constante para o aparecimento de cepas multirresistentes (Ceballos, 1984). Outro fator importante diz respeito ao uso de antimicrobianos como suplemento em rações animais para promoção de crescimento e como profiláticos. Em 1986, nos EUA, foram produzidas cerca de 44 mil toneladas de antibióticos e, destes, quase metade foi utilizada em animais (D'aoust, 1997).

Novas substâncias estão sendo avaliadas em termos de atividade antibacteriana da pele de alguns sapos, tecidos da mandíbula do peixe-cão e de porcos. Estes novos componentes podem constituir novas alternativas para os microrganismos multirresistentes (Tortora *et al.*, 2000).

Em virtude da grande preocupação com os agravos à Saúde da população e à resistência que as *Salmonellas* vêm desenvolvendo ao longo dos anos, este trabalho objetivou detectar os sorotipos/sorogrupos de *Salmonellas* e o perfil de suscetibilidade das cepas frente a vários antimicrobianos comumente empregados em medicina humana e veterinária.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água foram coletadas entre Dezembro/1999 e Dezembro/2000, na Paraíba, em um rio fortemente impactado por esgotos domésticos e industriais. Esse rio tem sua nascente entre os Municípios de Pocinhos e Puxinanã e atravessa a cidade de Campina Grande indo até Barra de Santana.

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba, atualmente Universidade Federal de Campina Grande (PB). Para o isolamento das cepas foram coletados 5 litros de água e em seguida filtrados em membrana millipore (0,45mm de porosidade e 142mm de diâmetro). Para concentração da amostra, a membrana filtrante foi colocada em meio de pré-enriquecimento, Água Peptonada Tamponada (APT), e incubada a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, uma alíquota de 1mL foi transferida para os meios de enriquecimento seletivo: Caldo Rappaport Vassiliadis incubado a 37°C por 24 e 48 horas e Caldo Selenito-novobiocina incubado a 42°C por 24, 48 e 120 horas, respectivamente. Para o isolamento utilizou-se os meios de agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e agar Verde-Brihante (VB). Após 24 horas de in-

cubação a 37° C, as colônias típicas foram submetidas a testes bioquímicos: TSI, SIM, Uréia, Citrato de Simons, Vermelho de Metila (VM), Voges Proskauer (VP), Lisina e Fenilalanina. Após confirmação bioquímica como *Salmonella* sp. as cepas foram submetidas a testes sorológicos com anti-soros polivalentes (Probac), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Uma vez confirmada sorologicamente, as 141 cepas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (antibiograma), seguindo-se as recomendações de Kirby-Bauer (1966). Os antimicrobianos utilizados foram: Amicacina (AMI), Aztreonam (AZT), Cefalotina (CF), Cefoxitina (CFO), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Carbenicilina (CAR), Gentamicina (GN), Imipenem (IPM), Sulfazotrim (SFT), Tobramicina (TOB) e Tetraciclina (TET).

Dentre as cepas identificadas do gênero, 43 foram classificadas em sorogrupos no próprio laboratório onde se realizaram as análises. Para essa classificação utilizaram-se soros somáticos e flagelares (Probac do Brasil). Os soros somáticos visam identificar os grupos sorológicos A, B, C, D e E, que representam, aproximadamente, 98% das *Salmonellas* isoladas no homem e o antígeno Vi que ocorre em *S. typhi* e *S. paratyphi* C. Para esta determinação foi preparada uma suspensão bacteriana com cultivo de 24 horas e adicionado uma gota de cada anti-soro. Após dois minutos de homogeneização observou-se a presença ou não de aglutinação. Considerou-se como pertencente de um determinado sorogrupos os testes que aglutinaram em no máximo dois minutos. As amostras de comportamento negativo foram incubadas em banho-maria durante 10 minutos e estes testes foram repetidos.

Para a classificação dos sorotipos, escolheu-se aleatoriamente 10 cepas, as quais foram enviadas ao Departamento de Bacteriologia/ Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro.

RESULTADOS

Apesar do pequeno número de cepas sorotipadas, constatou-se a predominância do sorotipo *S. hadar* (50%), seguido de *S. anatum* (20%) e em menor proporção os sorotipos *S. newport*, *S. florian* e *S. saintpane* (10% cada uma). Fig. 1.

Com relação aos sorogrupos identificados de acordo com a classificação de Edwards e Ewing (1972), constatou-se que o sorogrupos E foi o mais freqüente (19 cepas-44%), sendo seguido pelo sorogrupos C (14 cepas-32%) e em terceiro lugar o sorogrupos B (7 cepas-16,2%) e em menor proporção o sorogrupos D com apenas 03 cepas (6,9%). Fig. 2.

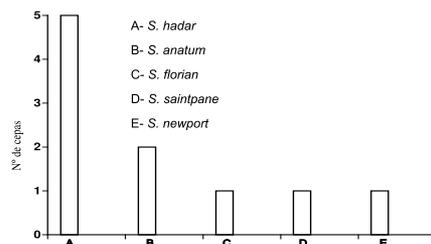


FIG. 1 - Sorotipos de *Salmonellas* isoladas do Rio Bodocongô (PB), no período do Dezembro/1999 a Dezembro/2000.

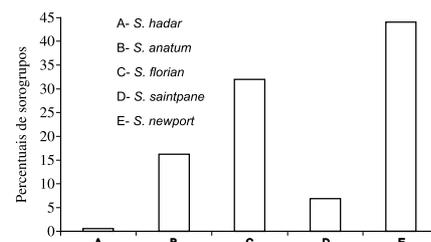


FIG. 2 - Sorogrupos de *Salmonellas* isoladas do Rio Bodocongô (PB) no período do Dezembro/1999 a Dezembro/2000.

TABELA I
Perfil de sensibilidade/resistência das cepas de *Salmonella* sp. frente aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Comportamento (Número e % de cepas analisadas)		
	Resistentes (R)	Sensíveis (S)	Intermediários (I)
AMI	1 (0,7%)	136 (96,4%)	4 (2,8%)
AZT	1 (0,7%)	136 (96,4%)	4 (2,8%)
CF	4 (2,8%)	127 (90%)	10 (7,0%)
CFO	1 (0,7%)	134 (95%)	6 (4,2%)
CIP	1 (0,7%)	140 (99,2%)	-
CLO	1 (0,7%)	140 (99,2%)	-
CAR	1 (0,7%)	124 (87,9%)	16 (11,3%)
GN	-	141 (100%)	-
IPM	-	138 (97,8%)	3 (2,1%)
SFT	4 (2,8%)	132 (93,6%)	5 (3,5%)
TOB	1 (0,7%)	138 (97,8%)	2 (1,4%)
TET	24 (17%)	90 (63,8%)	27 (19%)

Legenda: Amicacina (AMI), Aztreonam (AZT), Cefalotina (CF), Cefoxitina (CFO), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Carbenicilina (CAR), Gentamicina (GN), Imipenem (IPM), Sulfazotrim (SFT), Tobramicina (TOB) e Tetraciclina (TET).

Com relação ao perfil antimicrobiano observou-se que dentre as 141 cepas testadas, 35 (24,8%) foram resistentes a um ou mais antimicrobianos. Constatou-se que o maior número de cepas (24- 17%) foram resistentes a TET e outras cepas apresentaram-se com 24 (17%), além de 27 (19%) que apresentaram comportamento intermediário (pouco sensível) a este antimicrobiano. Observa-se também cepas resistentes a SFT e CF: com 4 cepas (2,8%) cada. Tab. I.

Constatou-se que 4 (2,8%) cepas apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano. Sendo duas resistentes concomitantemente a CF e TET, uma a CF e CAR e outra a CIP e SFT, respectivamente.

Nenhuma resistência foi verificada frente ao IPM. Apenas, observou-se comportamento intermediário de 3 (2,1%) cepas. Somente 1 (0,7%) cepa apresentou resistência a TOB, enquanto 2 (1,4%) cepas apresentaram comportamento intermediário. Tab. I.

Comportamento diferenciado ocorreu com a GN, onde não se observou nenhuma cepa resistente ou de comportamento intermediário. Sendo, portanto, o antimicrobiano mais eficaz para o controle das *Salmonellas* isoladas do ambiente aquático. Cortinez *et al* (1995), analisando a resistência de *Salmonella* isoladas de águas de superfície, em São Luis, Argentina, também se observou que todas as cepas foram sensíveis a Gentamicina.

Em relação ao comportamento dos sorogrupos e sorotipos de *Salmonella* frente aos antimicrobianos, observou-se que o sorogrupo C foi o que apresentou maior número de cepas resistentes (três foram resistentes a TET e uma a TOB), seguido pelo sorogrupo E com duas cepas resistentes a TET e uma a CFO. Com relação aos sorotipos verificou-se que *S. florian*, *S. newport* e *S. saintpane* não apresentaram resistência a nenhum dos antimicrobianos testados. Por outro lado constatou-se grande resistência das cepas de *S. hadar*, onde todas (100%) foram resistentes a TET e uma (10%) a CF (Tab. II).

DISCUSSÃO

Tetraciclina é um antimicrobiano bastante utilizado e, em consequência de seu uso indiscriminado na clínica humana e veterinária, vem apresentando maior número de microrganismos resistentes, a exemplo das cepas de *Salmonella* spp.. Segundo Goyal *et al.*, (1979)

TABELA II
Número de sorogrupos e sorotipos de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos

Sorogrupos/Sorotipos	Antimicrobianos (Número e % de cepas testadas)											
	AMI	AZT	CF	CFO	CIP	CLO	CAR	GN	IPM	SFT	TOB	TET
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(14,2%)
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(7%)	3(21,4%)
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(33,3%)
E	-	-	-	1(5,2%)	-	-	-	-	-	-	-	2(10,5%)
<i>S. anatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(10%)
<i>S. florian</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. hadar</i>	-	-	1(20%)	-	-	-	-	-	-	-	-	5(100%)
<i>S. newport</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saintpane</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

avaliando a resistência de *Salmonella* spp. isoladas em águas de matadouros, verificaram que as cepas também apresentaram maior resistência a TET. Sant'Ana, Souza e Ferreira (1989), investigando a resistência de *S. Typhimurium* isoladas de águas contaminadas por esgotos em Belo-Horizonte (BR), observaram que as cepas apresentaram resistência mais elevada frente à TET. Estes relatos estão em concordância com os encontrados neste estudo.

De acordo com Pessoa *et al.* (1978), a maioria das cepas de *Salmonella* sp. multirresistentes aos antimicrobianos, são de origem nosocomial, entretanto, as isoladas nesta pesquisa são de origens ambiental (ambiente aquático), não se podendo excluir a possibilidade de serem provenientes de humanos e de animais localizados numa ampla região geográfica ao longo do Rio.

O ambiente hospitalar constitui-se em um dos fatores importantes na cadeia de transmissão bacteriana codificando multirresistência a vários antimicrobianos. A incidência de bactérias resistentes aos antimicrobianos vem assumindo proporções preocupantes, também, em virtude de freqüentes insucessos terapêuticos. Os antibióticos são os grandes triunfos da ciência médica, embora apresentem seus problemas e desvantagens. O grande problema é seu uso indevido que aumenta na mesma proporção que o surgimento de linhagens de patógenos resistentes (Tortora, *et al.*, 2000).

Nesta pesquisa, 35 (24,8%) cepas apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, entretanto, a grande maioria das cepas foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Campos e Hofer (1989), comparando a resistência de *Salmonella* spp. isoladas de amostras ambientais e humanas, verificaram que as primeiras foram menos resistentes aos antimicrobianos. Nesta pesquisa observou-se, também, baixa resistência das cepas ambientais, visto que os microrganismos isolados diretamente de humanos (fezes, sangue, urina) estão mais freqüentemente em contato com substâncias antimicrobianas do que as cepas isoladas de amostras de água, embora estas possam ter sido oriundas de organismos humanos e de animais, já que o rio analisado recebe águas fortemente impactadas por esgotos domésticos e dejetos animais das regiões circunvizinhas.

É interessante ressaltar a predominância do sorotipo *S. hadar* nestas águas. Segundo Franco e Landgraf

(1996), este é um dos sorotipos que raramente tem sido isolados nos últimos anos. Entretanto, representou 50% dos sorotipos identificados nesta amostragem.

Segundo Baudart *et al.* (2000), *S. hadar* é um sorotipo predominante em animais. Sendo, neste estudo, o sorotipo mais encontrado. É interessante citar que foram isoladas principalmente em certos trechos do rio que recebiam contaminações por fezes dos animais, visto que estes trechos encontram-se nas proximidades de áreas de intensa criação de animais que depositam suas fezes no solo e conseqüentemente são levadas até as águas deste rio. Nos chamou atenção, também, a resistência deste sorotipo frente a Tetraciclina, já que é um antimicrobiano de uso comum em rações animais para obtenção de efeitos profiláticos e para promoção do crescimento.

CONCLUSÕES

- Observou-se grande diversidade de sorotipos de *Salmonella*, com predomínio de *S. hadar* e do sorogrupo E, comumente encontrados em animais e em humanos respectivamente;
- O trecho do rio que apresentou maior diversidade de sorotipos e sorogrupos está situado numa área fortemente impactada por despejos humanos e aportes animais
- A maioria das cepas de *Salmonella* isoladas do rio Bodocongó (PB) foi sensível aos antimicrobianos.
- Tetraciclina foi o antimicrobiano que apresentou maior número de cepas resistentes
- Seria necessário a sorotipagem de mais algumas cepas de *Salmonellas* a fim de se conhecer melhor o perfil de resistência frente aos antimicrobianos para cada sorotipo e/ou sorogrupo de *Salmonella*.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela Bolsa de mestrado concedida
Ao Projeto Nordeste, pelo financiamento desta pesquisa

Ao Dr. Ernesto Hofer e sua equipe (Fiocruz- RJ), pela sorotipagem de algumas cepas de *Salmonella*.

REFERÊNCIAS

1. Baudart, J.; Lemarchand, K.; Brisabois, A.; Lebaron, P. Diversity of *Salmonella* Strains Isolated from the Aquatic Environment as Determined by Serotyping and Amplification of the Ribosomal DNA Spacer Regions. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1544-1552, 2000.
2. Bauer, A. W.; Kirby, E.M. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Path.*: 45p, 1966.
3. Campos, L.C.; Hofer, E. Antimicrobial resistance among *Salmonella* serovars isolated from different sources in Brazil during 1978-1983. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.55, p.349-359, 1989.
4. Ceballos, B.S.O. Salmonelose endêmica da criança em São Paulo: sorotipos, clones e origem nosocomial. 1984. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo. 73 p.
5. Cortinez, I.J.M.; Velasquez, L.C.; Escudero, M.E.; Caffer, M.I.; Cobo, M.F.; Guzmán, A.M.S. *Salmonella* serotypes from surface waters in San Luis, Argentina. *Revista Microbiológica*, São Paulo, v.26, n.3, p. 180-185, 1995.
6. D'aoust, J.-Y. *Salmonella* Species In: *Food Microbiology*. *Fundamentals and Frontiers*, p.129-153, 1997.
7. Edwards, P.R.; Ewing, W.H. Identification of Enterobacteriaceae, 3rd, ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972.
8. Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 55-60.
9. Goyal, S.M.; Hoadley, A.W. *Salmonellae* and their associated R-plasmids in poultry processing wastes. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.10, n.2, p. 50-58, 1979.
10. Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adalberg E. A. *Microbiologia Médica*, 18^a edição, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1991.
11. Miranda, J.B.N.; Pessoa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T. Ocorrência de *Salmonella* em farinhas utilizadas como matéria-prima na composição de rações de animais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v.38, n.2, p. 157-160, 1978.
12. Murray, P.R.; Drew, W.L.; Kobayashi, G.S.; Thompson, J.H. *Microbiologia Médica*, Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 1992. 513p.
13. Pessoa, G.V.A.; Irino, K.; Melles, C.E.A.; Calzada, C.T.; Raskin, M.; Ka No, E. Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-1976. II - O surto epidêmico de *Salmonella typhimurium* em São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v.38, n.2, p. 107-127, 1978.
14. Popoff, M.Y.; Le Minor, L. Antigenic formulas of *Salmonella* serovars. In: WHO Collaboration Center for Reference and Research on *Salmonella*, Paris, France: Institut Pasteur, 7th Revision, 1997.
15. Sant'ana, Y.X.; Souza, E.C.; Ferreira, M.D. Drug resistance and colicinogeny of *Salmonella typhimurium* strains isolated from sewage-contaminated surface water and humans in Belo Horizont, Brazil. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.29, n.1, p. 41-49, 1989.
16. Toledo, M.R.F. *Salmonella-Shigella*. In: *Microbiologia: Trubulsi*, 20^a edição, São Paulo: Livraria Atheneu, 1998. p.27-160.
17. Tortora, G.J.; Funke, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 6^a ed, Porto Alegre: Artes Médica, 2000, p.531-552

Endereço para correspondência

Maricelma Ribeiro Moraes

Rua: Manoel Alves de Oliveira, Nº 414

Bairro: Catolé - Campina Grande - PB - 58.105-600

Telefone: (0xx83) 331-2494 - (Celular: 9362.5390)

E-mail: maricelmar@bol.com.br

VI CONGRESSO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO CENTRO-OESTE IV CONGRESSO DE CITOLOGIA CLÍNICA DO CENTRO-OESTE

21 a 23 de novembro de 2004

Centro de Eventos do Pantanal - Cuiabá - MT

Visite o stand da SBAC no XXXI CBAC e procure outras informações sobre este evento

III CONGRESSO REGIONAL DE ANÁLISES CLÍNICAS DO NORDESTE

12 a 15 de novembro de 2004

Centro de Convenções de Sergipe - Aracaju - SE

Visite o stand da SBAC no XXXI CBAC e procure outras informações sobre este evento

Efeitos da terapia de reposição hormonal sobre os níveis dos lípides e da atividade da butirilcolinesterase no soro*

Effects of hormonal replacement therapy on the lipid levels and on butyrylcholinesterase activity in serum

Maria Teresa G. Lang¹, Vânia M. Alcântara^{2*}, Geraldo Picheth², Marileia Scartezini² & Eleidi A. Chautard-Freire-Maia³

RESUMO – A butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) é uma enzima produzida pelo fígado e com função desconhecida. A atividade da BChE (ABChE) tem sido negativamente correlacionada com os níveis de estrogênios e positivamente com os de lípides séricos. Mulheres climatéricas frequentemente apresentam níveis aumentados dos lípides séricos (colesterol total e LDL-colesterol), levando a um maior risco de doença arterial coronariana (DAC). A terapia de reposição hormonal (TRH) causa mudanças no perfil lipídico, em uma direção potencialmente anti-aterogênica. O objetivo deste estudo foi verificar as correlações da ABChE, em mulheres climatéricas, antes e após TRH. Os níveis de colesterol total (CT), LDL-colesterol (LDL-C), triglicérides (TG), estradiol (E_2) e do hormônio folículo estimulante (FSH), foram analisados. Amostras de soros (jejum de 12 horas) de trinta e duas mulheres climatéricas ($52,7 \pm 6,3$ anos), coletadas antes e após TRH foram examinadas por vários protocolos, durante aproximadamente 3 meses. A ABChE mostrou uma redução média de aproximadamente 6,5% após a TRH ($p < 0,001$). Os níveis de CT e LDL-C se apresentaram positivamente ($p < 0,05$) correlacionados com a ABChE, antes e após a TRH. Os níveis de TG e E_2 mostraram correlações positiva e negativa, respectivamente, com a ABChE ($p < 0,05$), somente antes da TRH. O FSH não apresentou correlação com a ABChE. O nível de LDL-C, um marcador de DAC, mostrou significativa redução ($p = 0,01$) após TRH, em concordância com a ABChE. Esses dados enfatizam a relação entre a ABChE e os lípides séricos, e apoiam a hipótese de uma potencial função da BChE no metabolismo dos lípides, como sugerem outros autores.

PALAVRAS-CHAVE – Colinesterase do soro, climatério, estrógenos, colesterol total, triglicérides.

SUMMARY – Butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) is an enzyme produced by the liver with unknown physiological function. BChE activity (BChEA) has been negatively correlated with the estrogen levels and positively correlated with serum lipids. Climacteric women frequently show increase in the serum lipids (total cholesterol and LDL-cholesterol), leading to a higher risk of coronary artery disease (CAD). The hormonal replacement therapy (HRT) changes the lipid profile in a potentially anti-atherogenic direction. The aim of this study was to verify the correlations of serum BChEA in climacteric women before and after HRT. The serum levels of total cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG), estradiol (E_2), and follicle-stimulating hormone (FSH) were analysed. Fasting serum (12 hours) of 32 climacteric women (52.7 ± 6.3 years) were collected before and after HRT and examined with several protocols and during approximately 3 months. The BChEA showed an average reduction about 6.5% after HRT ($p < 0.001$). TC and LDL-C levels were positively ($p < 0.05$) correlated with BChEA before and after HRT. TG and E_2 levels showed positive and negative correlation ($p < 0.05$) with BChEA only before HRT, respectively. FSH was not correlated with BChEA. The LDL-C level, a marker for CAD, was significantly ($p = 0.01$) reduced after HRT in agreement with BChEA. These data emphasize the relation between serum BChEA and serum lipids and support the hypothesis of a potential role for BChE in lipid metabolism as suggested by other authors.

KEYWORDS – Serum cholinesterase, climacteric, estrogens, total cholesterol, triglycerides.

INTRODUÇÃO

O climatério refere-se ao período de tempo durante o qual se passa da vida reprodutiva para a vida não reprodutiva²⁶. A menopausa (parada da menstruação) é um marco dentro do climatério sendo de interesse tanto científico como de saúde pública, pois cerca de 95% das mulheres chegam à menopausa nos países desenvolvidos¹⁴. No climatério a mulher sofre modificações regressivas, incluindo fundamentalmente a fal-

ta de ovulação e a diminuição na síntese de hormônios esteróides pelo ovário⁵. A principal consequência desta fase é o hipoestrogenismo que vai acentuando-se e favorecendo uma série de complicações clínicas.

A terapia de reposição hormonal (TRH) é indicada para reverter algumas condições clínicas como alterações mentais (insônia, depressão), sexuais (diminuição da libido), do tegumento cutâneo (envelhecimento da pele e mucosas) e dos tecidos conjuntivos (diminuição da elasticidade dos ligamentos), fogachos, cefaléia.

Recebido em 05/8/2003
Aprovado em 10/11/2003

Trabalho realizado no Curso de Pós Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas (Bioquímica Clínica) da Universidade Federal do Paraná - UFPR

¹ Farmacêutica-Bioquímica, Sócia-Proprietária do Laboratório BioVita, Chapecó, SC

² Professores de Bioquímica Clínica, Departamento de Patologia Médica da UFPR; ^{2*} Orientadora; ³ Professora de Genética, Departamento de Genética da UFPR

Também para prevenir a atrofia urogenital, a doença arterial coronariana e a osteoporose²⁵.

Os estrogênios são utilizados nas doses capazes de manter os níveis plasmáticos próximos aos observados na fase folicular do ciclo menstrual²⁶. Os diferentes efeitos dos progestogênios dependem de sua natureza, da dose de administração e do tempo de uso. A adição desses hormônios na TRH tem indicação na redução da incidência de hiperplasia e do carcinoma de endométrio. Os progestogênios devem ser utilizados nas doses mínimas necessárias para a efetiva proteção endometrial.

A variedade de esquemas terapêuticos com associação ou não de progestogênios aos estrogênios, produz respostas endometriais variáveis que podem diferir de paciente para paciente. Os tratamentos normalmente empregam os esquemas que se seguem¹⁴:

- estrogênios isoladamente;
- estrogênios associados aos progestogênios em esquemas cíclicos seqüenciais;
- estrogênios e progestogênios administrados continuamente, sem interrupção;
- outros hormônios (fitoestrogênios - isoflavonas; esteróide sintético com atividade estrogênica, progestogênica e androgênica - tibolona; andrógenos).

Na Tab.I encontram-se os principais hormônios utilizados na TRH.

Vários autores relacionaram a atividade da butirilcolinesterase (ABChE) com o metabolismo dos lípidos e lipoproteínas^{2,19,24}. A ABChE apresentou-se, também, positivamente correlacionada com as concentrações de triglicérides^{2,8,9}, de colesterol^{2,3,24}, das lipoproteínas plasmáticas^{2,3,9,24} e da apolipoproteína B^{2,3,8}.

Os estrogênios têm sido relacionados com uma diminuição na ABChE. ABChE média maior no sexo masculino do que no feminino foi descrita por vários autores^{1,6,28}.

Mulheres em idade fértil possuem níveis da atividade da enzima cerca de 64 a 74% dos níveis encontrados em homens com a mesma idade e, após a menopausa, os níveis de atividade são semelhantes em ambos os sexos^{32,34}.

Durante a gravidez, quando ocorre a produção aumentada de estrógenos pela placenta, foram descritos casos de diminuição na ABChE^{30,33}. A redução na ABChE é mantida até o parto e seus níveis normais são alcançados após 6 semanas^{12,30,33}.

Cohen⁷ mostrou mudanças significativas na bioquímica da mulher grávida, algumas das quais resultando em alterações nos níveis de proteínas circulantes no sangue. Assim, numerosas proteínas ligantes de hormônios e fatores de coagulação aumentam em concentração, enquanto diminui a da albumina. A redução na ABChE, portanto, acompanha a queda na concentração sanguínea da albumina.

Os estrógenos sintéticos, usados para tratamento de carcinoma da próstata⁴, assim como os das pílulas anti-concepcionais, usados juntamente com os progestogênios³⁴, também causam redução na ABChE.

No presente trabalho foi analisada a correlação da ABChE em mulheres climatéricas, antes e após TRH, bem como com marcadores lipídicos, considerados como fatores de risco de doença arterial coronária (DAC).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Soros de 32 mulheres euro-brasileiras climatéricas,

TABELA I

Principais hormônios usados na terapia de reposição hormonal*

Estrógenos	Progestógenos
Estradiol (E ₂)	Acetato de medroxiprogesterona (MPA)
Conjugado Equino de Estrógenos (CEE)	Progesterona
	Didrogesterona (DD)
	Norgestrel (NOR)
	Acetato de norestisterona (NETA)
	Levonorgestrel (LNG)
	Acetato de ciproterona (CPA)

*Revisão em Van Baal *et al.*³⁶

com idade média de 52,7 ± 6,3 anos (44 a 72 anos), foram coletados após 12 horas de jejum, em tubos Vacutainer, antes e após (cerca de 3 meses) à TRH e as quantificações realizadas no dia da coleta.

Os consentimentos para as coletas foram assinados pelas pacientes e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR (Protocolo CEP-HC, Número 056ext010/2002-06).

As pacientes participantes do estudo não apresentaram alterações hepáticas, tireoideanas, renais ou pancreáticas, quando foram avaliadas pelos ensaios laboratoriais: fosfatase alcalina, gama-GT, AST, ALT, T₄L, T₃L, TSH, uréia, creatinina e glicemia. Alterações nestes marcadores poderiam suscitar alterações na ABChE³⁹. Os valores de T₃L (T₃ livre) e TSH entraram em nossa análise, uma vez que demonstraram valores diferentes antes e após TRH.

Métodos

As dosagens de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e LDL-C (Colesterol da lipoproteína de baixa densidade) foram realizadas com metodologias enzimáticas utilizando-se kits da Biosystem. As leituras foram realizadas no equipamento semi-automático BTS-310 (BioSystem), com reagentes, calibradores e procedimentos fornecidos pela Biosystem. Os hormônios: triiodotironina livre (T₃L), hormônio tireoestimulante (TSH), hormônio folículo estimulante (FSH) e estradiol (E₂), foram quantificados por Elisaimunoensaio no equipamento Mini-Vidas[®] utilizando-se todos os procedimentos e reagentes recomendados pelo fabricante (Biolab-Merieux).

O hematócrito ou volume globular (VG) foi avaliado no sangue total, colhido com EDTA. Essa avaliação foi feita no equipamento Celm CC-550, confirmando-se o valor do VG através de microcentrifuga.

A ABChE foi medida pelo método de Dietz *et al.*¹⁰, modificado¹², no equipamento semi-automatizado SIEL Espectromatic 710. Os valores de referência obtidos em nosso laboratório com esta metodologia para mulheres não-climatéricas (n=50) com idade variando de 20 a 45 anos, foi 5,12 ± 1,09 kU/L, variando de 2,48 a 7,23 kU/L.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica para Windows, versão 5.1, Statsoft, Inc. 1996. Foram utilizados: teste t para amostras independentes, teste t para amostras dependentes e análises de correlações simples.

Terapia de reposição hormonal

Os produtos comerciais e respectivas composições, utilizados como Terapia de Reposição Hormonal (TRH) no presente trabalho, encontram-se na Tab. II.

TABELA II

Terapia de reposição hormonal utilizada no presente estudo

Produtos	Composições
Sandrena gel	Estradiol
Cliane, Trisequens, Estalis SQ, Estragrest TTS e System conti	Estradiol e acetato de noretisterona
Lindisc Duo	Estradiol e levonorgestrel
Repogen	Estrógenos conjugados
Premelle	Estrógenos conjugados e acetato de medroxiprogesterona
Menotensil	Estrógenos conjugados e clordiazepóxido
Libian	Tibolona
Isoflavona	Fitoestrogênios

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A terapia de reposição hormonal (TRH) tem um número crescente de usuárias nos últimos anos. Em estudos prévios, realizados pelo nosso grupo, não foram detectadas diferenças nos efeitos das múltiplas combinações de estrogênios/progestogênios (dados não mostrados), sobre a ABChE, portanto, as análises foram realizadas em todas as mulheres, independente da TRH utilizada. Whittaker *et al.*⁴⁰, analisando o efeito de diferentes anticoncepcionais, também não observaram diferenças na ABChE.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com aqueles que relataram maiores valores médios na ABChE, após a menopausa^{32,34}. Antes da TRH o valor médio da ABChE (Tab. III; 5,63 kU/L) foi cerca de 9% maior ($p < 0,05$) quando comparado ao valor de referência da população não-climatérica (5,12 kU/L). Após a TRH, o valor médio da ABChE (Tab. III; 5,29 kU/L) não diferiu significativamente ($p > 0,20$) do encontrado na população não-climatérica de referência. Pode-se verificar, ainda (Tab. III), que após a TRH, o valor médio reduziu-se em cerca de 6% quando as quantificações foram realizadas cerca de 3 meses após o início da terapia, sendo a diferença observada entre as duas médias estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Fuller e Berger¹⁶ mostraram atividades em torno de 12% menores, em mulheres grávidas ou tomando contra-

ceptivos orais, quando comparadas com aquelas não grávidas e sem uso de anticoncepcionais, respectivamente. Whittaker *et al.*⁴⁰ relataram rápidas reduções na ABChE, sendo em um caso descrito a 14 dias após o início do uso do contraceptivo oral.

Foi sugerido²⁷ que as mudanças, observadas durante a gravidez e na terapia com contraceptivo, eram primariamente devidas a hemodiluição. Esta explicação, entretanto, foi contestada por Wetstone *et al.*³⁸ que relataram que apesar da expansão do volume plasmático, o hematócrito (VG) não muda significativamente. Esta observação está de acordo com os dados contidos na Tab. III, onde não se verifica diferença significativa ($p > 0,80$) nos níveis médios do VG antes e após a TRH. Portanto, as variações na ABChE não podem ser explicadas simplesmente pelo efeito da diluição/contração do soro, associadas ao processo do climatério e alterações hormonais. Três principais fatores têm sido responsabilizados por essa redução: inibição da enzima no plasma, redução da síntese hepática^{15,17} e diminuição na liberação da enzima para a circulação^{29,31}.

Os níveis médios de LDL-C, um marcador para DAC, reduziram-se significativamente (Tab. III; $p = 0,01$) após a TRH. Este achado apoia o possível efeito anti-aterogênico associado a TRH e verificado em vários estudos¹¹.

Na Tab. III, também se nota que as diferenças das médias do CT e do TG não foram significativas, antes e após TRH, possivelmente pelo pequeno tempo de tratamento (3 meses). Este fato pode ser confirmado pelos valores de E_2 , que apesar de terem aumentado durante a TRH, também não apresentaram média significativamente diferente daquela obtida antes da TRH. A TRH diminui os níveis de CT, porém usualmente aumenta os níveis de TG^{11,14}. Alguns estudos sugerem que os estrogênios diminuem o tamanho das partículas de LDL em associação com um significativo aumento nos TG plasmáticos^{18,37}. Vários autores têm relatado que a hipertrigliceridemia aumenta a troca de éster de colesterol por TG nas partículas de LDL por meio de reações de transferência de lípidos entre as frações VLDL, LDL e HDL^{21,37}.

Após a TRH (Tab. III) observou-se uma diminuição significativa nos níveis de T_3L , o que pode refletir um aumento na síntese das proteínas transportadoras de T_3 (TBG) pelo aumento dos estrogênios. Este fato parece também se refletir nos níveis do TSH. O T_3L faz "feedback" negativo sobre o TSH e uma vez que seus níveis estão diminuídos após a TRH, os de TSH estão levemente aumentados, em relação à época antes do tratamento.

O aumento nos níveis de E_2 , observado após a TRH, resultou numa pequena diminuição nos níveis do FSH, possivelmente devido à diminuição do "feed back" negativo de E_2 sobre o FSH.

Nas mulheres climatéricas, antes da TRH (Tab. IV), foram observadas correlações positivas e significativas da ABChE com CT, LDL-C e TG. Achados semelhantes têm sido relatados por vários autores: com CT^{3,24},

TABELA III

Médias (M) \pm desvio-padrões (DP), amplitudes de variação (AV) e valores de t e p (n=32), das variáveis analisadas antes e após terapia de reposição hormonal (TRH)

	Antes da TRH	Após a TRH	t (p)
	M \pm DP (AV)	M \pm DP (AV)	
ABChE (kU/L)	5,63 \pm 0,97 (2,47–7,41)	5,29 \pm 1,10 (3,56–7,55)	3,79 (<0,001)
TC (mg/dL)	212,66 \pm 48,80 (144,00–341,00)	198,00 \pm 36,98 (115,00–282,00)	1,77 (>0,05)
LDL-C (mg/dL)	135,41 \pm 44,45 (61,00–258,00)	121,45 \pm 35,30 (70,00–190,00)	2,73 (=0,01)
TG (mg/dL)	116,19 \pm 68,52 (38,00–286,00)	130,72 \pm 70,12 (64,00–371,00)	1,00 (>0,30)
TSH (mU/mL)	2,32 \pm 1,91 (0,05–7,93)	3,14 \pm 2,51 (0,34–11,70)	1,69 (>0,10)
T_3L (mg/dL)	4,75 \pm 0,82 (3,57–7,60)	4,27 \pm 0,57 (2,62–5,28)	2,83 (<0,01)
E_2 (pg/mL)	39,40 \pm 57,32 (9,00–260,00)	73,51 \pm 110,18 (8,00–395,12)	1,85 (>0,05)
FSH (mU/mL)	60,20 \pm 33,00 (3,41–112,00)	50,52 \pm 28,95 (0,94–112,00)	1,93 (>0,05)
VG (%)	42,81 \pm 3,08 (39,00–51,00)	42,74 \pm 3,06 (39,00–50,00)	0,14 (>0,80)

* Teste t para amostras dependentes.

TABELA IV
Resultados das análises de correlação simples
entre a atividade total da BChE (ABChE)
e as demais variáveis analisadas no presente trabalho,
antes (1) e após (2) a terapia de reposição hormonal (n = 32)

Variáveis	ABChE 1 (p)	ABChE 2 (p)
Colesterol total	0,36 (< 0,05)	0,43 (< 0,05)
LDL-C	0,41 (< 0,05)	0,47 (< 0,05)
Triglicérides	0,44 (= 0,01)	0,31 (> 0,05)
E ₂	-0,37 (< 0,05)	-0,32 (> 0,05)
FSH	0,34 (> 0,05)	0,24 (> 0,10)
Hematócrito	0,52 (< 0,01)	0,47 (< 0,01)

Somente entraram na tabela as variáveis que apresentaram correlações significativas ou próximas à significância

com LDL-C^{20,22,23} e com TG^{3,8,9}. Entretanto, é interessante observar que, após a TRH, a correlação do TG não foi significativa. Esse resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pela possível inibição da ABChE pelos hormônios esteróides, ao mesmo tempo em que estes hormônios aumentam os níveis de TG. Uma função para a BChE, relacionada à produção das lipoproteínas VLDL-C e LDL-C têm sido relatada^{9,24}.

A significativa correlação (Tab. IV) entre ABChE e o hematócrito (VG), antes e após TRH (p < 0,01), recomenda futura investigação.

Em síntese, nossos dados enfatizam a relação entre a ABChE e os níveis dos lipídeos séricos e apoiam as hipóteses de um potencial envolvimento desta enzima no metabolismo dos lipídeos, como sugerido por outros autores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: aos médicos que encaminharam os pacientes (Dra. Evanildes Guerreiro, Dra. Jussara Locatelli, Dra. Monica Vieira e Dr. Venilton Vieira), as pacientes que autorizaram a pesquisa e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal do Paraná, pelos auxílios financeiros.

REFERÊNCIAS

- Alcântara V. M. Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR. Curitiba, 2000. Dissertação, Doutorado em Genética - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Alcântara V. M., Chautard-Freire-Maia E. A., Scartezini M., et al. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2002, 62:399-404.
- Alcântara V. M., Scartezini M., Chautard-Freire-Maia E. A. et al. Butyrylcholinesterase activity may be an additional risk factor in cardiovascular disease. *Rev Endocrinol Nutr* 1995, 3:52.
- Archer T. L., Janowsky E. C. Plasma cholinesterase deficiency associated with diethylstilbestrol therapy. *Anesth Analg* 1978, 57:726-29.
- Baracat E. C. Climatério. T. R. H. Report. Hemostasia e doenças cardiovasculares. São Paulo: UNIFESP, n. 2, 1998.
- Chautard-Freire-Maia E. A. Relação entre os fenótipos do loco CHE2 da colinesterase do soro e o peso individual em duas amostras do sul do Brasil. Curitiba, 1989. Tese, Professor Titular em Genética - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Cohen S. E. Why is the pregnant patient different? *Semin Anesth* 1982, 1:73.
- Crook M., Haq M., Tutt P. *Serum lipids, acute phase proteins and serum cholinesterase in normal subjects.* *Scand J Clin Lab Invest* 1994, 54:601-3.
- Cucuianu M., Popescu T. A., Opincaru A., et al. Serum pseudocholesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clin Chim Acta* 1975, 59:19-27.

- Dietz A.A., Rubinstein H.M., Lubrano T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. *Clin Chem* 1973, 19:1309-13.
- Erberich L. C.N., Alcântara V. M., Picheth G., et al. Reposição hormonal na pós-menopausa e seus efeitos sobre os níveis de lipídeos plasmáticos. *RBAC* 2001, 3377-83.
- Evans R. T., Wroe J. M. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinylcholine sensitivity? An assessment of four methods. *Clin Chem* 1978, 24:1762-6.
- Evans R. T., Wroe J. M. Plasma cholinesterase changes during pregnancy. Their interpretation as a cause of suxamethonium-induced apnoea. *Anaesthesia* 1980, 35:651-4.
- Fernandes C. E., Pereira Filho A. S. Climatério: Manual de Orientação. Rio de Janeiro: Febrasgo, 1995.
- Foldes F. F. Enzymes in anesthesiology. New York: Springer Verlag, 1978.
- Fuller B. H., Berger G. M. Automation of serum cholinesterase assay - paediatric and adult reference ranges. *S Afr Med J* 1990, 78:577-80.
- Goedde H. W., Doenicke A., Altland K. Pseudocholesterasen. *Pharmakogenetik, Biochemie, Klinik.* Berlin: Springer Verlag, 1967.
- Griffin B., Farish E., Walsh D., et al. Response of plasma low density lipoprotein subfractions to oestrogen replacement therapy following surgical menopause. *Clin Endocrinol* 1993, 39:463-8.
- Kutty K. M. Review: Biological function of cholinesterase. *Clin Biochem* 1980, 13:239-43.
- Kutty K. M., Rowden G., Cox A.R. Interrelationship between serum b-lipoprotein and cholinesterase. *Canad J Biochem* 1973, 51:883-7.
- Lahdenpera S., Tilly-Kiesi M., Vuorinen-Markkola H., et al. Effects of gemfibrozil on low-density lipoprotein particle size, density distribution, and composition in patients with type II diabetes. *Diabetes Care* 1993, 16:584-92.
- Lawrence S. H., Melnick P. J. Enzymatic activity related to human serum b-lipoprotein: histological, immunoelectrophoretic and quantitative studies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961, 107:998-1001.
- Lehtonen A., Marniemi J., Inberg M., et al. Levels of serum lipids, apolipoproteins A-I and B and pseudocholesterase activity and their discriminative values in patients with coronary by-pass operation. *Atherosclerosis* 1986, 59:215-21.
- Magarian E. O., Dietz A. J. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. *J Clin Pharmacol* 1987, 27:819-20.
- Page C. P., Curtis M. J., Sutter M. C., et al. *Farmacologia Integrada*: São Paulo: Manole, 1999.
- Palacios S. G. Climatério e Menopausa. Madrid: Mirpal, 1993.
- Pritchard J. A. Plasma cholinesterase activity in normal pregnancy and in eclamptogenic toxemias. *Am J Obstet Gynecol* 1955, 70:1083.
- Probert D. N., Brackenridge C. J. The relation of sex, age, smoking status, birth rank and parental ages to pseudocholesterase activity and phenotypes in a sample of Australian Caucasian adults. *Hum Genet* 1976, 32:181-88.
- Redderson C. L. Interactions of steroids and serum cholinesterase. *Int J Clin Pharmacol* 1973, 8:51.
- Robertson G. S. Serum cholinesterase deficiency. II: pregnancy. *Br J Anaesth* 1966, 38:361-9.
- Robertson G. S. Serum protein and cholinesterase changes in association with contraceptive pills. *Lancet* 1967, 1:232-5.
- Scott E. M., Weaver D. D., Wright R. C. Discrimination of phenotypes in human serum cholinesterase deficiency. *Am J Hum Genet* 1970, 22:263-9.
- Shnider S. M. Serum cholinesterase activity during pregnancy, labor and the puerperium. *Anesthesiology* 1965, 26:335-9.
- Sidell F. R., Kaminskis A. Influence of age, sex, and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. *Clin Chem* 1975, 21:1393-5.
- Statsoft, Inc. 1996. *Statistica for Windows* Tulsa, OK. Release 5.1: <http://www.statsoftinc.com>.
- Van Baal W. M., Kooistra T., Stehouwer C.D. Cardiovascular disease risk and hormone replacement therapy (HRT): a review based on randomised, controlled studies in postmenopausal women. *Curr Med Chem* 2000, 7:499-517.
- Wakatsuki A., Ikenoue N., Okatani Y., et al. Lipid transfer reactions and lipid composition of low-density lipoprotein particles in postmenopausal women receiving estrogen. *Obstet Gynecol* 1999, 94:492-7.
- Weststone H.J., La Motta R.V., Middlebrook L., et al. Studies of cholinesterase activity. IV. Liver function in pregnancy: values of certain standard liver function tests in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1958, 76:480-90.
- Whittaker M. Cholinesterase. New York: Karger, Basel, 1986.
- Whittaker M., Charlier A.R., Ramaswamy S. Changes in plasma cholinesterase isoenzymes due to oral contraceptives. *J Reprod Fertil* 1971, 26: 373-5.

Endereço para correspondência

Vânia Manfredini de Alcântara
 Faculdade de Farmácia da UFPR
 Rua Prof. Lothário Meissner, 3400,
 Jardim Botânico, Curitiba, PR - CEP 80210-170
 E-mail: vma@ufpr.br/vma@brturbo.com

Ação da frutose-1,6-bisfosfato sobre a toxicidade aguda do ácido nicotínico*

Fructose-1,6-bisphosphate action in nicotinic acid acute toxicity-induced

Adroaldo Lunardelli, Marina Dornelles Camargo & Jarbas Rodrigues de Oliveira

RESUMO – O ácido nicotínico (niacina) se mostra como um importante agente que reduz o nível de colesterol total, lipídios de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, sendo efetivo na terapia para regulação lipoprotéica e redução de risco cardiovascular. A toxicidade hepática é um efeito potencialmente sério da terapia com niacina. Já são bem descritos os efeitos da frutose-1,6-bisfosfato na injúria de diferentes órgãos, além de apresentar-se protetora em lesões tóxicas. A toxicidade aguda sobre os perfis lipídico e hepático do ácido nicotínico, bem como, a ação da frutose-1,6-bisfosfato, como protetor na ação letal do ácido, são os alvos deste estudo. A dose de 800mg/Kg intraperitoneal de ácido nicotínico é capaz de levar a óbito 25% dos ratos analisados. Mostra-se que o ácido exerce ação sobre os lipídios, diminuindo os valores de colesterol, mas não os de triglicérides. A lesão hepática decorrente do uso crônico do ácido nicotínico não é reproduzido na análise aguda, sendo que a causa da mortandade dos animais não é conhecida. Elucida-se também, que a frutose-1,6-bisfosfato 500mg/Kg, via subcutânea, não é competente no alento dos males causados pelo ácido, ao contrário, potencializa a ação da niacina ao provocar aumento dos níveis de lactato desidrogenase.

PALAVRAS-CHAVE – Ácido nicotínico, frutose-1,6-bisfosfato, toxicidade, lipídios.

SUMMARY – Nicotinic acid (niacin) is an important agent that reduce the total cholesterol levels, low-density lipoproteins (LDL) and triglycerides, being effective in the therapy for lipoproteic regulation and reduction cardiovascular risk. Hepatic toxicity is the important effect in niacin therapy. Fructose-1,6-bisphosphate effects in the different organs injury and protective action in the toxic damage were described in the literature. Acute toxicity of the nicotinic acid in the lipid and liver profiles and the fructose-1,6-bisphosphate activity like protector in the acid lethal action are the aim of this study. Intraperitoneal dose of nicotinic acid 800mg/Kg is lethal in 25% of the rats analyzed. It was shown that the acid have action about the lipids, decreasing the cholesterol levels, but not triglycerides levels. Liver injury caused by nicotinic acid chronic use is not reproduced in the acute analysis and the cause of the animals mortality is not known. The data indicates that the subcutaneous administration of fructose-1,6-bisphosphate 500mg/Kg do not decrease the damage caused by the nicotinic acid. However, it rise the niacin action when provoke an increase in the lactate dehydrogenase levels.

KEYWORDS – Nicotinic acid, fructose-1,6-bisphosphate, toxicity, lipids.

INTRODUÇÃO

Ácido nicotínico

Ácido nicotínico (niacina) é uma terapia efetiva para regulação lipoprotéica e redução de risco cardiovascular (Capuzzi, 1998), e já foi considerada a droga de escolha para a terapia de hipercolesterolemia severa (Clementz, 1987). A niacina se mostra como um importante agente que reduz o nível de colesterol total, lipídios de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos. Também apresenta-se como um agente que aumenta os níveis dos lipídios de alta densidade (HDL). Estimula a síntese e a secreção de apolipoproteína A1 e aumenta o catabolismo da lipoproteína (a) (Forti, 2000). A niacina tem se mostrado uma droga eficaz na redução de eventos coronários e na total mortalidade (Piper, 2002). A modificação dos lipídios é chave na prevenção da doença coronariana (Clark, 2003).

O mecanismo de ação é conhecido pela inibição da lipólise no tecido adiposo, reduzindo a esterificação dos triglicerídeos no fígado e aumentando a atividade das lipases lipoprotéicas (Ricardo, 2001).

Terapia com niacina é geralmente iniciada com simples doses de 100mg/dia a 250mg/dia. A frequência da dose e a dose diária total são gradualmente aumentadas, sendo alcançada 1,5g/dia a 2g/dia (Rader, 1992). A dose é aumentada para 3g/dia (1g três vezes ao dia) se o LDL-colesterol não baixar significativamente com doses de 1,5g/dia a 2g/dia (Rader, 1992). Esta droga é indicada para um longo tempo de tratamento da hipercolesterolemia e/ou hipertriglicemia (Capuzzi, 1998).

Ácido nicotínico é um complexo da vitamina B (B3) solúvel em água, e se converte a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (Gilman, 1995). O ácido nicotínico é um importante agente hipolipidêmico e indutor rubor facial. O efeito vasodilatador do ácido nicotínico é bem descrito na musculatura lisa e esquelética e é mediada pela geração de prostaglandinas vasodilatadoras (Gadegbeku, 2003).

A toxicidade hepática é um efeito potencialmente sério da terapia com niacina. Em casos severos, observa-se também elevações de bilirrubina sérica, de amônia e um aumento no tempo de protrombina. A maior parte dos casos severos resultam em hepatite fulminante e hepati-

Recebido em 30/6/2003
Aprovado em 23/10/2003

*PUC/RS - Faculdade de Biociências/Laboratório de Pesquisa em Biofísica/Av. Ipiranga, 6681, Pd. 12C, S. 263/ CP 1429/CEP 90619-900/ Porto Alegre – RS – Brasil

te encefalopática (Rader, 1992). Existe uma alteração estatística significativa nas transaminases hepáticas, na fosfatase alcalina, na bilirrubina direta, na glicose, na amilase e no ácido úrico (Capuzzi, 1998).

A droga não produz alteração na excreção fecal do colesterol (esteróides neutros) e nem do ácido biliar. Entretanto, ela produz um pequeno, mas significativo, incremento na secreção hepática do colesterol biliar (Grundy, 1981). A disfunção hepática associada com a administração exclusiva do niacina, é observada após 1 a 18 meses de administração do fármaco (Rader, 1992).

A hepatotoxicidade foi observada em pacientes que receberam doses de 4g a 5g diárias de ácido nicotínico por muitos meses. As elevações dos níveis séricos das aminotransferases são resolvidos com a cessação da droga durante um mês. Um caso de falência hepática fulminante induzido por ácido nicotínico foi reportado. O mecanismo de ação pelo qual o ácido nicotínico produz hepatotoxicidade celular ainda não foi bem definido (Mullin, 1989).

Frutose-1,6-bisfosfato

A frutose-1,6-bisfosfato é um metabólito intermediário da rota glicolítica, sendo já bem descrito seus efeitos terapêuticos na injúria isquêmica do rim, coração, fígado, intestino, cérebro e pulmão (Nunes, 2003a); além de apresentar-se protetora em outras patologias, como no choque e em lesões tóxicas (Nunes, 2003b). Os efeitos protetores observados pelo açúcar são devidos à sua habilidade em manter os níveis intracelulares de ATP e Ca^{++} , evitando a morte celular por déficit de energia (Aiub, 2003). Em situações de estresse, a frutose-1,6-bisfosfato inibe a formação de radicais livres e protege contra o dano celular.

Os estudos sobre a hepatotoxicidade da galactosamina já foram bem definidos, sendo testados vários compostos como agentes protetores contra os efeitos da hepatotóxina. Entre as drogas experimentadas está a frutose-1,6-bisfosfato. Os estudos mostram que este composto, por ser bisfosforilado, tem grande dificuldade em atravessar a membrana celular e, como é uma substância oriunda da degradação fisiológica da glicose, tem baixa toxicidade. A frutose-1,6-bisfosfato apresenta um importante efeito protetor celular contra a ação da galactosamina (Roig, 1994). O uso de galactosamina (conhecido hepatotóxico) em conjunto com frutose-1,6-bisfosfato, se mostra menos lesivo do que sem o açúcar (Farias, 1989). Há ainda, dados que mostram a redução do percentual de células hepáticas mortas pela toxicidade da galactosamina com o uso da frutose-1,6-bisfosfato, aumentando a apoptose em detrimento da necrose (Aiub, 2003).

O efeito protetor da frutose-1,6-bisfosfato no fígado, quando do uso de tetracloreto de carbono (CCl_4), demonstrou que há uma significativa queda na produção das enzimas ALT e AST, comparados com as células que não tiveram contato com o açúcar bifosforilado. Os metabólitos hepáticos do ATP e frutose-2,6-bisfosfato diminuem sob ação da toxina e se recuperam parcialmente com o uso de frutose-1,6-bisfosfato. A frutose-1,6-bisfosfato ajuda na regeneração celular após uso da toxina CCl_4 , uma vez que os níveis das enzimas ornitina descarboxilase e espermidina N-acetiltransferase estavam significativamente mais aumentados (Tavazzi, 1990).

A incubação de hepatócitos com álcool mostra que

este é capaz de aumentar a entrada do íon cálcio em células renais de ratos. Este fenômeno é dependente da concentração de etanol e da concentração de cálcio, além do tempo de incubação. O uso de frutose-1,6-bisfosfato tem demonstrado que ocorre um efeito protetor quando da ação do etanol e outros álcoois. O mecanismo proposto é o de que ocorre a estabilização da membrana plasmática (Rao, 1990).

A capacidade terapêutica do ácido nicotínico de influenciar no comportamento lipídico e a lesão hepática causada pela droga, quando do uso crônico, já está descrito. A toxicidade aguda sobre os perfis lipídico e hepático do ácido nicotínico, bem como, a ação da frutose-1,6-bisfosfato como protetor na ação letal do ácido são os alvos deste estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo, utilizou-se *Rattus norvegicus* (Wistar) machos adultos, todos de mesma linhagem e socialização, pesando aproximadamente 250g. Para a curva de mortalidade foram realizados ensaios toxicológicos agudos com a administração de ácido nicotínico intraperitoneal nas dosagens de 500mg/kg (n de 5), 800mg/Kg (n de 14) e 1000mg/Kg (n de 5), além do grupo que recebeu – além do ácido – a administração de frutose-1,6-bisfosfato por via subcutânea (n de 16), onde se fez a análise de sobrevivência dos animais em 24 horas. Para as análises bioquímicas, os animais sobreviventes acometidos pela dose de 800mg/Kg de ácido nicotínico foram distribuídos em três grupos experimentais de acordo com o procedimento realizado.

O grupo 1 (n de 8) se presta a ser o grupo controle, fornecendo os valores de referência para os parâmetros analisados. A este grupo, administrou-se intraperitonealmente a solução de polietilenoglicol (PEG 400) a 50%, pois esta representa a matriz da solução de ácido nicotínico.

O grupo 2 (n de 8) foi submetido à administração intraperitoneal em dose única de ácido nicotínico 800mg/Kg, já que tal dose representa-se letal aos animais, mas não a todos.

Ao grupo 3 (n de 8), além da administração intraperitoneal de ácido nicotínico 800mg/Kg, se procedeu – no mesmo momento – a inoculação subcutânea de frutose-1,6-bisfosfato 500mg/Kg. Tal concentração do açúcar foi responsável por aumentar a sobrevivência de ratos sépticos (Nunes, 2003c).

Os ratos foram mantidos com água e comida *ad libitum*. Fez-se coleta de sangue dos animais 24 horas após o procedimento para as dosagens de triglicérides, colesterol total, aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP) e desidrogenase láctica (LDH). As transaminases foram dosadas em ensaio cinético ultravioleta, a LDH foi mensurada em ensaio cinético de tempo fixo e os lipídios são determinados através de ensaio enzimático colorimétrico. Desde 8 horas antes da coleta de sangue, os ratos foram mantidos em jejum para a correta mensuração dos triglicérides.

Através dos resultados obtidos nas análises foram calculadas as médias, erro padrão (EP) e significância (Oneway Anova) com análise de Bonferroni, considerando-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A mortalidade dos animais submetidos à administração intraperitoneal de ácido nicotínico nas diferentes doses é expressa na Fig. 1, onde se verifica que a dose de 500mg/Kg não se apresenta capaz de levar nenhum animal à morte. Em contrapartida, a dose de 1000mg/Kg é suficiente para que todos os ratos evoluam ao óbito. A dose de 800mg/Kg leva à morte 28% dos animais experimentados. O grupo que também recebeu a dosagem de 800mg/Kg do ácido e o tratamento de frutose-1,6-bisfosfato, mostrou a taxa de 25% de mortalidade, como elucidado na Fig. 2.

A análise bioquímica da função lipídica mostrou que os triglicérides não sofrem variação estatística significativa nos diferentes grupos propostos, apesar de mostrar ligeira diminuição de tal parâmetro nos grupos 2 e 3 em relação ao grupo controle como mostra a Fig. 3. Na análise das dosagens de colesterol total, observa-se queda estatística significativa deste parâmetro no grupo acometido pelo ácido nicotínico e no grupo tratado com frutose-1,6-bisfosfato (grupos 2 e 3, respectivamente) mostrado na Fig. 4.

Quanto ao perfil hepático dos grupos experimentados, os níveis séricos das transaminases alanina aminotransferase (Fig. 5) e aspartato aminotransferase (Fig. 6) mostram-se com elevação nos grupos 2 e 3 em relação ao grupo controle, não sendo, contudo, significativo. A atividade da desidrogenase láctica mostra-se aumentada no grupo que recebeu a administração de ácido nicotínico, bem como, no grupo que submeteu-se ao tratamento com frutose-1,6-bisfosfato, sendo este último (grupo 3) com elevação significativa em relação ao grupo controle, como mostra a Fig. 7.

DISCUSSÃO

Há relato de casos já descritos em que pacientes que utilizam o ácido nicotínico por um determinado tempo, desenvolvem falência hepática fulminante devido à toxicidade que a droga possui frente ao fígado (Clementz, 1987). A intoxicação aguda com o ácido, contudo, ainda não foi relatada na clínica. Em nosso estudo, conforme mostra a Fig. 1, 1000mg/Kg de ácido nicotínico administrado por via intraperitoneal mostra-se como dose tóxica letal aguda (24 horas) a 100% dos animais experimentados.

Em contrapartida, 500mg/Kg da droga não impõe morte a qualquer dos ratos brancos estudados.

O grupo que recebeu a administração de 800mg/Kg de ácido nicotínico foi responsável pela morte de 28% dos animais. O grupo em que foi administrado 800mg/Kg do ácido e o tratamento com frutose-1,6-bisfosfato 500mg/Kg, apresentou uma mortalidade de 25% (Fig. 2), mostrando que o açúcar não é capaz de promover a redução da mortalidade de ratos acometidos pela intoxicação aguda de ácido nicotínico, como é capaz em ratos com septicemia (Nunes, 2002), onde há aumento de 50% da sobrevivência dos animais. A dose de 800mg/Kg é o grupo alvo das análises bioquímicas por apresentar percentual intermediário (não zero e nem cem por cento) de mortalidade dos animais. A estes, traçou-se os perfis dos parâmetros analisados.

Níveis elevados de colesterol total no soro aumentam o fator de risco de doenças coronarianas, bem

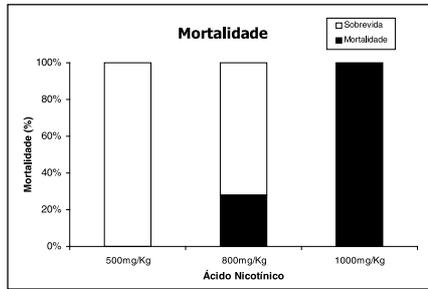


FIG. 1 - Mortalidade dos grupos experimentais nas distintas doses de ácido nicotínico.

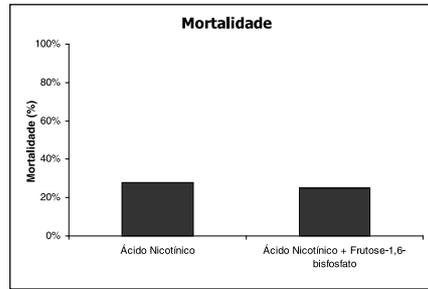


FIG. 2 - Mortalidade dos grupos com ácido nicotínico e tratado com frutose-1,6-bisfosfato.

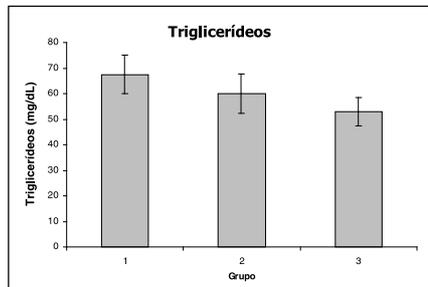


FIG. 3 - Média ± EP do nível de triglicérides no soro dos diferentes grupos de animais.

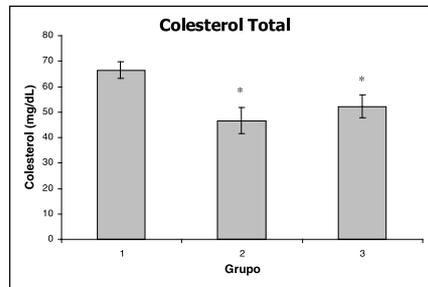


FIG. 4 - Concentração de colesterol nos distintos grupos experimentais (média ± EP). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os demais grupos são indicadas com *.

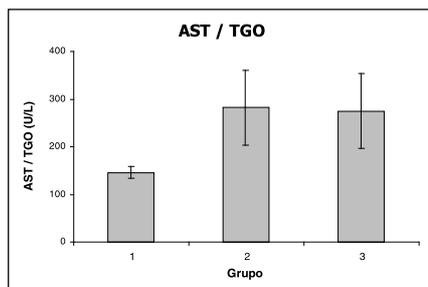


FIG. 5 - Atividade sérica de aspartato aminotransferase nos distintos grupos experimentais (média ± EP).

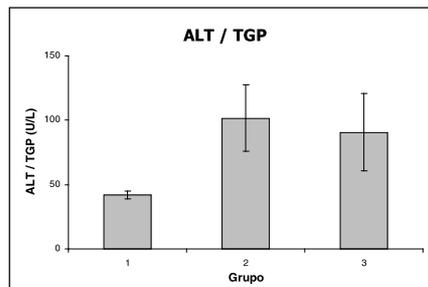


FIG. 6 - Média ± EP da atividade da alanina aminotransferase no soro dos diferentes grupos de animais.

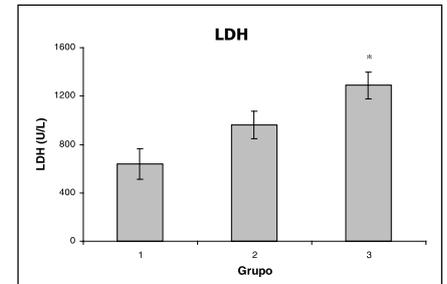


FIG. 7 - Concentração sérica de desidrogenase láctica nos diferentes grupos experimentais (média ± EP). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os demais grupos são indicadas com *.

como, a diminuição deste lípide mostra diminuição de 34% dos eventos coronários (Lennep, 2002). Os triglicérides representam fator de risco independente para as doenças cardiovasculares, sendo sua diminuição plasmática preponderante na queda do risco de desenvolvimento desta doença (Austin, 1998). Drogas que proporcionem queda dos valores séricos de colesterol e triglicérides, quando do aumento patológico destes – como a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia – são bem-vindas no combate aos males provocados por estas circunstâncias, como as doenças coronarianas. A niacina é um agente eficaz na diminuição de lípidios (Basu, 2002), provocando a queda de triglicérides e de colesterol total (Grundy, 1981), mostrando-se um agente com grande potencial na regulação dos níveis destes lípidios quando de seu aumento. Em nosso estudo, obtivemos diminuição dos níveis de colesterol no grupo que recebeu ácido nicotínico e também naquele em que foi administrado frutose-1,6-bisfosfato, mostrando que o ácido apresenta eficácia clínica na diminuição de colesterol em 24 horas após a administração, mostrando ação aguda. Em contrapartida, os níveis de triglicérides não se mostraram significativamente diminuídos, elucidando que o ácido nicotínico não exerce efeito agudo sobre os triglicérides.

Aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase são enzimas comumente utilizadas para avaliação do dano hepático. A evolução dos níveis séricos destas enzimas indica a ruptura do órgão e alterações na permeabilidade de sua membrana (Sharma, 2001). Estas são ferramentas muito úteis para o diagnóstico, prognóstico e evolução da terapia de tratamento, já que a AST e a ALT encontram-se elevadas em quase todas as patologias que acometem o fígado. Informações acerca da hepatotoxicidade causada por drogas que têm por objetivo a diminuição dos valores lipídicos é bem limitado. A exceção é o ácido nicotínico, que sabidamente causa significativa incidência de lesão hepática com aumento de AST e ALT (Tolman, 2000).

Neste estudo, observa-se uma grande mortalidade dos animais submetidos ao ácido nicotínico 800mg/Kg quando da sua administração intraperitoneal em ratos. A mortalidade aguda dos animais porém, não é devida à ação da droga sobre o fígado, já que, conforme mostram as Fig. 5 e 6, não se vê aumento significativo das aminotransferases em qualquer dos grupos em relação ao grupo controle.

A desidrogenase láctica é abundantemente encontrada no miocárdio, rins, fígado e músculos, sendo que seus valores séricos elevam-se em numerosas situações, principalmente – utilizado na clínica – no infarto do miocárdio e nas disfunções hepáticas. Há aumento de LDH no grupo de animais que além do ácido nicotínico, recebeu o tratamento com frutose-1,6-bisfosfato (Fig. 7), mostrando que o aumento desta enzima parece ser potencializado pelo açúcar. O mecanismo de ação da frutose-1,6-bisfosfato ainda não está esclarecido por completo, e para tal, numerosos estudos têm sido desenvolvidos. A intimidade e facilidade com que as pessoas podem se expor ao ácido nicotínico – por fazer parte do complexo vitamínico B, e portanto, fazer parte da constituição de todos os polivitamínicos – fazem deste composto um medicamento perigoso devido ao seu poder de lesão celular hepático. O mecanismo letal e tóxico agudo todavia, ainda é desconhecido, sendo imperativo maiores estudos acerca desta droga.

Por conclusão, este desígnio esclarece a toxicidade letal aguda do ácido nicotínico, mostrando que a dose

de 800mg/Kg intraperitoneal deste composto é capaz de levar a óbito 28% dos ratos analisados. Mostra-se que o ácido exerce ação sobre os lipídios, diminuindo os valores de colesterol, mas não os de triglicérides. A lesão hepática descrita na literatura decorrente do uso crônico do ácido nicotínico não é reproduzido na análise aguda, sendo que o mecanismo da mortandade dos animais não é conhecida. Elucida-se também, que a frutose-1,6-bisfosfato não é competente no alento dos males causados pelo ácido, pelo contrário, potencializa a ação da niacina ao provocar aumento dos níveis de lactato desidrogenase.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Porto Alegre os nossos sinceros protestos de estima e consideração por todo o apoio e disposição dispensado a este desígnio.

REFERÊNCIAS

1. Aiub C. A. F., Bortolini R., Azambuja A. A., Alves Filho J. C. F., Nunes F. B., Oliveira J. R. Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology Research* 2003; 25(1):83-91.
2. Austin M. A., Hokanson J. E., Edwards K. L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *American Journal of Cardiology* 1998; 81(4A):7B-12B.
3. Basu T. K., Makhani N., Sedgwick G. Niacin (nicotinic acid) in non-physiological doses causes hyperhomocysteinaemia in Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr* 2002; 87(2):115-119.
4. Capuzzi D. M., Guyton J. R., Morgan J. M., Goldberg A. C., Kreisberg R. A., Brusco A. O., Brody J. Efficacy and safety of an extended-release niacin (Niaspan): a long-term study. *American Journal of Cardiology* 1998; 82:74U-81U.
5. Clark L. T. Treating dyslipidemia with statins: the risk-benefit profile. *American Heart Journal* 2003; 145(3):387-396.
6. Clementz G. L., Holmes A. W. Nicotinic acid induced fulminant hepatic failure. *Journal of Clinical Gastroenterology* 1987; 9(5):582-584.
7. Farias L. A., Markov A. K. Improved brain metabolism with fructose-1,6-diphosphate during insulin-induced hypoglycemic coma. *The American Journal of The Medical Science* 1989; 296(7):294-299.
8. Forti N. Tratamento medicamentoso das dislipidemias primárias. *Revista da Sociedade de Cardiologia de São Paulo* 2000; 10(6):780-789.
9. Gadegbeku C. A., Dhandayuthapani A., Shrayef M.Z., Egan B. M. Hemodynamic effects of nicotinic acid infusion in normotensive and hypertensive subjects. *American Journal of Hypertension* 2003; 16:67-71.
10. Gilman A. G., Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
11. Grundy S. M., Mok H. Y. I., Zech L., Berman M. Influence nicotinic acid on metabolism of cholesterol and triglycerides in man. *J. Lipid Research* 1981; 22:24-36.
12. Lennep J. E. R., Westerveld H. T., Erkelens D. W., Wall E. E. Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. *Cardiovascular Res* 2002; 53:538-549.
13. Mullin G. E., Greenon J. K., Mitchell M. C. Fulminant hepatic failure after ingestion of sustained-release nicotinic acid. *Annals of Internal Medicine* 1989; 111(3):253-255.
14. Nunes F. B., Graziottin C. M., Alves Filho J. C. F., Lunardelli A., Caberton E., Peres A., Oliveira J. R. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *International Immunopharmacology* 2003c; 3(2):267-272.
15. Nunes F. B., Gaspareto P. B., Santos R. C. V., Assis M., Graziottin C. M., Biolchi V., Alves Filho J. C. F., Lunardelli A., Ávila L. D., Pires M. G. S., Wächter P. H., Oliveira J. R. Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats. *Toxicology Letters* 2003a; 143(1):73-81.
16. Nunes F. B., Graziottin C. M., Alves Filho J. C. F., Lunardelli A., Pires M. G. S., Wächter P. H., Oliveira J. R. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacological Research* 2003b; 47(1):35-41.
17. Nunes F. B., Pires M. G. S., Alves Filho J. C. F., Wächter P. H., Oliveira J. R. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Critical Care Medicine* 2002; 30(9):2069-2074.
18. Pieper J. A. Understanding niacin formulations. *Am J Manag Care* 2002; 8(12):S308-S3014.
19. Rader J. I., Calvert R. J., Hathcock J. N. Hepatic toxicity of unmodified and time-release preparations of niacin. *The American Journal of Medicine* 1992; 92:77-81.
20. Rao S. B., Mehendale H. M. Protection from chlordecone (Kepone) potentiated CCl₄ hepatotoxicity in rats by fructose-1,6-diphosphate. *Journal of Biochemistry* 1990; 21:949-954.
21. Ricardo K. F. S., Oliveira T. T., Nagem T. J., Pinto A. S., Oliveira M. G. A., Soares J. F. Effect of flavonoids morin; quercetin and nicotinic acid on lipid metabolism of rats experimentally fed with triton. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2001; 44(3):263-267.
22. Roig T., Oliveira J. R., Bartrons R., Bermúdez A. J. Fructose-1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *American Journal Physiology* 1994; 266(35):C1722-C1728.
23. Sharma D. K., Chauhan P. P. S., Agrawal R. D. Changes in the level of serum enzymes and total protein during experimental haemonchosis in Barbari goats. *Small Ruminant Research* 2001; 42:119-123.
24. Tavazzi B., Cerroni L., Di Pierno D., Lazzarino G., Nutinen M., Starnes J. W., Giardina B. Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart: prevention by exogenous fructose-1,6-diphosphate. *Free Radic Res Commun* 1990; 10:167-176.

Comparação entre o perfil lipídico de pacientes atendidos em laboratórios privados e públicos da 18ª Regional de Saúde de Santa Catarina*

Patient's lipid profile comparison among private and public laboratory from the 18th Health Zones of Santa Catarina State

Kenya Thiesen¹, Jorge Amaral² & Liliete Canes Souza³

RESUMO – As doenças cardiovasculares são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo Ocidental. Assim, o perfil lipídico da população residente na 18ª Regional de Saúde do Estado de Santa Catarina foi analisado através de resultados secundários, obtidos do banco de dados de Laboratórios Clínicos Públicos e Privados, possibilitando a comparação entre pacientes de diferentes classes sociais. No laboratório particular o colesterol, para ambos os sexos, apresentou uma frequência superior a 60% nas faixas acima da concentração limítrofe, enquanto nos laboratórios públicos estes valores apresentaram um equilíbrio com aproximadamente 50% nas faixas inferiores ao limítrofe, exceto para o sexo feminino onde os resultados foram semelhantes aos dos pacientes do laboratório privado. O LDL-COL, em todos os estabelecimentos, obteve mais de 50% dos resultados abaixo da faixa desejável. O HDL-COL foi o dado mais divergente, no laboratório particular, para ambos os sexos, os valores ficaram entre 40 e 60mg/dL, seguidos da faixa alta; no laboratório público as concentrações <40mg/dL predominaram para o sexo masculino, enquanto para o sexo feminino e ignorado as concentrações entre 40 e 60mg/dL foram seguidas das baixas. Em todos os estabelecimentos para concentrações de triglicérides predominou a faixa ótima em mais de 55% dos pacientes.

PALAVRAS CHAVE – Perfil lipídico; laboratório público; laboratório privado.

SUMMARY – The cardiovascular diseases are one of the biggest causes of morbidity and mortality in the western world. Thus, the lipid profile from people resident in the 18th health zones of Santa Catarina state was evaluated through of secondary result obtained with the Public and Private Clinical Laboratories data bank. It was possible to compare the results of patients from different social classes. In the private laboratory cholesterol concentration, for both genders, showed a frequency superior to 60% in the levels above the threshold, while in the public laboratories these numbers show a balance with approximately 50% in the levels below the threshold, except for the female gender in which the results were similar to the ones of the private laboratory patients. The LDL, in all establishments, obtained more than 50% of the results below the desirable level. The HDL was the more different data, in the private laboratory, for both genders, the values ranged from 40 to 60 mg/dL followed by the highest level; in the public laboratories the concentration were <40 mg/dL prevail for male gender, while for female gender and unknown sex the concentration from 40 to 60mg/dL followed the low levels. In all establishments for levels of triglyceride prevail the best concentration in more than 55% of the patients.

KEYWORDS – Lipid profile; public laboratory; private laboratory.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são hoje uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo Ocidental, possuem origem patológica multifatorial onde, entre outras causas, as concentrações elevadas de colesterol plasmático constituem um importante fator de risco predisponente ao desenvolvimento de aterosclerose (Witztum *et al.*, 2001). Segundo Grundy (2000), muitas pessoas sem manifestações clínicas de doença arterial coronariana (DAC) terão um infarto do miocárdio na próxima década como aqueles que já carregam um diagnóstico de DAC. Ainda, segundo o autor, 25% dos primeiros infartos do miocárdio serão fatais. Existe uma relação direta entre as con-

centrações de colesterol (COL) e o risco do desenvolvimento da aterosclerose. Ao contrario dos valores de colesterol total (CT) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) elevados, a elevação da concentração plasmática de HDL (lipoproteína de alta densidade) em indivíduos normais e hipercolesterolêmicos confere um fator de inversão do risco no desenvolvimento de DCV (Martins, 1991; Spieker *et al.*, 2002).

Os efeitos benéficos da terapia de redução das concentrações lipídicas, nos diferentes tipos de prevenção de DCV, foram conclusivamente demonstrados em triagens de grande escala clínica. Estes estudos demonstraram que a redução das concentrações de lipídeos de forma mais acentuada foi mais efetiva na diminuição

Recebido em 3/9/2003
Aprovado em 24/12/2003

* Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina (PGFAR/UFSC).

Trabalho referente à Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR) do Centro de Ciências Farmacêuticas (CCS) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para obtenção do grau de Mestre em Farmácia

¹Mestre em Farmácia – PGFAR/CCS/UFSC; ²Bioquímico do Hospital Universitário – UFSC; ³Prof^º Adjunto do Dept^º de Análises Clínicas – PGFAR/CCS/UFSC

da progressão da doença e no controle das concentrações de COL. Além de aumentar a sobrevivência dos pacientes. Esse fato consolida de forma concreta a importância de conhecer os valores dos componentes do perfil lipídico, visto que a aterosclerose é uma das principais causas de mortalidade em pessoas economicamente ativas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Brown, 2000a/b; Santos, *et al.*, 2001; Gotto Jr, 2002).

Segundo projeções da Organização Mundial de Saúde, caso medidas preventivas não sejam tomadas é possível prever para o futuro uma epidemia de DCV com conseqüências graves para a economia, com maiores gastos com a saúde. No Brasil as principais complicações atingiriam os gastos com saúde pública. Como demonstraram estudos feitos na década de 90 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1998) e o Ministério de Saúde, onde se estimou em 38,7 milhões (24,5%) o número de brasileiros cobertos por pelo menos um plano privado de saúde, sendo o restante da população (75,5%) coberto pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Esses dados vêm ressaltar a importância de programas preventivos no SUS, onde a maioria da população brasileira tem acesso a serviços de saúde.

Considerando o exposto, o presente trabalho tem como objetivo estimar a frequência dos valores referentes aos exames utilizados para avaliação do perfil lipídico de diferentes instituições (públicas e privadas), utilizando dados representativos da população da 18ª regional de saúde do Estado de Santa Catarina. Avaliar as concentrações de CT, de COL das lipoproteínas HDL e LDL (HDL-COL e LDL-COL, respectivamente) e de triglicerídeos (TG), em pacientes de ambos os sexos. E a partir dos resultados obtidos traçar um comparativo entre instituições públicas e privadas.

METODOLOGIA

Amostra

Valores referentes a exames do perfil lipídico (CT, LDL-COL, HDL-COL, TG), independentemente de o paciente ter realizado um ou todos os exames do perfil lipídico, que constavam do banco de dados de Laboratórios Clínicos localizados na 18ª regional de saúde, bem como sexo foi analisado, quando o dado sexo não estava disponível ou não constava, esse dado foi considerado ignorado. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética para pesquisa em seres humanos, do Hospital Arquidiocesano Cônsul Carlos Renaux, obtendo o parecer favorável.

Levantamento de dados

Foram selecionados todos os pacientes que realizaram um ou mais exames relativos à determinação do perfil lipídico nos laboratórios colaboradores utilizando um período pré-estabelecido de dois meses consecutivos. Optou-se por um intervalo de tempo de dois meses consecutivos, visto ser este o prazo estabelecido pelas Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Diretrizes de Prevenção a Aterosclerose, para o controle do perfil lipídico em pacientes que estão fazendo acompanhamento clínico, desta forma tentou-se evitar que constassem nos dados coletados dois resultados do mesmo paciente. Foi utilizada a fórmula de Friedewald ($LDL-COL = CT - HDL-COL - TG/5$; se TG for inferior a 400mg/dl) para determinação dos valores corres-

pondentes a alguma das variáveis da fórmula que não constasse dos resultados apurados nos laboratórios, mas possuíam os dados necessários para serem calculados.

Divisão dos registros

Os dados das concentrações de CT; LDL-COL; HDL-COL e TG coletados de cada registro foram agrupados por sexo. Os dados foram divididos através da classificação de seus valores. Esta divisão em faixas de concentração seguiu os valores de referência estabelecidos por Santos e colaboradores (2001). Apenas no caso do CT, para uma melhor visualização dos resultados, esses dados foram divididos em duas categorias adicionais, além das já estabelecidas por Santos e colaboradores (2001). Essas duas novas categorias foram denominadas de inferior a 160mg/dL (para os valores de CT diferentes de zero e inferior ou igual a 160mg/dL) e superior a 280mg/dL (para os valores maiores ou iguais a 280mg/dL).

Análise estatística dos dados

Foi realizada análise estatística dos dados acima obtidos usando-se o programa EpiInfo 6.04d e EpiInfo2002 disponibilizado pelo *Center for Disease Control and Prevention* (através do www.cdc.gov).

RESULTADOS

As cidades que compõem a 18ª Regional de Saúde

possuem uma população de 855.686 habitantes, segundo dados do IBGE, onde foram avaliados 19.985 registros de pacientes, oriundos de dois laboratórios públicos e de um laboratório privado com 22 unidades de atendimento na regional estudada.

Os exames que compõem o perfil lipídico foram classificados utilizando a sua concentração, os resultados foram divididos conforme as faixas de valores estabelecidas por Santos e cols. (2001), quando necessário, as concentrações foram divididas em outras faixas para melhor observar os resultados (Tab. I).

TABELA I
Valores de referência para exames do perfil lipídico em adultos > 20 anos*

Lípídeos	Valores (mg/dL)	Categorias
Colesterol Total	<200	Ótimo
	200-239	Limítrofe
	>240	Alto
LDL	<100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	>190	Muito alto
HDL	<40	Baixo
	>60	Alto
Triglicerídeo	<150	Ótimo
	150-199	Limítrofe
	200-499	Alto
	>500	Muito alto

*Fonte: SANTOS *et al.*, 2001

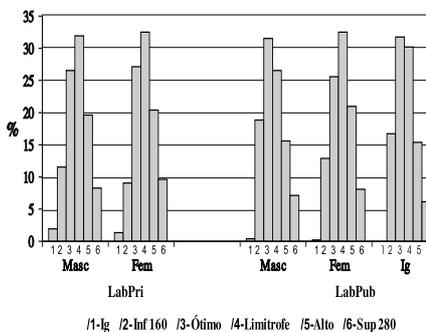


FIG. 1 – Distribuição por sexo das concentrações de colesterol total em pacientes atendidos em laboratórios privados e públicos colaboradores, da 18ª Regional de Saúde do Estado de Santa Catarina no período da pesquisa.

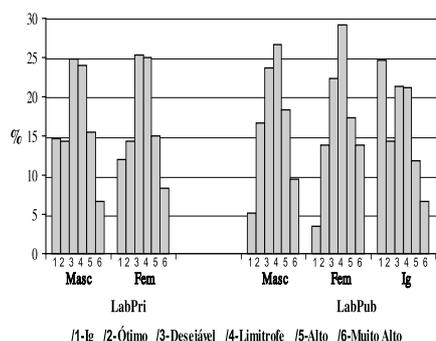


FIG. 2 – Distribuição por sexo das concentrações de LDL-COL em pacientes atendidos em laboratório privados e públicos colaboradores, da 18ª Regional de Saúde do Estado de SC no período da pesquisa.

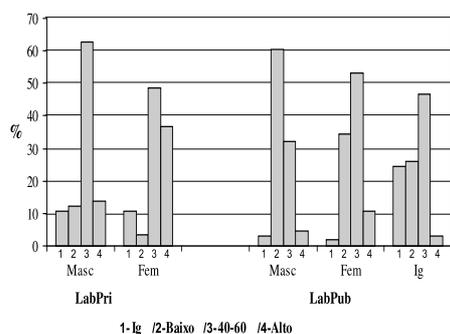


FIG. 3 – Distribuição por sexo das concentrações de HDL-COL em pacientes atendidos em laboratório privados e públicos colaboradores, da 18ª Regional de Saúde do Estado de Santa Catarina no período da pesquisa.

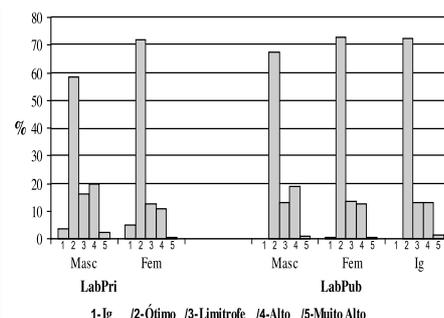


FIG. 4 – Distribuição por sexo das concentrações de triglicérides em pacientes atendidos em laboratório privados e públicos colaboradores, da 18ª Regional de Saúde do Estado de Santa Catarina no período da pesquisa.

Legendas: Masc= Masculino; Fem= Feminino; Ig= Ignorado; LabPri= Laboratório Privado; LabPub= Laboratório Público.

TABELA II
Frequência (em porcentagem) das concentrações de todos os lipídeos que compõem o perfil lipídico dos pacientes atendidos nos laboratórios privados e públicos colaboradores, da 18ª Regional de Saúde divididos por sexo

Lipídeos	Concentrações	Laboratório Privado		Laboratório Público		
		Masculino (n = 5303)	Feminino (n = 8940)	Masculino (n = 591)	Feminino (n = 949)	Ignorado (n = 4202)
CT	Ig	2	1,3	0,3	0,1	-
	Inf 160 mg/dL	11,5	9,1	18,8	12,8	16,7
	Ótimo	26,6	27,2	31,6	25,5	31,8
	Limítrofe	32	32,5	26,6	32,5	30,1
	Alto	19,7	20,3	15,6	21	15,3
LDL	Sup 280 mg/dL	8,2	9,6	7,1	8,1	6,1
	Ig	14,6	12	5,2	3,5	24,6
	Ótimo	14,4	14,3	16,6	13,8	14,3
	Desejável	24,8	25,4	23,7	22,3	21,3
	Limítrofe	24	25	26,6	29,2	21,2
HDL	Alto	15,5	15	18,4	17,3	11,9
	Muito Alto	6,7	8,3	9,5	13,9	6,7
	Ig	10,9	10,8	2,9	1,8	24,3
	Baixo	12,4	3,6	60,4	34,6	26
	40 a 60 mg/dL	62,9	48,7	32	53	46,7
TG	Alto	13,8	36,9	4,7	10,6	3
	Ig	3,7	4,8	0,1	0,6	0,2
	Ótimo	58,3	71,8	67,2	72,6	72,3
	Limítrofe	16	12,4	13,2	13,7	13
	Alto	19,7	10,6	18,8	12,6	13,2
	Muito Alto	2,3	0,4	0,7	0,5	1,3

Legenda: CT/colesterol total; LDL/lipoproteína de baixa densidade; HDL/lipoproteína de alta densidade; TG/triglicérides; Ig/dado ignorado; Inf/inferior; Sup/superior.

Os resultados foram avaliados comparando os valores dos exames referentes ao perfil lipídico entre os pacientes oriundos dos diferentes laboratórios. As frequências obtidas são apresentadas na Tab. II e nas Fig. 1, 2, 3 e 4.

DISCUSSÃO

Laboratório privado × Laboratório público

Comparando as concentrações de CT encontradas nos laboratórios privados e nos laboratórios públicos, podemos destacar que no sexo masculino foram verificadas as maiores diferenças, visto que entre os pacientes do laboratório privado as concentrações estavam concentradas nas faixas referentes aos valores considerados alto (19,7%), limítrofe (32%) e ótimo (26,6%), enquanto nos pacientes dos laboratórios públicos estes

valores apresentam um deslocamento para as concentrações mais baixas, ficando distribuídos em maior proporção nas faixas entre o limítrofe (26,6%), o ótimo (31,6%), e o de valores inferiores a 160 mg/dL (18,8%) (Tab. II e Fig. 1).

A relação entre o CT e o desenvolvimento da aterosclerose vem ressaltar a importância do conhecimento prévio desses valores para o planejamento de uma política de saúde que vise a redução da morbidade e da mortalidade por doenças decorrentes do agravamento da aterosclerose como: doenças coronarianas agudas, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar, entre outras.

Para as concentrações de LDL-COL se observa uma distribuição homogênea dentro do grupo de pacientes atendidos no laboratório privado, como também no caso dos laboratórios públicos, independente do sexo dos pacientes. Nas duas classes de laboratórios praticamente 50% dos pacientes encontravam-se nas faixas entre o desejável e o limítrofe (Tab. II e Fig. 2).

A comparação dos resultados dos pacientes de laboratórios públicos com os obtidos no laboratório privado, indicou o HDL-COL como dado marcadamente divergente. Com destaque para as concentrações baixas nos pacientes dos laboratórios públicos, principalmente para o sexo masculino, onde esses valores alcançaram uma frequência superior a 60%, para os demais grupos de pacientes dessas instituições as concentrações baixas encontravam-se com uma frequência de 34,6% para o sexo feminino e 26% para o sexo ignorado. Quanto aos pacientes do laboratório privado as concentrações de HDL-COL apresentaram a maior frequência na faixa de 40 a 60mg/dL, com destaque para a faixa alta que apresentou a segunda maior frequência, especialmente para o sexo feminino (36,9%) (Tab. II e Fig. 3).

A avaliação destes resultados torna-se importante posto que baixas concentrações de HDL-COL estão

associadas a um significativo aumento no risco de DCV, e altas concentrações de HDL-COL estão associadas à proteção contra DAC (Rader, 1999). Além disso, estudos realizados com indivíduos acometidos de DCV relataram uma frequência de valores baixos de HDL-COL na razão de 17 a 36% (Harper & Jacobson, 1999). Neste sentido, os resultados obtidos com a população atendida pelos laboratórios públicos são preocupantes considerando frequências tão altas quanto 60% para concentrações baixas de HDL-COL.

Entre as causas secundárias da diminuição das concentrações de HDL-COL, pode-se incluir estilos de vida, como: tabagismo, obesidade, sedentarismo, e uma dieta muito pobre em gorduras. Entre as causas patológicas estão *Diabetes melitus* tipo 2, falha renal crônica e condições inflamatórias crônicas como artrite reumatóide. Alguns medicamentos também podem produzir esse efeito, como beta-bloqueadores, diuréticos tiazídicos, progestinas, e probucol. Algumas medidas não-farmacológicas poderiam levar a um aumento nos valores de HDL-COL. Como por exemplo, parar de fumar e perder peso. Embora a dieta comum como adjuvante na terapia, especialmente na perda de peso seja requerida, a redução de gordura na dieta, apesar de geralmente recomendada, não aumentará os níveis de HDL-COL, podendo sim diminuir-los (Rader, 1999).

Os exercícios físicos são limitados na sua capacidade de elevar os níveis de HDL-COL, mas quando acompanhados da perda de peso podem ter um efeito substancial. A reposição de estrógeno geralmente resulta numa modesta elevação da HDL-COL, mas deve ser dada oralmente para ter efeito. O álcool também aumenta os níveis de HDL-COL, porém seu uso não é recomendado. Em pacientes com hipertrigliceridemia, a redução dos valores de TG geralmente está associada a um aumento da HDL-COL (Rader, 1999; Fonarow & Gawlinski, 2000).

Com relação às concentrações de TG pudemos constatar que a faixa classificada como ótima foi o destaque em todos os grupos de todas as instituições, com frequências acima de 55 % (Tab. II e Fig. 4).

A análise dos resultados em conjunto nos permitiu verificar que, embora os valores de HDL-COL para os laboratórios públicos tenham apresentado frequências preferencialmente baixas (60%) sendo, portanto, comprometedoras considerando a diminuição de proteção contra DCV; os valores de CT apresentaram um deslocamento para as concentrações mais baixas, cuja ordem de maior frequência foi respectivamente ótimo, limítrofe e baixo, assim, tendo em vista a predisposição ao desenvolvimento de DCV conferida por altas concentrações de CT, boa parte dos indivíduos (50,4%, soma das frequências de faixas com valores ótimo e baixo de CT) da instituição pública estaria apresentando um fator predisponente a menos para DCV. Nos laboratórios privados as tendências foram invertidas, pois para valores de HDL-COL a faixa de 40 a 60mg/dL

apresentou maior frequência, e foi verificado predomínio de valores altos para CT, atestando contra o fator protetor conferido pelos valores adequados de HDL-COL encontrados. Em ambas instituições a análise dos valores de LDL-COL mostrou maior frequência para as faixas limítrofe e desejável, sendo a faixa limítrofe com maior frequência no laboratório público, assim a análise deste dado concomitante aos valores baixos de HDL-COL implicaria na soma de fatores de risco para os pacientes da instituição pública. Finalizando, mesmo que alguns dos resultados obtidos, quando vistos em conjunto, não indiquem obrigatoriamente risco de doença, é importante ressaltar que valores altos foram encontrados em cerca de 15% dos pacientes para LDL-COL, de 15 a 20% dos pacientes para CT e de 10 a 19% dos pacientes para TG.

O conhecimento das causas de doenças coronarianas e ateroscleróticas é vasto, porém incompleto. Havendo ainda muito que se aprender quanto ao aparecimento de fatores predisponentes a doenças e sua relação para identificação e manejo de indivíduos de alto risco e pacientes com a doença estabilizada, a atenção evidente estabelecida por fatores de risco é suficientemente forte para justificar ações no nível médico e social. Nossos resultados podem servir como estímulo aos profissionais da área da saúde para que a cardiologia seja vista pelo âmbito preventivo, motivando os pacientes no hospital e a comunidade a fazerem mudanças no seu estilo de vida e, se preciso, complementando com o uso de terapias apropriadas a fim de contribuir na prevenção de DAC.

REFERÊNCIAS

1. Brown, W.V. Cholesterol lowering in atherosclerosis. *American Journal of Cardiology*, v. 86, n. suppl, p. 29H-32H, 2000a.
2. _____. The benefit of aggressive lipid lowering. *Atherosclerosis Supplements*, v. 1, p. 15-19, 2000b.
3. Fonarow, G. C. and Gawlinski, A. Rationale and design of the cardiac hospitalization atherosclerosis management program at the University of California Los Angeles. *American Journal of Cardiology*, v. 85, p. 10A-17A, 2000.
4. Gotto Jr, A.M. Management of dyslipidemia. *American Journal of Medicine*, v. 112, n. 8^A, p. 10S-18S, 2002.
5. Grundy, S.M. Cholesterol management in the era of managed care. *American Journal of Cardiology*, v. 8, p. 3A-9A, 2000.
6. Harper, C.R. and Jacobson, T.A. New perspectives on the managements of low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *Archives International Medical*, v. 159, n. 10, p. 1049-1057, 1999.
7. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: out 2002.
8. Martins, I.J.; et al. Interactions between model triacylglycerol-rich lipoproteins and high-density lipoproteins in rat, rabbit and man. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1081, p. 328-338, 1991.
9. Rader, D.J. Pathophysiology and management of low high-density lipoprotein cholesterol. *American Journal of Cardiology*, v. 83, p. 22F-24F, 1999.
10. Santos, R.D.; et al. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemia e Diretrizes de Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 77, n. suplemento III, 2001.
11. Spieker, L.E.; et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation*, v. 105, p. 1399-1402, 2002.
12. Witztum, J.L. and Steinberg, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis. Does it hold for humans? *Trends Cardiovascular Medicine*, v. 11, p. 93-102, 2001.

Atualização cadastral

A SBAC reitera aos sócios e colaboradores que atualizem dados como: endereço, telefone, fax, e-mail, dentre outros, através de fax (0xx21)2204-0245/2264-4449 ou pelo e-mail: geral@sbac.org.br

Análise comparativa de métodos para identificação do *Streptococcus pyogenes* em secreção de orofaringe de escolares em Recife-PE, Brasil

Comparative analysis of methods for identification of *Streptococcus pyogenes* in throat secretion of school children in Recife-PE, Brazil

Amélia Maciel¹; Ana Catarina de Souza Lopes¹; Elizabeth Malagueño²; Gildete Patriota de Andrade¹ & Ivanize da Silva Aca³

RESUMO – Os *Streptococcus pyogenes* b-hemolíticos do Grupo A (SBGA) são de relevante importância clínico-epidemiológica, estando relacionados a patologias importantes. Com objetivo de analisar a prevalência desta infecção em orofaringe de escolares assintomáticos e comparar métodos de diagnóstico do *S. pyogenes*, foi conduzido um estudo clínico-microbiológico. Foram cadastrados 873 escolares em 2 escolas públicas, a análise microbiológica da secreção orofaríngea foi realizada através do cultivo em meio de Ágar sangue de carneiro 5%. SBGA foram identificados através dos testes de bacitracina, Pyr e aglutinação em látex. Dos 873 escolares, foram examinados 753, a faixa etária variou de 5 a 18 anos de idade, sendo 54.3% do sexo masculino e 45.7% do sexo feminino. Foram identificados 6 portadores assintomáticos do SBGA, os quais foram submetidos ao tratamento com penicilina. O diagnóstico microbiológico do *S. pyogenes* realizado demonstrou que o teste de Bacitracina apresentou um índice de concordância Kappa fraco e o Pyr teste regular quando comparados com a técnica aglutinação em látex. Nossos resultados mostram que apenas a utilização de testes presuntivos bacitracina e Pyr teste não propiciam o diagnóstico do SBGA, necessitando da utilização de testes específicos para identificação do sorogrupo dos estreptococos.

PALAVRAS-CHAVE – *Streptococcus pyogenes*, diagnóstico microbiológico e escolares.

SUMMARY – Group A b-hemolytic *Streptococcus pyogenes*, has notable clinical-epidemiological importance, being the etiologic agent of important pathologies. In order to estimate the prevalence of the *S. pyogenes* in throat secretion of students and compare diagnostic methods to identify *S. pyogenes*, was performed a clinical-microbiological study. In two public schools, 873 individuals were selected, although 753 were examined. Throat secretion culture was performed in 5% Blood Sheep Agar and the SBGA strains were identified through bacitracin, Pyr and latex agglutination tests. The school children age varied from 5 to 18 years old, 54.3% of the sample were male and 45.7% female. Six asymptomatic SBGA carriers were identified. In this research the SBGA prevalence was estimated in 0.8%. The *S. pyogenes* bacteriological diagnosis through bacitracin, Pyr and latex agglutination tests for A group showed that bacitracin test had deficient Kappa index of agreement and regular for Pyr test, comparing with latex agglutination. Our results, show that only the utilization of presumptive tests was not sufficient for confirmation of SBGA, thus it is important the utilization of specific tests to identify the streptococci serotype.

KEYWORDS – *Streptococcus pyogenes*, microbiologic diagnostic and school children

INTRODUÇÃO

O climatério refere-se ao período de tempo durante o qual se passa da vida reprodutiva para a vida não reprodutiva²⁶. A menopausa (parada da menstruação) é um marco dentro do climatério sendo de interesse tanto científico como de saúde pública, pois cerca de 95% das mulheres chegam à menopausa nos países desenvolvidos¹⁴. No climatério a mulher sofre modificações regressivas, incluindo fundamentalmente a falta de ovulação e a diminuição na síntese de hormônios esteróides pelo ovário⁵. A principal consequência desta fase é o hipoestrogenismo que vai acentuando-se e favorecendo uma série de complicações clínicas.

O *Streptococcus pyogenes*, β-hemolítico do Grupo A (SBGA), é de relevante importância médica em relação aos grupos B, C e G não somente por ser o agente etiológico das faringites estreptocócicas, mas também pela sua associação com seqüelas pós-estreptocócicas

como a febre reumática aguda (FRA) e a glomerulonefrite difusa aguda (GNDA), pois mesmo com antibioticoterapia efetiva permanece como problema de saúde pública²¹. Está relacionado com uma diversidade de patologias como endocardite, artrite séptica e escarlatina, enquanto os estreptococos β-hemolíticos do Grupo C e G estão relacionados com processos de menor patogenicidade²⁴.

O diagnóstico laboratorial da infecção estreptocócica e suas seqüelas pode ser realizado por métodos bacteriológicos e sorológicos como também por técnicas moleculares. Para a pesquisa do SBGA em secreção de orofaringe, a cultura é realizada em meio de Agar sangue e sua identificação pode ser feita através de provas bioquímicas e sorológicas. Como o tempo pode ser um fator limitante para o método bacteriológico, foram desenvolvidos métodos mais rápidos e específicos como imunofluorescência direta, aglutinação com partículas de látex e Elisa⁷, utilizando anticorpos monoclonais e

Recebido em 9/9/2003
Aprovado em 24/12/2003

¹Profª Drª Adjunta Depto. Medicina Tropical UFPE; ²Profª Drª Adjunta Depto. de Farmácia UFPE; ³Profª Assistente Depto. Medicina Tropical UFPE

policlonais. Testes utilizando sonda de DNA para a detecção direta desta bactéria no "swab" com secreção orofaríngea podem fornecer o diagnóstico etiológico em 15 minutos^{12,19}.

A realização de um estudo clínico-epidemiológico relacionado com a análise microbiológica da secreção orofaríngea em escolares na cidade do Recife, propiciará amostras do SBGA através do isolamento e identificação pelos testes presuntivos de sensibilidade a bacitracina e Pyr comparados com a técnica de aglutinação em látex considerada padrão-ouro.

METODOLOGIA

Segundo dados estatísticos da Secretaria Estadual de Educação de Pernambuco¹⁸ para o ano letivo de 1999-2000, um total de 38.700 alunos na faixa etária de 5 a 16 anos, foram matriculados da pré-alfabetização, alfabetização até a 4ª série do ensino fundamental.

O tamanho da amostra de 739 escolares para o estudo foi estimado do contingente de 38.700, baseado em uma prevalência esperada de 2% com um erro da amostra de 1%, com erro α de 5% e o poder estatístico de 80% (erro β).

Dois escolas da rede pública na cidade do Recife, PE, Brasil, foram selecionadas pela sua proximidade ao campus da Universidade Federal de Pernambuco, com padrões sócio-econômicos similares.

Foram cadastrados 873 crianças e adultos jovens, segundo listas nominais fornecidas pelas escolas, numa faixa etária de cinco a 20 anos. Na escola, Lar Fabiano de Cristo, localizada no bairro da Várzea, foram cadastrados 315 escolares. Na Escola Municipal Engenho do Meio, localizada no bairro do Engenho do Meio, 558 escolares foram cadastradas.

Uma palestra noturna foi realizada para os pais ou responsáveis pelos escolares, abordando os objetivos do trabalho e como seria realizada a coleta da secreção de orofaringe, sendo também solicitado dos mesmos a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foi orientado aos pais ou responsáveis que no dia da coleta da amostra os escolares não ingerissem alimentos ou escovassem os dentes antes da realização da mesma.

A coleta foi realizada com swabs estéreis e os mesmos foram inoculados no meio de Brain Heart Infusion (BHI) para transporte. As amostras faríngeas foram semeadas em Agar Sangue de Carneiro 5% e incubadas a temperatura de 37°C durante 24 horas. Para a identificação das cepas de SBGA, foram selecionadas as colônias com halos de β -hemólise que posteriormente foram inoculadas em BHI para a realização dos testes de sensibilidade a bacitracina (0,04UI), teste de Pyr, baseado na hidrólise da L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide através da enzima L-pyroglutamyl-aminopeptidase e aglutinação em látex para Grupo A (Slaidex-Strepto Kit A), processados e analisados segundo especificações dos fabricantes. As amostras positivas foram testadas quanto a susceptibilidade aos seguintes antimicrobianos: penicilina, ampicilina, cefalosporina, eritromicina, amoxicilina e sulfametoxazol-trimetropin, segundo a metodologia de Kirby-Bauer. Os resultados das culturas foram enviados às escolas, familiares ou responsáveis.

RESULTADOS

Foram examinados 753 escolares, sendo 54,3 % da

amostra do sexo masculino e 45,7% do sexo feminino, cuja idade variou de cinco a 18 anos. O maior número de escolares examinados era da faixa etária de 5 a 9 anos (Tab. I) e a média de idade de toda amostra foi de 9 anos.

Na escola Lar Fabiano de Cristo, sorteada para a primeira fase de coleta que foi realizada em agosto de 1999, das 313 crianças cadastradas 278 se submeteram a coleta e a faixa etária variou de 5 a 13 anos. A faixa etária mais examinada foi de 5 a 9 anos, com média de idade de 7,3 anos, sendo 153 meninos e 125 meninas. Foram identificadas duas crianças SBGA positivas: uma de 11 anos, do sexo masculino e outra de 8 anos, do sexo feminino. A prevalência da infecção na escola Lar Fabiano de Cristo foi de 0,7% entre os analisados.

A segunda escola, Escola Municipal Engenho do Meio, a coleta foi realizada em duas etapas novembro, dezembro de 1999 e maio de 2000, já que na mesma havia um contingente maior de alunos. Na primeira fase da coleta foram examinadas as crianças das terceiras e quartas séries, na segunda etapa a alfabetização, primeira e segundas séries. Foram analisados 475 escolares, sendo 256 do sexo masculino e 219 do sexo feminino, sendo a faixa etária de 6 a 18 anos estudada, com média de idade de 10 anos. Foram identificadas três crianças com 7 anos e uma com 9 com culturas positivas para SBGA, uma prevalência de 0,8% foi estimada na escola.

A prevalência final de SBGA nos escolares, das duas escolas foi estimada em 0,8%. Estratificando a prevalência em relação a idade, observamos que aos 7 anos obtivemos uma prevalência de 2,3% (Tab. I). Anali-

TABELA I
Distribuição dos escolares examinados por idade, número de casos e prevalência de SBGA. Recife, PE, Brasil, 1999/2000

Idade	Nº de escolares cadastrados	Nº de escolares examinados	Nº de casos positivos	Prevalência SBGA
5	74	60	-	-
6	92	74	-	-
7	152	132	3	2,3%
8	134	116	1	0,9%
9	141	124	-	-
10	122	107	1	0,9%
11	68	64	1	1,6%
12	39	36	-	-
13	23	21	-	-
14	12	10	-	-
15	8	6	-	-
16	2	1	-	-
17	3	1	-	-
18	1	-	-	-
19	1	1	-	-
20	1	-	-	-
Total	873	753	6	6 (0,8%)

SBGA = *Streptococcus pyogenes*, β -hemolítico do Grupo

TABELA II
Distribuição das 24 culturas β -hemolíticas correlacionadas com os testes microbiológicos e imunológico para identificação do SBGA

	Bacitracina	Pyr teste	Aglutinação látex
Positivo	23	11	6
Negativo	1	13	18
VPP	26%	35%	-
Índice Kappa	0,00 (sofrível)	0,5 (regular)	-

SBGA = *Streptococcus pyogenes*, β -hemolítico do Grupo A

sando a prevalência por escola uma prevalência 0,7% foi estimada na Escola Lar Fabiano de Cristo e de 0,8% observada na Escola Municipal Engenho do Meio.

Os escolares com cultura positiva para SBGA durante a realização da anamnese, não apresentaram ao exame clínico presença sinais ou sintomas de infecções tais como dor de garganta, febre, edema, hiperemia ou placas purulentas na orofaringe, dor a deglutição e aumento e sensibilidade dos gânglios cervicais ou história pregressa de infecção por SBGA, pela listagem fornecida pela escola e pelos seus familiares, os mesmos pertenciam a classes diferentes, sendo os mesmos tratados com fenoximetilpenicilina (PenVe oral ®), posologia de 50mg kilo/peso, durante 10 dias. Após um mês, foi coletada nova amostra de secreção da orofaringe destes escolares para constatar a cura e ao mesmo tempo foi coletado 1ml de sangue para a dosagem de ASLO pelo método de aglutinação em látex (Labtest diagnóstico) conforme especificação do fabricante. Esta dosagem demonstrou títulos séricos inferiores a 200UT.

Das 24 cepas bacterianas β -hemolíticas obtidas, 23 foram teste bacitracina positivo (halo superior a 10mm), 11 Pyr teste positivo. O teste de aglutinação em látex para confirmar o Grupo A, detectou 6 cepas positivas (Tab. II).

Analisando o índice de concordância Kappa entre os testes bacitracina e Pyr teste com a técnica de aglutinação em látex, o índice "Kappa" entre bacitracina e aglutinação foi de 0,0 sendo considerado fraco, e o Pyr teste e a aglutinação de 0,5 sendo considerado regular¹⁷. O Valor Preditivo Positivo (VPP) dos testes realizados, quando comparado com o padrão ouro aglutinação em látex, observamos um VPP de 26% para a bacitracina de 35% para o Pyr teste.

DISCUSSÃO

Dados epidemiológicos de crianças saudáveis em uma creche na cidade de Araraquara, SP, demonstraram uma prevalência de SBGA de 23,7% entre as crianças examinadas¹⁰. Em outros estudos realizados na Região Sudeste do Brasil, dados epidemiológicos foram discordantes em relação a taxa de prevalência do SBGA, Morya¹⁵ refere uma taxa de 42% em Ribeirão Preto, SP e Pereira¹⁶ de 2,6% na cidade do Rio de Janeiro, ambos são semelhantes ao nosso, analisaram crianças assintomáticas de escolas públicas.

Dados nacionais referentes a crianças com e sem amigdalite de repetição, demonstraram que nas crianças com esta patologia o SBGA era duas vezes mais prevalente do que nas crianças sem a mesma⁹.

Para a análise comparativa de métodos de identificação de SBGA, foram utilizados o teste de sensibilidade

de a bacitracina (0.04 UI), o Pyr teste e o teste de aglutinação em látex, sendo este último o nosso padrão-ouro⁹. O teste de bacitracina, utilizado na rotina como diagnóstico presuntivo é considerado positivo quando apresenta um halo maior que 10mm, podendo ser também positivo em menor porcentagem para estreptococos do Grupo C e G¹⁴.

Trabalhos comparando alguns testes presuntivos como bacitracina, Pyr, camp e hidrólise da bile, para a identificação dos estreptococos, referem que o Pyr demonstrou ser tanto sensível como específico para o grupo A¹³. Weelstod,²⁷ refere que o Pyr teste é específico para os grupos A e enterococos, não identificando os grupos C e G, Chen³, refere como teste presuntivo, o Pyr teste oferece uma sensibilidade de 95%.

No nosso estudo, das 24 colônias com β -hemólise, 11 foram Pyr positivo, destas 5 foram negativas pelo teste de aglutinação. Quando estimamos o VPP, observamos que o teste de bacitracina apresenta um valor preditivo de 26% e o Pyr teste um valor de 35%. Ou seja, estes testes presuntivos utilizados na rotina para o diagnóstico microbiológico do SBGA, têm uma capacidade limitada de identificarem os verdadeiros indivíduos positivos (Tab. II).

O teste de bacitracina e Pyr teste, quando comparados com o teste de aglutinação, apresentam limitações já que após a realização dos mesmos é necessário a realização de outro teste para classificação do sorogrupo do estreptococo. Uma das vantagens do teste de aglutinação em látex é a rapidez da sua execução sem necessitar de equipamentos sofisticados⁹. Uma das suas desvantagens é o custo relativamente alto.

Os testes rápidos de co-aglutinação em látex, ELISA e imunofluorescência que permitem resultados em 10-15 minutos, tem sido exaustivamente analisados em vários trabalhos^{2,25}, sendo a cultura o método que apresenta melhor sensibilidade quando comparada aos mesmos, principalmente em casos de testes rápidos negativos, sendo necessário a realização da mesma⁶.

Entre os vários trabalhos relacionados aos testes rápidos aplicados para o diagnóstico microbiológico do *S. pyogenes*, quando comparado a cultura, estes destacam-se por ser uma ferramenta de fácil aplicabilidade e eficaz principalmente em casos de testes positivos, justificando-se o tratamento das faringites com antimicrobianos^{2,4,5}.

Um estudo realizado no Brasil¹ e outro na França⁴ verificando a sensibilidade do Teste rápido (ELISA) em crianças com faringites, demonstraram que estes testes têm uma sensibilidade de 86% para identificar SBGA, sendo uma desvantagem considerável o preço para utilizá-lo como rotina laboratorial, já que os mesmos não são autorizados pelos planos de saúde.

Em relação ao diagnóstico utilizando sonda de DNA, dados microbiológicos demonstram que esta técnica quando comparada com a cultura, apresenta uma sensibilidade de 88,6%¹⁹.

Uma das preocupações dos médicos que lidam com crianças que possam apresentar faringite por SBGA, é evitar que as mesmas tenham complicações como a FRA. Por outro lado diagnosticar estas patologias baseando-se apenas nos sinais e sintomas clínicos pode ser prejudicial para o paciente²².

Estudo realizado no estado de Virgínia (EUA), demonstrou que em crianças com faringites agudas, o

diagnóstico microbiológico é recomendado, porque apenas o exame físico não distingue com acurácia a etiologia destas patologias²⁸. Fichas clínico-epidemiológicas analisadas em um estudo sobre febre reumática no estado de Maryland (EUA), constatou que 33% dos casos desta patologia foram resultantes de doenças respiratórias agudas mal diagnosticadas como etiologia de SBGA, gerando complicações crônicas¹¹.

Por outro lado, dados mundiais referem que os médicos superestimam o tratamento dos pacientes com faringites por SBGA^{20,23} e o diagnóstico microbiológico utilizando testes presuntivos como o de bacitracina ou Pyr teste, o que propiciará erros no diagnóstico desta patologia, resultando no uso inapropriado de antimicrobianos, gerando a utilização inadequada do tratamento das infecções faringeanas e elevando os custos para a assistência à saúde.

Análise realizada em 13 trabalhos nos Estados Unidos sobre como conduzir clinicamente uma infecção orofaríngea, comparando as seguintes estratégias: primeira, tratamento sem diagnóstico, segunda o teste rápido mais cultura, se o teste for negativo e a terceira apenas cultura, discute que a primeira é a estratégia mais eficiente, porém gera a resistência bacteriana e reações alérgicas em crianças sem infecções por *S. pyogenes*. A segunda é eficaz mas, em testes rápidos negativos o custo financeiro é maior e também em pacientes com complicações não supurativas como FRA, a última tem uma sensibilidade e especificidade de quase 96%²⁶.

A utilização de meios seletivos associado ao uso do teste de bacitracina ou Pyr teste e a classificação do grupo A através da aglutinação em látex, são etapas que devem ser seguidas, mesmo que os resultados sejam processados em 48 horas, evitando o diagnóstico microbiológico errôneo e promovendo assim um tratamento correto com antimicrobianos.

AGRADECIMENTOS

A Pró-Reitoria Acadêmica da Universidade Federal de Pernambuco e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e todo corpo docente e diretoras das escolas envolvidas.

REFERÊNCIAS

1. Berezin, E.N. Jasinowodolinski D., Massarato L.C., Gazzeta R.E., Designe R., Raphaelian T., Mimica I. M., Toporovsky J. Faringite estreptocócica: diagnóstico clínico e laboratorial. *Rev. Paul. Pediatr.* 14(4): 177-179, 1996.
2. Campos, J.M. & Charilaou C.C. Evaluation of detect streptococcus group A and the culture ten minutes kits for detection of Group A streptococcal antigen in oropharyngeal swabs from children. *J. Clin. Microbiol.*, 22 (1): 145-148, 1985.
3. Chen, C.H. Huang L., Lee WH. Presumptive identification of streptococci by pyrrolidonyl-beta-naphthylamide (Pyr test). *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 59(4): 259-264, 1997.
4. Cohen, R. Gouvello A., Larocque F., Bouchert M., Portier H. Utilization of rapid

- diagnostic tests for group A streptococcus and bacteriologic and clinical correlation with angina in general medicine. *Presse Med.*, 27 (23): 1131-1134, 1998.
5. Contessoto S.C., Camara S.M., Aviles M.J., Ojeda J.M., Barcelo I.C. & Sanchez F.R. Rational use of antibiotics in pediatrics: impact of a rapid test for detection of beta-haemolytic group A streptococci in acute pharyngotonsillitis. *An. Esp. Pediatr.* 52 (3): 212-219, 2000.
6. Daly, J. A. Rapid diagnostic tests in microbiology in the 1990's. *Am. J. Clin. Pathol.*, 101 (4 Suppl 1): S22-S26, 1994.
7. Elefant, G.R. Estreptocócias. In: Ferreira, W. & Ávila S. *Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-ímmunes. Correlação clínico-laboratorial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 93-99, 1996.
8. Endo L.H., Carvalho D.S., Sakano E., Baract E.C., Reis M. & Moraes-Oliveira O. Panorama Global de Bacteriologia das Amígdalas Palatinas de Crianças. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*; 64 (3): 553-558, 1988.
9. Facklam, R.R.; Cooksey, R.C. & Wortham, E.C. Evaluation of commercial latex agglutination reagents for Grouping Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 10 (5): 641-646, 1979.
10. Fracanzalza S. & Benchetrit L.C. Distribution of beta-hemolytic streptococci in pharyngeal specimens of normal children, Araraquara, SP, Brazil. *Rev. Microbiol.*; 12 (1) : 154-157, 1981.
11. Gardis, L.; Lilienfeld A & Rodriguez, R. An evaluation of the Maryland rheumatic fever registry. *Public Health Rep.* 84 (2): 333-334, 1969.
12. Gerber, M.A. Comparison of throat cultures and rapid tests for diagnosis streptococcal pharyngitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8 (3): 820-824, 1989.
13. Hussain, Z.; Lannigam, R. & Stoakes, L. A new approach for presumptive identification of clinically important streptococci. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 258 (1): 74-79, 1984.
14. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. & Winn Jr W.C. *Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas colorido*. Editora Médica e Científica, 2001.
15. Moryia, T.M. *Prevalência de portadores sãos em vestíbulo nasal e orofaringe de Streptococcus pyogenes entre escolares de Ribeirão Preto, São Paulo*. Tese de Doutorado. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 1984. 92 p.
16. Pereira JAA, Plotkowiski MCM, Suassuna A, Suassuna I. Faringite estreptocócica em população de escolares do Rio de Janeiro. *Rev Assoc Med Bras* 1982; 28: 45-8.
17. Pereira MG Aferição de eventos. In: *Epidemiologia Teoria e Prática* 4ed. Rio Janeiro Guanabara Koogan, p.365-369, 2000.
18. Pernambuco. Secretaria de Educação. Dados do censo do número de escolares matriculados em escolas públicas da cidade do Recife: 1999-2000. Recife; 2000.
19. Pokorski, J.S., Vetter E.A, Wollan P.C. & Cockerill III F.R. Comparison of Genprobe Group A streptococcus direct test with culture for diagnosis streptococcal pharyngitis. *J. Clin. Microbiol.*, 32 (6): 1440-1443, 1994.
20. Poses, R.M. *al.* The accuracy of experienced physicians' probability estimates for patients with sore throat. *JAMA*, 254 (3): 925-929, 1985.
21. Rosa E.C., Rizzo M.C., Giavina-Bianchi Jr. P.F. Forte W. & Mimica C.N. Imunopatologia da Febre Reumática. *Ciências Médicas.*; 16 (1): 21-30, 1988.
22. Rowe, R.T. & Stone, R.T. Streptococcal pharyngitis in children. *Clin. Pediatric.* 16 (4): 933-935, 1977.
23. Shulman, S.T. Streptococcal pharyngitis: Clinical and epidemiologic factors. *Pediatr. Infect. Dis.*, 8(2): 816-819, 1989.
24. Stanford T. & Shulman S.T. Streptococcal pharyngitis: clinical and epidemiologic factors. *Pediatric Infect. Dis. J.*, 8(11): 816-819, 1989.
25. Yu PK.W. *et al.* Evaluation of testpack streptococcus A for detection of group A streptococci in throat swabs. *Mayo Clin. Proc.*, 63(1): 33-36, 1988.
26. Webb, K.H. Does culture confirmation of high sensitivity rapid streptococcal tests make sense? A medical decision analysis. *Pediatrics* 101 (2): E2. 1998
27. Weelstood, S.A. Rapid cost-effective identification of Group A streptococci and enterococci by pyrrolidonyl-beta-naphthylamide hydrolysis. *J. Clin. Microbiol.* 25(9): 1805-1806. 1987.
28. Woods, W.A; Cater, C.T. & Schlager T.A. Detection of group A streptococci in children with pharyngitis. *Pediatr. Emerg. Care.* 1999, 15(5): 338-340.

Endereço e autor para correspondência

Profª Amélia Maciel
Departamento de Medicina Tropical-UFPE
Av. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária
Fonefax: (0xx81)3271-8528/CEP 50670-420
E-mail: amaciell@ufpe.br
Departamento de Farmácia-UFPE
Av. Artur de Sá, S/N - Cidade Universitária
CEP 50740-521

Museu de Análises Clínicas

A SBAC e o PNCQ estão iniciando a montagem de um museu de equipamentos utilizados a especialidade e convoca os laboratórios participantes e outros interessados que tenham ainda em seu poder equipamentos e utensílios antigos, como ureômetros, aparelhos de Van Slike, colorímetros de Dubosq, etc. a fazer a sua doação para formar esse acervo a ser exibido durante os congressos da SBAC.

Aspectos importantes na determinação do nível de alumínio no sangue de pacientes em tratamento regular de hemodiálise

Aluminium level in serum analysis and its importance in hemodialysis treatment

Denise Bohrer, Sandra M. R. de Oliveira, Denise Bertagnolli, Paulo Cícero do Nascimento, Solange C. G. Pombum & Leandro M. de Carvalho

RESUMO – A elevada toxicidade do alumínio para pacientes com insuficiência renal está muito bem documentada na literatura. A ação tóxica deste elemento é tão elevada que um controle anual dos níveis de alumínio sérico dos pacientes submetidos regularmente ao tratamento de hemodiálise é exigida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Devido a ubiqüidade do alumínio, a análise requer cuidados especiais com relação à contaminação. Neste trabalho são abordados os aspectos mais importantes, desde a coleta até a quantificação do alumínio propriamente dita, para evitar fontes externas de contaminação e conduzir a análise com êxito. Os cuidados necessários tornam-se relevantes devido ao baixo limite que coloca o paciente em risco. Níveis de Al acima de $30\mu\text{g/L}$ já caracterizam intoxicação, e determinam tratamento com agente quelante para redução do nível de Al sérico. Como este tratamento não é isento de efeitos colaterais, é muito importante que resultados confiáveis sejam obtidos na análise do alumínio sérico.

PALAVRAS-CHAVE – Alumínio, hemodiálise, sangue, contaminação

SUMMARY – The elevate toxicity of aluminium for renal insufficiency patients is well documented in the literature. The toxic action of this element is so elevated that an annual control of the serum aluminium level of the patients on regular hemodialysis treatment is required by ANVISA. Due to the ubiquity of aluminium, the analysis demands special cares to avoid contamination. In this work the most important issues related to this analysis, from sample collection till the aluminium quantification itself, are considered in order to carry the analysis successfully. The measures to avoid contamination are relevant because of the low limit that put the patient at risk. Aluminium levels above $30\mu\text{g/L}$ mean intoxication and determine a treatment with a chelating agent to reduce serum aluminium level. As this treatment is not free from side effects, it is very important that reliable results are obtained in the serum aluminium analysis.

KEYWORDS – Aluminium, hemodialysis, blood, contamination

INTRODUÇÃO

No organismo humano existem os chamados elementos-traço essenciais e os não essenciais. São considerados essenciais os elementos que mesmo em baixas concentrações são fundamentais para determinados processos bioquímicos e cuja ausência desencadeia patologias carenciais, sendo exemplos clássicos as anemias ferropriva, devida à deficiência de ferro, e megaloblástica, devida à deficiência de cobalto. Os elementos-traço não essenciais caracterizam-se por estarem presentes no organismo mas não exercer nenhuma função metabólica essencial. Entre os elementos-traço não essenciais está o alumínio (Al).

Normalmente, o Al encontra-se no sangue em concentração inferior a $10\mu\text{g/L}$. A quantidade de Al ingerida diariamente pelo homem através de alimentos, do ar e de medicamentos situa-se entre 10 e 100mg, sendo a maior parte eliminada pela via intestinal¹⁴. A pequena parte que é reabsorvida pelo organismo, cerca de $15\mu\text{g}$, é eliminada pelo sistema urinário. Em pessoas com insuficiência renal crônica (IRC) o funcionamento renal está comprometido e o alumínio, não é elimina-

do. Com a sua permanência no organismo ele deposita-se principalmente nos ossos e cérebro, provocando distúrbios ósseos e neurológicos, conhecidos como Osteodistrofia Dialítica e Demência Dialítica respectivamente^{1,12}. Ainda podem ser observados problemas como anemia microcítica e leve calcificação tecidual.

A fonte primária de alumínio para pacientes em hemodiálise é o fluido de diálise, basicamente a água, devido ao grande volume necessário, cerca de 120 litros três vezes por semana, no tratamento regular de pacientes com IRC.

De acordo com a Comissão de Toxicologia da IU-PAC⁴, fluidos para diálise não devem conter mais do que $15\mu\text{g/L}$ Al. Um limite de $10\mu\text{g/L}$ Al para a água utilizada no preparo dos fluidos é estabelecido pela AAMI³ e pela legislação brasileira¹⁰. Limites tão baixos de contaminação são difíceis de obter e controlar devido a ubiqüidade do alumínio⁴. O alumínio está presente em recipientes tanto de vidro quanto de plástico, tem um largo emprego industrial na confecção dos mais diversos utensílios e é ainda adicionado à água, na forma de sulfato, em estações de tratamento, para purificá-la.

Recebido em 23/9/2003

Aprovado em 22/12/2003

Departamento de Química e Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria

Devido a onipresença do alumínio e o seu elevado caráter tóxico para os pacientes renais, a recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AN-VISA) é de que o Al sérico dos pacientes em tratamento hemodialítico regular seja determinado anualmente. Para aqueles pacientes cujo nível de Al sérico exceder 30µg/L, o tratamento com um agente quelante para o Al é recomendado. Este tratamento implica em um controle dos níveis de Al no sangue durante o tratamento o que exige um controle de pelo menos duas determinações a cada administração do medicamento¹⁸.

A técnica mais adequada para a quantificação de alumínio no sangue é a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite¹³, devido a sua elevada sensibilidade e reduzido manuseio da amostra. A determinação de alumínio sérico, entretanto, não se restringe apenas à quantificação do elemento propriamente dita, mas uma série de variáveis pré-analíticas devem ser consideradas para evitar contaminação e levar à execução da análise com pleno êxito.

Neste trabalho, relacionamos as fontes de contaminação mais significativas, bem como propomos certos procedimentos visando eliminar os riscos de contaminação.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos

Espectrômetro de Absorção Atômica SpectrAA-200, Varian (Melbourne, Austrália), equipado com forno de grafite GTA 100 e amostrador automático AS-40. Câmara de fluxo laminar classe 100, Trox (Curitiba, Brasil), centrífuga Jouan C412 (Saint Herblain, França), forno de microondas doméstico Philco (São Paulo, Brasil), homogeneizador automático Edgard Bühler (Bodelshausen, Alemanha).

Reagentes

Uma solução padrão contendo 1000mg/L Al (Merck, Alemanha) foi utilizada para preparar as soluções analíticas através de adequada diluição. Solução de ácido tricloroacético 1% (m/v) (Merck). Ácido nítrico p.a. (Merck) adicionalmente purificado por destilação em aparelho próprio para destilação de ácidos (Sub-boiling distillation, Berghof, Alemanha).

Precauções com a contaminação

A água utilizada na execução da análise foi destilada, deionizada e adicionalmente purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Apenas material plástico (pipetas, buretas, balões volumétricos, etc.) foi utilizado no preparo das amostras. Este material foi deixado por pelo menos 24h mergulhado em solução etanólica de HNO₃ 10% (v/v), sendo, após este período lavado abundantemente com água purificada.

Todas as etapas do preparo de soluções e manuseio das amostras foram conduzidas dentro da câmara de fluxo laminar classe 100.

Frascos para coleta

Vários frascos comerciais para coleta de sangue foram testados com relação à presença de traços de alumínio. Para isto, os frascos (mostrados na Fig. 2) foram preenchidos com um adequado volume de água purificada,

deixados agitar em um homogeneizador sendo, após 24 e 48h o Al presente na água medido por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS).

Anticoagulantes

Os anticoagulantes mais utilizados para preservação das amostras de sangue foram analisados para determinar o seu teor em Al. Estas, e outras substâncias químicas analisadas estão listadas na Tab. III. Para a análise foram preparadas soluções 0,1% ou 1% (m/v ou v/v) de cada uma das substâncias e o teor de Al destas soluções medido por GF AAS.

Descontaminação da heparina

A heparina foi selecionada como anticoagulante por deixar o Alumínio livre em solução, o que não acontece com o uso de outros anticoagulantes, como o EDTA, citrato de sódio, fluoreto de sódio que complexam o Al. Entretanto, a heparina necessitou ser submetida a um processo de descontaminação antes de ser utilizada como anticoagulante.

A solução de heparina (Liquemine 25 000UI) foi aspirada, com auxílio de uma bomba peristáltica (MS-40 Ismatec, Suíça), através de uma coluna contendo 1500mg de uma resina catiônica (Merck, Lab, 4765) fortemente ácida na forma sódica com uma vazão de 1ml/min. O condicionamento da coluna antes da passagem da heparina foi feito com 50mL de solução 1mol/L NaCl e 50ml de água, até o efluente da coluna apresentar reação negativa para cloreto, teste feito adicionando algumas gotas de solução de nitrato de prata (0,1mol/L) ao efluente. A ausência de turvação indica ausência de íons cloreto.

A capacidade da coluna em reter o Al presente na solução de heparina foi verificada através da quantificação do Al presente em sucessivas alíquotas de 1ml da solução coletadas após percolarem a coluna.

Coleta das amostras e separação do soro ou plasma

Todos os ensaios preliminares foram feitos com um pool de soro coletado no Hospital Universitário de Santa Maria.

Para a coleta do sangue dos pacientes os frascos plásticos de 5mL de capacidade com tampa de rosca externa foram previamente descontaminados e adicionados de 3 gotas da solução de heparina descontaminada. De 2 a 3mL de sangue são suficientes para a análise. O sangue dos pacientes deve ser coletado diretamente da fístula artério-venosa, antes do paciente ser heparinizado, evitando desta forma riscos de contaminação da amostra.

Para as amostras de sangue processadas no mesmo dia da coleta não há necessidade de adição de heparina aos frascos.

A separação do soro ou plasma foi executada em câmara de fluxo laminar classe 100, utilizando apenas material plástico previamente descontaminado. A amostra de sangue foi centrifugada durante 15 minutos a 2400g, para que houvesse a separação do soro ou do plasma.

Desproteíntização

A desproteíntização das amostras de soro ou plasma foi realizada por ação do TCA tendo como coadjuvante

microondas de acordo com Bohrer e Pomblum^{9,7}. Uma solução 1% de TCA é adicionada ao soro ou plasma na proporção de 1:1. Após a homogeneização o frasco é fechado e levado ao forno de microondas por cerca de 10 min seguindo um programa de aquecimento com a aplicação de potências crescentes. Após a precipitação das proteínas a amostra é centrifugada por 15min a 2.400g. O sobrenadante é retirado e levado ao espectrômetro para a quantificação do Al.

Quantificação do alumínio

O programa de temperatura e as condições de funcionamento do AAS estão mostrados na Tab. I.

Da mesma forma que os frascos para a coleta, os copos para colocação das amostras no carrossel do amostrador devem ser descontaminados. A menos que o aparelho se encontre em uma sala limpa, as amostras devem ser colocadas no carrossel a medida em que forem sendo quantificadas. A permanência das amostras no amostrador por um tempo maior do que 20-30 min pode levar a contaminação através da deposição de partículas de pó do ar sobre as amostras, mesmo que o carrossel tenha uma cobertura.

Juntamente com as amostras a solução de TCA 1% diluída 1:1 com água deve ser analisada e o valor de Al encontrado, descontado das amostras.

Certificação do método

Para uma avaliação da eficiência do método proposto, amostras de soro provenientes do Centre de Toxicologie du Québec (Canadá), que fazem parte de um ensaio interlaboratorial para determinação de Al sérico, foram analisadas seguindo todas as etapas do protocolo descrito.

RESULTADOS

A escolha do material adequado para o manuseio das amostras bem como a sua descontaminação são as etapas mais importantes para o sucesso da análise. Vi-

TABELA I

Condições de operação do espectrômetro de absorção atômica

Comprimento de onda (nm) 309,3
 Corrente da lâmpada (mA) 10
 Fenda (nm) 0,5
 Corretor de fundo lâmpada de deutério
 Forno de grafite piroliticamente revestido com plataforma de L'vov e argônio como gás de purga.

Programa de temperatura			
Etapa	Temperatura(°C)	Tempo(s)	Vazão gás(L/min)
1	85	5,0	3,0
2	95	35	3,0
3	120	10	3,0
4	1100	20	3,0
5	1100	10	3,0
6	1100	2,0	0,0
7*	2500	0,7	0,0
8*	2500	1,0	0,0
9	2600	1,0	3,0

*leitura

TABELA II
 Alumínio presente como constituinte ou impureza em diferentes materiais de laboratório utilizados na coleta e análise de amostras de sangue²

Material	Objeto	Al presente (% m/m)
Vidro	Transparente (para medicamentos)	0,59
	Âmbar (para medicamentos)	0,52
	Ampola transparente	2,14
	Ampola âmbar	2,21
	Vacutainer (tampa azul royal)	0,73
	Monoject (tampa lavanda)	1,22
	Venoject (recoberto com silicone)	1,45
Plástico	Ponteira pipeta amarela (100 µL)	0,01
	Ponteira pipeta (1000 µL)	0,01
	Seringa 10 ml	0,03
	Microtainer	0,02
	Copo amostrador AAS	0,01
Borracha	Tampa cinza (para medicamentos)	3,9
	Tampa vermelha (para medicamentos)	5,3
	Tampa azul royal (Vacutainer)	4,6

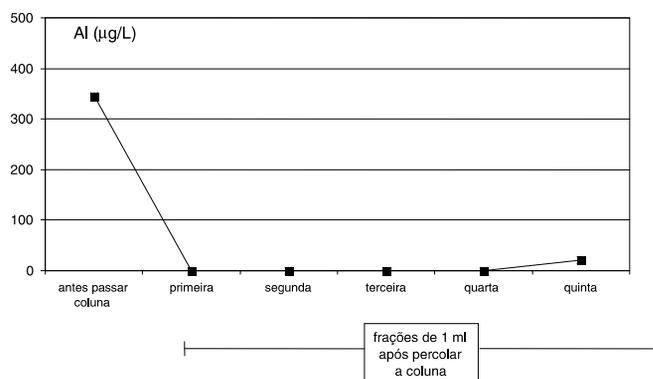


FIG. 1 - Alumínio presente em solução de heparina antes e após descontaminação através de troca dos íons Al por íons Na em uma coluna catiônica.

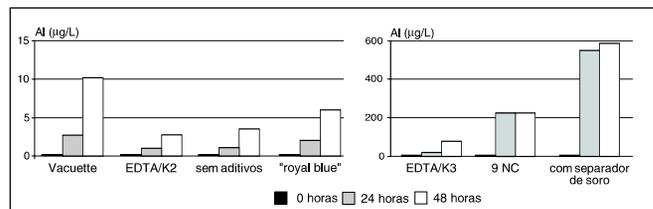


FIG. 2 - Alumínio extraído de frascos comerciais Vacutainer e Vacuette para coleta de sangue por ação de água pura em 24 e 48 horas de contato.

dro e metal são totalmente inadequados, e mesmo o plástico, se não corretamente tratado, poderá acarretar em contaminação das amostras. O vidro contém Al em sua composição, da mesma forma materiais metálicos. Plásticos a princípio deveriam ser isentos de Al, mas o uso de catalisadores contendo este metal para promover a polimerização deixam resíduos de traços de Al nos plásticos, que podem ser lixiviados e assim contaminar as amostras. A Tab. II apresenta os níveis de Al presentes em alguns materiais de laboratório (vidro, plástico, borracha) comumente utilizados no manuseio

TABELA III
Alumínio presente como impureza
em algumas substâncias químicas utilizadas
no pré-tratamento e análise de amostras de sangue

Substância	Marca	Qualidade	Al ($\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/g}$)
Ácido nítrico	Merck	p.a.	$110 \pm 1 \mu\text{g/L}$
Ácido nítrico	Merck	Suprapurâ	$100 \pm 1 \mu\text{g/L}$
Ácido nítrico	Merck	p.a. destilado	$10 \pm 1 \mu\text{g/L}$
Ácido oxálico	Merck	p.a.	$10,49 \pm 0,78 \mu\text{g/L}$
Ácido sulfúrico	Merck	p.a.	$375 \pm 3 \mu\text{g/L}$
Acido cítrico	Merck	p.a.	$3,21 \pm 0,87 \mu\text{g/g}$
Ácido cítrico	Sigma	p.a.	$4,01 \pm 1,65 \mu\text{g/g}$
Ácido tricloroacético	Reagen	p.a.	$40 \pm 2,08 \mu\text{g/g}$
Ácido tricloroacético	Merck	p.a.	$12 \pm 0,50 \mu\text{g/g}$
Tungstato de sódio	Merck	p.a.	$26,5 \pm 1,70 \mu\text{g/g}$
Sulfato de sódio	Reagen	p.a.	$26,5 \pm 3,77 \mu\text{g/g}$
EDTA (sal sódico)	Merck	p.a.	$3,37 \pm 0,70 \mu\text{g/g}$
Heparina bovina (sal sódico)	Sigma	Para fins bioquímicos	$0,0 \mu\text{g/g}$
Heparina de suíno (sal sódico)	Sigma	Para fins bioquímicos	$0,0 \mu\text{g/g}$
Heparina de suíno (sal de amônio)	Sigma	Para fins bioquímicos	$0,0 \mu\text{g/g}$
Heparinas comerciais 5 000 UI/mL	Fujisawa Inc.		$732 \pm 23 \mu\text{g/L}$
	Roche		$783 \pm 51 \mu\text{g/L}$
	Cristália		$72 \pm 6 \mu\text{g/L}$
25 000 UI/mL	Eurofarma		$436 \pm 40 \mu\text{g/L}$
	Roche (lote 1)		$137 \pm 2 \mu\text{g/L}$
	Roche (lote 2)		$168 \pm 3 \mu\text{g/L}$
	Roche (lote 3)		$190 \pm 5 \mu\text{g/L}$

de amostras. Pode-se observar que nenhum dos materiais listados é isento deste metal, mesmo que sejam apenas traços.

A Fig. 2 mostra os níveis de Al encontrados na água que esteve em contato com frascos comerciais utilizados para coleta de sangue. Pode-se verificar que mesmo aqueles, especialmente designados para análise de traços metálicos como o "Royal blue tip" liberam alguma quantidade de Al na água. Estes dados mostram que infelizmente não é possível aproveitar a coleta de sangue realizada como rotina para outros ensaios na determinação do Al. A coleta deve ser feita apenas em frascos especialmente preparados para isto.

Os tempos de armazenamento de 24h e 48h foram escolhidos por ser aproximadamente o tempo necessário para o transporte das amostras até o laboratório, supondo que estas sejam enviadas de clínicas de diferentes localidades. Mesmo que os frascos sejam utilizados apenas para a coleta e logo a seguir o sangue seja transferido, o risco de contaminação na utilização de frascos comerciais é elevado, principalmente considerando o limite de 30mg/L , que coloca o paciente "em risco", e que determina o tratamento com o agente quelante des-

TABELA IV
Alumínio medido em amostras de soro provenientes
de um ensaio interlaboratorial para alumínio sérico,
segundo as etapas pré-analíticas propostas

Amostra	Valor de referência Al ($\mu\text{mol/L}$)	Intervalo aceito Al ($\mu\text{mol/L}$)	Valor encontrado Al ($\mu\text{mol/L}$)
1	0,39	0,07 – 0,71	0,54
2	1,75	1,25 – 2,25	1,75
3	1,05	0,64 – 1,46	1,02
4	2,50	1,90 – 3,10	2,45
5	3,55	2,81 – 4,29	4,04
6	2,85	2,20 – 3,50	2,87

ferrioxamina⁸. Além disto, a transferência do sangue de um recipiente para outro implica em uma etapa adicional desnecessária, e que deve ser evitada.

Na Tab. III estão os níveis de Al encontrados em algumas substâncias utilizadas no pré-tratamento de amostras de sangue e nos agentes anticoagulantes mais comumente utilizados. É possível verificar que a heparina como substância química não apresenta contaminação por Al, mas após processada (na forma de solução e embalada em ampolas de vidro) apresenta uma contaminação muito elevada. Da mesma forma os outros agentes. Mesmo a utilização das substâncias químicas com baixos níveis de Al não é recomendável, pois mesmo que pequena, a contribuição da contaminação por elas apresentada aumenta os níveis medidos no sangue dos pacientes.

Como a aquisição de heparina sólida só é possível através da importação do produto, optou-se por purificar a heparina comercial, visto que esta não necessita ser estéril (podendo portanto ser manuseada) para ser adicionada ao sangue já coletado.

A Fig. 1 mostra os níveis de Al medidos nas frações da solução de heparina que atravessaram a coluna catiônica. É possível verificar que uma coluna contendo 1 500mg é capaz de reter praticamente todo o Al presente em 5ml de heparina comercial que apresentou uma contaminação inicial de 345mg/L . Como a heparina é comercializada na forma sódica e a coluna troca os íons Al por íons Na, não há uma alteração na composição da heparina, apenas a retirada dos íons Al. A mesma coluna pode ser utilizada muitas vezes, desde que seja regenerada, o que pode ser feito seguindo o processo de condicionamento, ou seja, o processo de condicionamento acima descrito, promove também a regeneração da coluna. Ao percolar a coluna, a solução concentrada de NaCl remove os íons Al (retirados da heparina) deixando em seu lugar o equivalente em íons Na.

Como já demonstrado⁷, a desproteinização de amostras de soro ou plasma por métodos tradicionais, leva a uma perda do Al. Provavelmente com precipitação quase instantânea das proteínas pela ação dos ácidos concentrados, TCA 10%, sulfúrico ou tungstíco, há uma co-precipitação do Al, seja por não ter havido tempo para o seu desligamento das proteínas ou por oclusão no interior do precipitado. A recuperação do Al adicionado a uma amostra de soro desproteinizada pela ação do TCA 10% é de apenas 60%. A ação do TCA 1% é efetiva somente quando conjugada com ação das microondas. Neste caso, observa-se uma desproteiniza-

ção tão eficiente quanto a conduzida com o ácido concentrado, mas sem a perda do metal, provavelmente por esta ocorrer de modo gradual durante a ação das microondas.

A desproteinização não é indispensável para o sucesso da análise, entretanto, a análise de amostras desproteinizadas aumenta a vida útil do forno de grafite e evita a formação de resíduos carbonáceos, provenientes da matéria orgânica no interior do forno. A formação destes resíduos, que ocorre a cada 20 ou 40 queimas, exige a interrupção da análise, desmonte do forno e cuidadosa limpeza do mesmo⁹.

Cálculos

Como as amostras são diluídas 1:1 com a adição da solução de TCA para a desproteinização, é necessário calcular a concentração de Al na amostra original. Este cálculo entretanto não pode ser feito apenas multiplicando por dois o valor encontrado. Ao precipitar, as proteínas separam-se do sobrenadante, cada uma das partes obtidas corresponde a uma fração do volume total ocupado anteriormente pelo soro ou plasma (integral). O volume ocupado pelas proteínas corresponde a 30% do volume original, enquanto o sobrenadante a 70%⁹. Como o Al encontra-se apenas no sobrenadante, o fator de multiplicação é 1,7 e não 2.

Na Tab. IV estão os resultados da análise das amostras do ensaio interlaboratorial do Centre de Toxicologie du Québec. Pode observar que os resultados encontrados estão dentro dos limites considerados aceitáveis para o ensaio. Estas amostras já foram recebidas na forma de soro, mas sofreram todas as etapas subsequentes do protocolo proposto para a análise.

CONCLUSÃO

Amostras de sangue para a determinação de Al devem ser manipuladas com extremo cuidado para evitar contaminação por fontes externas. Como o limite de concentração de Al no sangue que coloca o paciente em risco de intoxicação é muito baixo, 30mg/L, a contaminação pode levar a resultados falso positivos, e ao tratamento de pacientes não intoxicados. É muito importante que as pessoas envolvidas na análise, enfer-

meiros responsáveis pela coleta e laboratoristas responsáveis pela análise, estejam plenamente conscientizados da necessidade de seguir todas as etapas do protocolo e de que os riscos de contaminação são reais.

REFERÊNCIAS

1. Alfrey, A.C. Aluminum Intoxication, *New Engl. J. Med.*, volume 310, páginas: 1113-1115, 1984.
2. Anitha, S.; Atwood, D.A.; Bohrer, D.; Conley, B.; Morsch, V. M.; Oshiro, S.; Patocka, J.; Rao, K. S. J.; Schetinger, M. R. C.; Strunecka, A.; Van Der Voet, G.B.; Wolff, F.A. Group 13 Chemistry II Biological aspects of Aluminium. Ed. Springer, volume 104, 2002.
3. Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Hemodialysis Systems. 2nd ed. ansi/aami rd5-1992. Arlington: AAMI, 1993a. American National Standard.
4. Bohrer, D. Alumínio em diálise - Uma visão analítica, *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, volume 19(3), página: 426, 1997.
5. Bohrer, D.; Do Nascimento, P.C.; Binotto, R.; Pomblum, S.G. "Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part I: Salts, glucose, heparin and albumin". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. volume 15, página: 95-101, 2001.
6. Bohrer, D.; Garcia, S.; Gioda, A. O Problema da contaminação na análise de traços de alumínio, *Química Nova*, volume 20(4), página: 407-411, 1997.
7. Bohrer, D.; Do Nascimento, P.C.; Pomblum, S.G.; Deproteinization of Blood Serum by Acid Treatment and Microwave Irradiation for the Determination of Aluminium by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *J. Anal. Atomic Spectr.*, volume 13, página: 1-5, 1998.
8. Daugirdas J.T.; Ing T.S.; *Handbook of dialysis*, 2^a Ed., Little, Brown and Company, Boston, 1994.
9. Pomblum, S.G., Desproteinização de soro sanguíneo por ação conjunta ácido/microondas e por ultrafiltração para a determinação de alumínio por espectrometria de absorção atômica. Dissertação de mestrado, UFSM, 1997.
10. Portaria nº 82 de 03 de janeiro de 2000 do Ministério da Saúde
11. Savory, W.; Berlin, A. "Aluminium Analysis in Biological Fluids" in CEC-IUPAC International Workshop on "The Role of Biological Monitoring in the Prevention of Aluminium Toxicity in Man" Luxembourg 5-7 July 1982. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, volume 20, página: 837-839, 1982.
12. Savory, J.; Wills, M.R. Aluminium and Chronic Renal Failure: Sources, Absorption, Transport and Toxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, volume 27(1), página: 59-106, 1989.
13. Savory, J.; Wills, M. R.; Savory, M. G. et al Critical Appraisal of two Methods for Determining Aluminium in Blood Samples, *Clin. Chem.*, volume. 36(8), página: 1466-1469, 1990.
14. Sorenson, J.R.; Campbell, I.R.; Tepper, L.B.; Lingg, R.D. Aluminium in the Environment and Human Health. *Envir. H. Per.*, volume 8, página: 3-95, 1974.

Endereço para correspondência

Denise Bohrer do Nascimento

Departamento de Química e Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria

Tel/Fax: (0xx55) 220-8870/E-mail: ndenise@quimica.ufsm.br

PREMIAÇÃO PARA O XXXII CBAC/2005

Durante a realização do XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, entre 6 a 10 de junho de 2004, serão sorteados os seguintes prêmios:

1º Prêmio – Pacote completo para o XXXII CBAC (passagem aérea de ida e volta, estadia, inscrição no evento e 2 cursos).

2º Prêmio – Inscrição no evento e 2 cursos, além de estadia.

3º Prêmio – Inscrição no evento e 2 cursos.

4º Prêmio – Inscrição no evento.

5º Prêmio – Um DVD.

Para concorrer, o inscrito no congresso deverá retirar o cupom de participação no estande da SBAC, preenchê-lo e depositar na urna apropriada.

OBS.: Os prêmios não serão cumulativos; portanto, cada participante só poderá concorrer com um único cupom. Os prêmios são intransferíveis e os contemplados terão seus nomes divulgados nos informativos da SBAC.

Avaliação da interferência *in vitro* do extrato seco de berinjela (*Solanum melongena* L.) em testes laboratoriais*

In vitro interference evaluation from dry eggplant extract (*Solanum melongena* L.) in laboratorial tests

E.G. Brietzig¹; M.B. Falkenberg² & S.F.T. Freitas³

RESUMO – Cápsulas com berinjela têm sido usadas para reduzir colesterol. Estudos em animais apontaram significativa redução do colesterol total ou do LDL-colesterol, contudo, em humanos, os resultados não são conclusivos. Dada a presença na berinjela de antocianinas, de comprovada atividade antioxidante, seria possível estes interferirem em determinações laboratoriais. Avaliou-se a interferência *in vitro* nas determinações de glicose, colesterol, triglicerídeos e ácido úrico. Os testes foram realizados com extrato seco de berinjela comercial, adicionado a soro calibrador comercial, em concentrações supratrapêuticas, e depois em concentrações terapêuticas para os analitos que apresentaram interferência significativa na concentração supratrapêutica. Como controles utilizou-se soro puro e adicionado de amido, quercetina ou solvente. No soro com extrato não tratado foram detectadas interferências significativas nas determinações de glicose, triglicerídeos e AST em concentrações supratrapêuticas e para glicose em concentrações terapêuticas. Noutra etapa, testes foram feitos com o conteúdo das cápsulas após simulação de digestão gástrica, também nas duas concentrações. Na concentração supratrapêutica, detectou-se interferência em todos os analitos e na terapêutica apenas para glicose. Alguns controles apresentaram interferências não esperadas. Os resultados sugerem um potencial de interferência analítica para o extrato de comercial de berinjela, sendo necessários estudos adicionais com outras preparações para uma conclusão definitiva.

PALAVRAS-CHAVE – Berinjela, interferência, testes laboratoriais, antioxidantes.

SUMMARY – Eggplant capsules have been used by the population to reduce cholesterol. Studies with animals indicated significant reduction of total cholesterol or LDL cholesterol, however in humans the results are not conclusive. Due to the presence of anthocyanins with confirmed antioxidant activity in the eggplant, interference might be possible in the laboratorial tests. *In vitro* interference has been analysed on glucose, cholesterol, triglycerids and uric acid determinations. The tests have been performed with commercial dry eggplant extract, added to the commercial calibrator serum in supratherapeutic concentrations and after that, in therapeutic concentrations for the analytes that presented significant interference in its supratherapeutic concentration. As a control, pure serum has been used, and then added starch, quercetin or solvent. In the serum with not treated extract, significant interferences have been detected on glucose, triglycerids and AST determinations in supratherapeutic concentrations and to therapeutic concentrations on glucose. In another stage, tests have been performed with the capsules content after a gastric digestion simulation, also in both concentrations. In the supratherapeutic concentration, interference in all analytes has been detected, and in the therapeutic concentration, only on glucose. Some controls showed unexpected interferences. The results suggest an analytic interference potential for the eggplant commercial extract needing additional studies with other preparations for a definitive conclusion.

KEYWORDS – Eggplant, interference, laboratorial tests, antioxidants.

INTRODUÇÃO

O fruto da espécie *Solanum melongena* L., conhecido como berinjela, é largamente consumido no Brasil. Também vem sendo utilizado na medicina popular com finalidade de diminuir o colesterol, embora os estudos de avaliação destes efeitos em humanos tenham sido inconclusivos^{1,2}. A pele da berinjela contém flavonóides sendo o principal, uma antocianina, a nasunina³, cuja potente atividade antioxidante já foi comprovada por diversos estudos^{3,4,5}.

Em princípio, muitos exames laboratoriais são determinações químicas, que dependendo do método empregado, podem sofrer interferência analítica, em maior ou menor grau, de um número bastante grande

de substâncias que, estando presentes no meio reacional junto com a substância de interesse, reagem interferindo na determinação^{6,7,8}.

Interferência analítica pode ser definida como a influência de um fármaco ou de seus metabólitos na análise de um componente em algum dos estágios do processo analítico⁹. Um exemplo clássico deste tipo de interferência é o da vitamina C na reação de Trinder que é hoje um método usual para a determinação de glicose, colesterol, triglicerídeos e ácido úrico¹⁰.

O método de Trinder¹¹ envolve reações de oxidação-redução, ou seja, numa das etapas produz-se peróxido de hidrogênio que, em seguida, oxida um cromógeno formando um composto corado, que pode ser medido espectrofotometricamente, sendo a leitura obtida pro-

Recebido em 08/10/2003

Aprovado em 31/12/2003

¹ Mestranda do curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC/E-mail: elaine.gropp@univille.net; ² Prof^a orientadora do curso de Pós-Graduação em Farmácia/UFSC

³ Professor do Departamento de Saúde Pública da UFSC

porcional ao analito em teste. A interferência da vitamina C nestas reações tem sido explicada por sua atividade antioxidante que pode ser responsável pelo consumo de componentes da reação, como, por exemplo, pela redução do peróxido de hidrogênio antes da sua reação com o cromogênio; ou por reação direta com o produto corado, reduzindo-o a um composto que não absorva cor no visível^{12,13}. O uso de acopladores nesta reação possibilitou uma maior resistência desta aos efeitos interferentes de antioxidantes¹⁴, mas não eliminou o problema, como pode ser visto pelos resultados de estudos de interferência com vitamina C na reação de Trinder, após o advento do uso destes acopladores^{15,16,17}.

Noroozi e col.¹⁸ demonstraram que, em concentrações equimolares, muitos flavonóides apresentam capacidade antioxidante superior a da vitamina C. Não existem estudos sobre a biodisponibilidade dos flavonóides da berinjela, porém diversos trabalhos permitiram concluir que flavonóides, inclusive antocianinas, são absorvidos, metabolizados ou simplesmente excretados inalterados pelo homem^{19,20,21,22,23}. Outros autores comprovaram o aumento da atividade antioxidante do soro de indivíduos após o consumo de alimentos ricos em antocianinas. Os resultados foram similares aos obtidos após a ingestão de vitamina C, usada no estudo para comparação. Assim, concluiu-se que flavonóides alteram a capacidade antioxidante do sangue à semelhança da vitamina C.

Não foram encontrados estudos de avaliação de interferência em exames produzida pelo uso de plantas ricas em antioxidantes. Porém, uma vez que berinjela, sobretudo na forma de extrato seco encapsulado, não costuma ser considerada como alimento pela população em geral, é possível que esta seja consumida pelo paciente durante o período de jejum que deve anteceder a coleta das amostras, vindo a produzir interferência em determinações laboratoriais. Por esta razão, pretendeu-se testar o potencial de interferência do extrato seco de berinjela.

Como não existe protocolo padrão para este tipo de testes com extratos de plantas, estes foram realizados com base num protocolo para fármacos proposto por Galteau & Siest⁷. Este protocolo preconiza que testes de interferência devem ser realizados primeiramente *in vitro* – pois o conhecimento prévio da interferência analítica deve anteceder os estudos dos efeitos biológicos, e com concentrações elevadas da substância em teste (dose tóxica ou supraterapêutica). Segundo este protocolo, quando detectada interferência na concentração supraterapêutica, um experimento de validação deve ser efetuado com a concentração terapêutica do fármaco. Além disso, recomenda que a concentração do analito no “pool” de soro em teste seja próxima ao nível que exigiria uma decisão clínica do médico, ou seja, próxima ou fora dos limites de referência.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada uma marca comercial de cápsulas à base de extrato seco de berinjela (Laboratório Catarinense SA), amido de milho comercial (Quimidrol), padrão de quercetina (Sigma), soros calibradores comerciais, em nível patológico, liofilizados, de origem bovina (Biobrás SA) e reagentes para determinações bioquímicas da marca Biobrás SA. Os testes foram realizados em aparelho de automação Cobas mira plus (Ro-

che Diagnostics) segundo recomendações do fabricante dos reagentes.

A concentração de fenóis totais do extrato seco comercial de berinjela foi determinada segundo método de Singleton & Rossi²⁵.

Foi testado o efeito interferente do extrato seco de berinjela inicialmente em concentrações supraterapêuticas (1ª e 2ª etapas) e após, em concentrações terapêuticas (3ª e 4ª etapas) para os analitos que apresentaram resultados significativos nas primeiras etapas. A 1ª e a 3ª etapa foram realizadas com extrato seco diretamente adicionado ao soro. Já na 2ª e 4ª etapas, o extrato seco foi previamente submetido à simulação *in vitro* do processo de digestão antes de ser adicionado ao soro.

Em todas as etapas foram preparados também alguns controles: a) soro puro (sem adição de substâncias), para obtenção dos valores basais; b) de quercetina, para comparação do efeito interferente de um flavonóide isolado; c) de amido, para investigação do efeito interferente deste que esta presente como excipiente nas cápsulas com extrato seco de berinjela; d) de etanol/salina, a quercetina foi previamente dissolvida em etanol e diluída em salina antes de ser adicionada ao soro (350 ml da solução foram adicionados aos 10ml de soro), este controle teve o objetivo de compensar a diluição da amostra e/ou de monitorar uma eventual interferência do etanol presente na solução de quercetina adicionada ao soro.

Embora a mesma marca de soro calibrador tenha sido utilizada em todas as etapas, não foi possível conseguir o mesmo lote utilizado na primeira para as demais. Isto ocorreu devido a grande quantidade de soro necessária para a diluição dos extratos para a obtenção das concentrações terapêuticas, uma vez que para se garantir a exatidão necessária na pesagem da pequena quantidade de extrato seco a ser acrescentada ao soro, maiores volumes deste foram requeridos. Assim, a 1ª etapa foi realizada com um lote de soro controle (SP1); para as outras três, utilizaram-se outros lotes do soro controle - o mesmo para a 2ª e 3ª etapa (SP2) e um terceiro para a 4ª etapa (SP3).

Para o preparo das amostras, o soro calibrador na 1ª etapa foi fracionado em alíquotas, e adicionado de quercetina (SQ_{st}), extrato seco (SE_{st}) ou amido (SA_{st}), sendo preparados também como controles: um de quercetina (CQ_{st}), soro puro (SP1). Na 2ª etapa, foram testados soro com extrato seco tratado (SET_{st}) e como controle: soro puro (SP2). Já na 3ª etapa, as alíquotas de soro (SP2) foram adicionadas de quercetina (SQ_t), extrato seco (SE_t) ou amido (SA_t), sendo preparados controles de quercetina (CQ_t) e soro puro (SP₂). Para a 4ª etapa, adicionou-se ao soro (SP3) extrato seco tratado (SET_t) e foi utilizado como controle soro puro (SP3).

As concentrações consideradas neste trabalho como “terapêuticas” para a quercetina (52 nM) foram obtidas a partir da literatura²⁶. Considerando, entretanto, a inexistência de estudos farmacocinéticos em relação a extratos de berinjela, tentou-se estimar a partir da dose terapêutica indicada pelo fabricante das cápsulas (640 mg/dose) e considerando-se absorção rápida e total dos componentes e a volemia média de um indivíduo adulto (5 litros), a concentração que se poderia atingir no sangue. Esta concentração foi estimada em 0,128mg/mL e a partir deste valor foram calculadas as quantidades de extrato que seriam adicionadas às amos-

tras de soro para obter concentrações aproximadas àquelas consideradas como terapêuticas. Para as concentrações supraterapêuticas, foi utilizado o fator 10, conforme preconiza Galteau & Siest⁷.

Para a preparação das amostras com dose supraterapêutica das substâncias em teste obteve-se uma concentração final de 12,8mg de extrato seco/10ml de plasma (SE_{st}); e de 1,57 μ g de quercetina/10ml de plasma (SQ_{st}) e, no caso das com dose terapêutica; 1,28 μ g de extrato seco/10ml de plasma (SE_t); e de 0,157 μ g de quercetina/10ml de plasma (SQ_t). As mesmas concentrações do extrato seco foram utilizadas para na preparação do controle com amido.

A preparação do SET_{st} foi baseada na metodologia proposta por Gil-Izquierdo e col²⁷. Foram utilizados 640mg de extrato seco (uma dose) diluídos em 100ml de água. Para mimetizar a digestão ácida (gástrica), o extrato aquoso obtido foi acidificado com ácido clorídrico até pH 2,0 e, em seguida, incubado em banho-maria 37°C com agitação por duas horas. Para mimetizar a digestão básica (intestino delgado), ao extrato aquoso, que permaneceu no banho-maria, nas mesmas condições da etapa anterior, foi adicionado aos poucos (durante 30 minutos), bicarbonato de sódio até alcançar-se o pH 5,0. O extrato alcalinizado foi mantido no banho-maria por mais duas horas. Este extrato foi liofilizado e pesado (170mg), sendo que 17mg foram dissolvidos em 50ml de soro calibrador. O SET_t foi preparado diluindo-se o SET_{st} na proporção de 1:10 com o soro calibrador puro (SP2).

As amostras de soro foram preparadas um dia antes dos testes e refrigeradas até a execução dos mesmos. Aquelas que continham extrato seco ou amido foram previamente centrifugadas por 5 minutos em 4000rpm. Todas as amostras foram transferidas para caçapas de amostra para aparelho de automação Cobas Mira Plus, sendo que foram preparadas 8 caçapas para cada uma das amostras em todas as 4 etapas de testes.

Os testes bioquímicos foram realizados em triplicata em cada uma das caçapas, totalizando 24 testes por amostra, por analito e por etapa. Os analitos dosados por etapa e por amostras foram os seguintes:

a) glicose, colesterol total, ácido úrico e triglicerídeos nas amostras SP1, SE_{st} , SA_{st} , SQ_{st} , CQ_{st} e BA_{st} , na **1ª etapa**;

b) glicose, colesterol total, ácido úrico e triglicerídeos nas amostras SP2 e SET_{st} , na **2ª etapa**;

c) glicose nas amostras SP2, SE_t , SA_t , SQ_t e CQ_t , na **3ª etapa** e;

d) ácido úrico, glicose e triglicerídeos nas amostras SP3 e SET_t , na **4ª etapa**.

Os resultados obtidos em cada uma das etapas foram submetidos à Análise de Variância – ANOVA, com confirmação pelo Teste de Scheffé, em alguns casos, pelo Teste *t* de Student complementado pelo teste de Mann-Whitney.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de fenóis totais obtida para o extrato de berinjela foi de 178,6 μ M. Uma vez confirmada a presença de substâncias fenólicas no extrato seco, os testes de interferência foram realizados.

Na **1ª etapa** de testes a análise da variância foi realizada comparando os vários grupos em relação a cada analito. A maior significância estatística foi obtida para

a **glicose** (Tab.I), sendo que houve diferença significativa entre todos os grupos, com um valor de F correspondente a 343,21 ($p < 0,0001$). Para confirmar a significância, foi realizado o teste de Scheffé (Tab.II), que também apontou significância estatística ($p < 0,01$) entre todos os grupos.

A adição ao soro, tanto de amido (SA), como de extrato seco não tratado (SE) levaram a uma interferência positiva para este analito, sendo que essa interferência foi estatisticamente maior para o extrato seco que para o amido.

Já a adição ao soro de quercetina (SQ) ou da mistura etanol/salina (CQ) provocou uma interferência negativa em relação ao soro puro (SP1). A diferença em relação à concentração determinada de glicose entre o soro adicionado de quercetina e seu controle também foi estatisticamente significativa, sendo a interferência maior para o controle que para a quercetina. Considerando a presença de flavonóides no extrato de berinjela, uma interferência negativa seria esperada já que, conforme a literatura, antioxidantes podem interferir por vários mecanismos em reações de óxido-redução diminuindo a concentração do produto corado (o qual é proporcional à concentração do analito em teste). A interferência positiva encontrada para o extrato seco poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela presença de amido que pode ser hidrolisado pela amilase sérica, levando à formação de glicose como um dos produtos²⁸.

A interferência negativa verificada para a solução de quercetina adicionada ao soro poderia ser explicada pelo seu potencial antioxidante, entretanto a interferência verificada para o controle (CQ) foi maior do que a da quercetina (SQ). Isto indica que a interferência provocada pela mistura etanol/salina (1:25, v/v), usada como veículo para o flavonóide, superou a interferência da quercetina propriamente dita. Para a preparação das amostras SQ e CQ, houve uma pequena diluição da amostra de soro original, já que 10,0 mL de soro foram adicionados de 0,35 mL de solução de quercetina em etanol/salina ou do veículo. A variação percentual no teor de glicose entre SP1 e SQ foi de aproximadamente 3,7% enquanto entre SP1 e CQ foi de 8,5%. O fator de diluição do soro foi de 3,5%, de modo que apenas a diluição da amostra não explicaria o efeito interferente verificado em CQ. Uma possibilidade

TABELA I
Resultados do teste de Análise de Variância, para comparação dos resultados médios de glicose obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Fonte de Variação	S.Q.	G.L.	Q.M.	F.
Entre grupos	12705.77	4	3176.44	343.21 ($p < 0.0001$)
Dentro de grupos	323.93	35	9.255	
Total	13029.7	39		

TABELA II
Comparações individuais pelo teste de Scheffé ($p < 0,01$) para os resultados médios de glicose obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Grupos	Média
Soro c/ extrato seco (SE_{st})	319.3
Soro c/ amido (SA_{st})	310.9
Soro puro (SP1)	293.6
Soro c/ EtOH quercetina (SQ_{st})	283.0
Soro c/ EtOH salina (CQ_{st})	270.5

Obs.: Houve diferença estatística entre todos os grupos.

seria do efeito ser causado pela presença de etanol, que segundo Holme & Peck²⁹ pode reagir com o peróxido de hidrogênio, consumindo-o na produção de acetaldéido e água.

Em relação ao **colesterol**, a análise de variância apresentou menor significância estatística (Tab.III), sendo que na confirmação pelo teste de Scheffé (Tab.IV), encontrou-se equivalência estatística entre os grupos SA, SE, SP1 e CQ, além de equivalência estatística entre os três últimos e SQ. Em outras palavras, apenas o soro adicionado de quercetina (SQ) e o soro adicionado de amido (SA) apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nesse teste.

Em relação ao **ácido úrico**, a análise de variância (Tab.V) indicou diferença entre os grupos, com valor de F igual a 84,64 ($p < 0,0001$). A confirmação pelo teste de Scheffé (Tab.VI) apontou equivalência estatística entre SA e SE, além de equivalência entre SE e SP1. Desta forma, comprovaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de soro patológico SP1 e as amostras adicionadas de amido (SA), quercetina (SQ) e o controle da quercetina (CQ). O soro adicionado de quercetina (SQ) e seu controle CQ também

TABELA III
Resultados do teste de Análise de Variância, para comparação dos resultados médios de colesterol obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Fonte de variação	S.Q.	G.L.	Q.M.	F.
Entre grupos	1093.37	4	273.34	6.00 ($p=0.0009$)
Dentro de grupos	1594.10	35	45.546	
Total	2687.47	39		

TABELA IV
Comparações individuais pelo teste de Scheffé ($p < 0,01$) para os resultados médios de glicose obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Grupos	Média
Soro c/ amido (SA _{st})	252.0
Soro c/ extrato seco (SE _{st})	251.8
Soro puro (SP1)	247.4
Soro c/ EtOH salina (CQ _{st})	242.5
Soro c/ EtOH quercetina (SQ _{st})	238.6

Obs.: As colunas indicam equivalência estatística entre grupos.

TABELA V
Resultados do teste de Análise de Variância, para comparação dos resultados médios de ácido úrico obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Fonte de Variação	S.Q.	G.L.	Q.M.	F.
Entre grupos	4.7759	4	1.194	84.64 ($p < 0.0001$)
Dentro de grupos	0.4937	35	0.00141	
Total	5.2697	39		

TABELA VI
Comparações individuais pelo teste de Scheffé ($p < 0,01$) para os resultados médios de ácido úrico obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Grupos	Média
Soro c/ amido (SA _{st})	13.12
Soro c/ extrato seco (SE _{st})	12.97
Soro puro (SP1)	12.85
Soro c/ EtOH quercetina (SQ _{st})	12.49
Soro c/ EtOH salina (CQ _{st})	12.17

Obs.: As colunas indicam equivalência estatística entre grupos.

foram significativamente diferentes entre si. Neste ensaio, o soro adicionado de extrato (SE) foi o único grupo experimental que não se diferenciou estatisticamente de SP1. Em relação à interferência negativa verificada para a quercetina e a mistura etanol/salina, o efeito da diluição (3,5%) poderia explicar a redução do teor em SQ (2,9% menor que SP1), mas não em CQ (5,6% menor que SP1). Novamente poderíamos supor que o efeito poderia ter sido produzido pelo etanol.

Finalmente, para os **triglicerídeos**, a análise de variância (Tab.VII) também apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo que pelo teste de Scheffé (Tab.VIII) comprovou-se que o soro calibrador patológico (SP1) diferiu significativamente de todos os demais grupos, enquanto para SA e SE, bem como SQ e CQ entre si, verificou-se equivalência estatística.

Na determinação deste analito, tanto a adição de extrato de berinjela, como de amido e de quercetina levaram a interferências estatisticamente significativas. Novamente, as interferências foram positivas para o extrato seco e o amido e negativas para a quercetina e seu controle. Em relação a SP1, a adição de quercetina e etanol/salina apresentaram diminuição na concentração de triglicerídeos da ordem de 4,0 e 4,2% respectivamente, ou seja, um pouco maior que o fator de diluição (3,5%).

Na 2ª etapa, foram testadas amostras de soro adicionadas de extrato tratado (simulação de digestão gástrica e posterior liofilização). A análise estatística dos dados (Tab.IX) foi realizada pelo teste *t* e, no caso do colesterol, complementada pelo teste de Mann-Whitney.

Nessa etapa de testes, as diferenças foram estatisticamente significativas para glicose, colesterol, ácido

TABELA VII
Resultados do teste de Análise de Variância, para comparação dos resultados médios de triglicerídeos obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Fonte de Variação	S.Q.	G.L.	Q.M.	F.
Entre grupos	2805.551	4	701.3878	90.54 ($p < 0.0001$)
Dentro de grupos	271.1256	35	7.7464	
Total	3076.677	39		

TABELA VIII
Comparações individuais pelo teste de Scheffé ($p < 0,01$) para os resultados médios de triglicerídeos obtidos, para os 5 grupos experimentais na 1ª etapa dos testes de interferência

Grupos	Média
Soro c/ amido (SA _{st})	279.24
Soro c/ extrato seco (SE _{st})	279.12
Soro puro (SP1)	271.23
Soro c/ EtOH quercetina (SQ _{st})	260.79
Soro c/ EtOH salina (CQ _{st})	260.21

Obs.: As colunas indicam equivalência estatística entre grupos.

TABELA IX
Comparação dos valores encontrados no teste *t* para os diferentes analitos no soro puro (SP2) e no soro adicionado de extrato de berinjela submetido a tratamento

Analito	Concentração determinada		Valor do teste	p (significância para $p < 0,05$)
	soro tratado	soro (SP2)		
Colesterol	178,75	182,00	2,66	0,0186
Glicose	237,30	213,90	19,34	< 0,0001
Ácido úrico	8,20	8,85	3,59	0,030
Triglicerídeos	201,00	193,50	3,35	0,0047

úrico e triglicerídeos. Para o **colesterol**, pela variabilidade verificada, o programa estatístico utilizado sugeriu confirmação pelo teste de Mann-Whitney, cujo resultado ($U = 12,5$ e $U' = 62,5$) corroborou a significância estatística da diferença entre o soro tratado (SET) e o controle SP2 ($p = 0,0283$). Entretanto, esta diferença não tem significância prática, já que pelo coeficiente de variação analítica para as dosagens de colesterol, só podem ser considerados diferentes resultados com diferença superior a 10%³⁰ e as diferenças verificadas foram inferiores a 2%.

Para a **glicose**, tal como para o extrato não tratado, verificou-se interferência positiva significativa. No tratamento realizado simulando a digestão gástrica, as condições experimentais podem ter propiciado hidrólise ácida do amido, dando como um dos produtos desta hidrólise a glicose. Além disso, a hidrólise do amido pode também ter ocorrido pela ação da amilase sérica²⁸. É possível que um destes mecanismos tenha contribuído para o aumento nas concentrações de glicose que foram detectadas em relação ao soro calibrador SP2.

Para o **ácido úrico** no soro tratado, houve interferência negativa, estatisticamente significativa, enquanto para o extrato não tratado a interferência não foi significativa na confirmação pelo teste de Scheffé. A simulação de digestão gástrica deve ter levado a hidrólise também de outras substâncias, além do amido, de modo que os produtos formados poderiam: a) ter sido responsáveis pela inibição de enzimas (uricase ou peroxidase) envolvidas no doseamento; b) ter reagido com o peróxido de hidrogênio nas condições do ensaio, diminuindo a concentração de quinonimina formada, c) desestabilizar o cromógeno formado. Estas hipóteses são aquelas citadas na literatura como possibilidades mais plausíveis de interferência analítica para o ácido ascórbico em reações envolvendo óxido-redução^{12,13,14,15}. De acordo com Seeram & Nair³¹, antocianidinas (agliconas) têm maior atividade antioxidante que suas respectivas antocianinas (heterosídeos). Assim, se considerarmos a possibilidade da nasunina ter sofrido hidrólise, o que pode ter elevado sua atividade antioxidante, podemos explicar os resultados obtidos. Além disso, estudos, como o de Silva e col.¹⁷ mostram que entre os analitos dosados pela reação de Trinder, o ácido úrico parece ser mais susceptível aos efeitos de interferência de antioxidantes, o que explicaria a não observação desta interferência nos outros analitos.

Para os **triglicerídeos** no soro tratado houve interferência positiva, estatisticamente significativa, da mesma forma que para o extrato não tratado. Em termos percentuais, a interferência foi maior para o extrato tratado (+3,9%) que para o não tratado (+2,9%), entretanto em ambos os casos, a significância clínica destas interferências é irrelevante com base na variação analítica que é de 9%³⁰.

Na **3ª etapa**, avaliou-se a interferência de extrato de berinjela não tratado e quercetina em concentrações correspondentes, aproximadamente, àquelas que seriam encontradas pela ingestão de cápsulas de berinjela na dose indicada pelo fabricante ou alimentos ricos em quercetina.

Na 1ª etapa do teste, em concentrações supraterapêuticas, vários analitos apresentaram interferências estatisticamente significativas, mas em muitos casos, tais interferências analíticas ocorriam também para algum dos controles utilizados (amido ou controle de

quercetina). Assim, não necessariamente essas interferências poderiam ser atribuídas a componentes da berinjela ou à própria quercetina.

Assim sendo, para a 3ª etapa testou-se apenas a potencial interferência do extrato seco não tratado ou da quercetina em "concentração terapêutica" na determinação da **glicose**, já que apenas para este analito a diferença entre o soro com extrato de berinjela não tratado e o soro puro foi superior a do soro com amido com relação ao soro puro.

A análise de variância (Tab.X) destes resultados apontou uma diferença estatística significativa entre os grupos testados, com um valor de $F = 18,30$ ($p < 0,0001$). A comparação dos resultados pelo teste de Scheffé (Tab.XI) confirmou equivalência entre SA e SE, bem como entre os demais grupos.

Assim sendo, para o extrato seco de berinjela (não tratado), em concentração "terapêutica", houve interferência positiva significativa na determinação de glicose, sendo que interferência no mesmo nível foi comprovada também para o amido. Diferença desta ordem poderia ter significância prática, para pacientes cuja glicemia se encontrasse muito próxima aos limites de referência. Também neste caso, é provável que a interferência positiva verificada se deva à hidrólise do amido pela amilase contida na amostra de soro.

Para as amostras de soro adicionadas de quercetina, atingindo concentrações correspondentes àquelas consideradas terapêuticas, a determinação de glicose não apresentou valores diferentes estatisticamente do soro calibrador utilizado (SP2).

Na **4ª etapa**, foram determinados glicose, ácido úrico e triglicerídeos no soro adicionado de extrato de

TABELA X
Resultados do teste de Análise de Variância, para comparação dos resultados médios de glicose obtidos, para os 5 grupos experimentais da 3ª etapa

Fonte de Variação	S.Q.	G.L.	Q.M.	F.
Entre grupos	393,15	4	98,29	18,30 ($p < 0,0001$)
Dentro de grupos	187,93	35	5,37	
Total	581,08	39		

TABELA XI
Comparações individuais pelo teste de Scheffé ($p < 0,05$) para os resultados médios de glicose obtidos, para os 5 grupos experimentais da 3ª etapa

Grupos	Média
Soro c/ amido (SA _i)	221,54
Soro c/ extrato seco (SE _i)	221,04
Soro c/ EtOH salina (CQ _i)	217,08
Soro c/ EtOH quercetina (SQ _i)	214,83
Soro puro (SP ₂)	213,88

Obs.: As colunas indicam equivalência estatística entre grupos.

TABELA XII
Comparação dos valores encontrados no teste *t* para os diferentes analitos no soro puro (SP3) e no soro adicionado de extrato de berinjela submetido a tratamento

Analito	Concentração determinada		Valor do teste	p (significância para $p < 0,05$)
	soro tratado	soro (SP2)		
Glicose	206,29	203,83	2,16	0,036
Ácido úrico	12,28	12,17	1,06	0,294 (NS)
Ácido úrico	8,20	8,85	3,59	0,030
Triglicerídeos	169,08	168,04	1,38	0,174 (NS)

berinjela tratado, em concentrações terapêuticas estimadas, e no soro patológico controle (SP3).

A determinação do colesterol não foi incluída nesta fase uma vez que a interferência analítica detectada em concentrações supratrapêuticas de extrato ($p < 0,05$) não apresentava significância prática. Porém, embora também não apresentasse significância clínica, a interferência verificada para os triglicerídeos foi estatisticamente mais relevante ($p < 0,01$) e então, decidiu-se incluir este analito nesta fase dos testes. A análise estatística dos resultados pelo teste *t* (Tab.XII) não apontou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, exceto para a glicose.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que o extrato seco de berinjela, embora tenha apresentado potencial de interferência analítica significativa em algumas determinações séricas, não se pode afirmar com certeza que este o seja sob o ponto de vista prático. Isto, porque, como vimos, as variações estatisticamente significativas que ocorreram principalmente nas concentrações "supratrapêuticas" estimadas, podem em alguns casos, estar dentro da faixa de variação analítica aceitável para os testes realizados³⁰.

Além disto, observa-se que a maioria dos resultados, mesmo estatisticamente diferentes entre si, não mudariam a atitude do médico com o paciente, uma vez que, do ponto de vista clínico, esses poderiam ser explicados pela variação biológica normal que ocorre nas concentrações das substâncias presentes no sangue. Uma exceção poderia ser na glicose da 3ª etapa, onde a interferência produzida pelo amido (adicionado ao soro em concentração terapêutica estimada) poderia provocar um erro que poderia prejudicar a interpretação de um resultado próximo aos limites de referência.

Porém, uma vez que as concentrações testadas foram apenas estimadas, não se conhecendo de fato os dados relacionados à farmacocinética dos extratos de berinjela, não podemos concluir de forma definitiva em relação ao potencial de interferência de seus componentes. Outro aspecto é o fato de termos utilizado apenas uma única dose, como base de cálculo, para a preparação das amostras acrescentadas de extrato seco, não se levando em consideração a possibilidade de efeitos cumulativos do uso contínuo do produto.

Também, nada pode garantir que as reações de biotransformação, que podem ocorrer *in vivo* nos indivíduos que ingerem extrato seco de berinjela, ou mesmo a fruta *in natura*, não contribuam para o aumento do potencial antioxidante dos componentes destes materiais e, portanto, ampliem a possibilidade de ocorrência de efeitos de interferência em exames.

De qualquer modo, para concluir de forma mais definitiva quanto ao potencial de interferência analítica dos extratos de berinjela, seriam necessários estudos *ex vivo* com amostras de sangue de pacientes após ingestão de uma ou mais doses dos referidos extratos. Seria igualmente interessante testar outros tipos de preparações à base de berinjela, assim como alguns de seus constituintes isoladamente.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Catarinense, à Rede de Farmácias do SESI, à Farmácia Botica do Vale, à Farah Diagnostics, à Biobrás S. A. e ao Hospital Municipal São José de Joinville/SC.

REFERÊNCIAS

1. Kakuda, C. M.; Aoki, L.; Ferrari, M. A.; Lotierzo, P. H.; Caramelli, B. Influence of an eggplant and orange juice on lipids and fibrinogen. *Posters Nutrition/diet (and bioactive components of food)*, n.143, 1997.
2. Guimaráes, P. R.; Galvão, A. M. P.; Batista, C. M.; Azevedo, G. S.; Oliveira, R. D.; Lamounier, R. P.; Freire, N.; Barros, A. M. D.; Sakurai, E.; Oliveira, J. P.; Vieira, E. C.; Alvarez-Leite, J. I. Eggplant (*Solanum melongena*) infusion has a modest and transitory effect on hypercholesterolemic subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 9, p. 1027-1036, 2000.
3. Noda, Y.; Kneyuki, T.; Igarashi, K.; Mori, A.; Packer, L. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicology*, v. 148, p. 119-123, 2000.
4. Igarashi, K.; Yoshida, T.; Suzuki, E. Antioxidative activities of nasunin, isolated from Chouja-nasu (little eggplant, *Solanum melongena* Chouja), and some other anthocyanins were studied by measuring their inhibitory effect on carotene oxidin. induced by the linoleic acid-lipoxygenase system (carotene bleaching method) and on autooxid. of linoleic acid. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, v. 40, p. 138-143, 1993.
5. Sudheesh, S.; Sandhya, C.; Koshy, A. S.; Vijayalakshmi, N. R. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytotherapy Research*, v. 13, n. 5, p. 393-396, 1999.
6. Young, D. S.; Pestaner, L. C.; Gibberman, V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin. Chem.*, v. 21, n. 5, 1D-432 D, 1975.
7. Galteau, M. M.; Siest, G. Drugs effects in clinical chemistry. Part 2, Guidelines for evaluation of analytical interference. IFCC: Document Stage 1, draft 4. *Ann. Biol. Clin.*, n. 42, p. 137-144, 1984.
8. Letellier, G.; Desjarlais, F. Analytical interference of drugs in clinical chemistry: study of twenty drugs on seven different instruments. *Clin. Biochem.*, v. 18, p. 345-351, 1985.
9. Siest, G.; Dawkins, S. J.; Galteau, M. M. Drug effects on clinical laboratory tests. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, v. 1, n. 3, p. 1983.
10. Young, D. S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. 5th ed. Washington: AACC, 2000.
11. Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, v. 6, p. 24-27, 1969.
12. Sharp, P. Interference in glucose oxidase-peroxidase blood glucose methods. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 115-120, 1972.
13. Maguire, G. A.; Price, C. P. Evidence for interference by ascorbate in the measurement of cerebrospinal fluid glucose by a kinetic glucose oxidase/peroxidase procedure. *Clin. Chem.* v. 29, n. 10, p. 1810-1812, 1983.
14. White-Stevens, R. H.; Stover, L. R.; Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. II. Redox-coupled indicator systems. *Clin. Chem.*, v. 28, n. 4, p. 589-595, 1982.
15. Freemantle, J.; Freemantle, M. J.; Badrick, T. Ascorbate interference in common clinical assays performed on three analyzers. *Clin. Chem.*, v. 40, n. 6., p. 950-951, 1994.
16. Pedrazzi, A. H. P.; Rodrigues, E. R.; Zanardo Filho, A. Ação redutora da vitamina C em bioquímica clínica. *RBAC*, v. 30, n. 1, p. 5-6, 1998.
17. Silva, E.; Scharf, E. R.; Martinello, F.; Luca, D. M.; Amorim, G. R.; Corradi, L.; Martins, T. R. Efeito interferente do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos. *RBAC*, v. 31, n. 3, p. 111-115, 1999.
18. Noroozi, M.; Angerson, W. J.; Lean, M. E. J. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, n. 67, p. 1210-1218, 1998.
19. Miyazawa, T.; Nakagawa, K.; Kudo, M.; Muraishi, K.; Someya, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.*, n. 47, p. 1083-1091, 1999.
20. Cao, G.; Muccitelli, H. U.; Sánchez-Moreno, C.; Prior, R. L. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, n. 5, p. 920-926, 2001.
21. Netzel, M.; Strass, G.; Janssen, M.; Bitsch, I.; Bitsch, R. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, v. 20, n. 2, p. 89-95, 2001.
22. Milbury, P. E.; Cao, G.; Prior, R. L.; Blumberg, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanisms of Ageing and Development*, n. 123, p. 997-1006, 2002.
23. Nielsen, S. E.; Freese, R.; Kleemola, P.; Mutanen, M. Flavonoids in human urine as biomarkers for intake of fruits and vegetables. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 11, p. 459-466, 2002.
24. Cao, G.; Russel, R. M.; Lischner, N.; Prior, R. L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.*, n. 128, p. 2383-2390, 1998.
25. Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, n. 16, P. 144-158, 1965.
26. Erlund, I.; Silaste, M. L.; Alfthan, G.; Rantala, M.; Kesäniemi, Y. A.; Aro, A. Plasma concentration of the flavonoids hesperetin, narigenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, n. 9, p. 891-898, 2002.
27. Gil-Izquierdo, A.; Gil, M. I.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, n. 49, p. 1035-1041, 2001.
28. Campbell, M. K. *Bioquímica*. 3ª ed. São Paulo: Artemed, 2001, p. 428-431.
29. Holme, D. J.; Peck, H. *Analytical Biochemistry*. 2th. New York: Logman Scientific Technical, 1993, p. 347.
30. Labtest. Laboratório Clínico: usando controles no laboratório clínico. 3ª ed. Lagoa Santa: labtest diagnóstica, n. 13, 1998, p. 12, 28-31 e 53.
31. Seeram, N. P.; Nair, M. G. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *J. Agric. Food Chem.*, n. 50, p. 5308-5312, 2002.

Método de Papanicolaou em material cérvico-vaginal para a triagem de infecção por *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis**

Papanicolaou method in cervical smears to diagnosis of *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis* and *Chlamydia trachomatis* infections

Andréa Emilia Marques Stinghen¹; Aguinaldo José do Nascimento² & Maria Suely Soares Leonart³

RESUMO – O método de Papanicolaou, utilizado na triagem para a detecção do câncer cervical, pode ser relevante para o diagnóstico das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST). O objetivo deste estudo é verificar se o mesmo é útil para a detecção de alguns agentes etiológicos de DST. Examinou-se a secreção vaginal e o raspado cérvico-vaginal de 223 mulheres atendidas na Unidade de Saúde Jardim Santos Andrade, Curitiba- PR, pelo método de Papanicolaou e por cultura para *Candida sp.*; por exame a fresco para *T. vaginalis* e por imunofluorescência direta para *C. trachomatis*. Para a detecção de *Candida sp.*, o método de Papanicolaou apresentou sensibilidade e especificidade de 23,3% e 96,8%, respectivamente, em relação à cultura, mas apresentou concordância de 86,3% com o método de Gram. A sensibilidade e a especificidade do método de Papanicolaou para o diagnóstico de *T. vaginalis* foram, respectivamente, 60 e 99,5% em relação ao exame a fresco. A presença de inclusões eosinofílicas, usualmente em células metaplásicas, em 3,7% dos esfregaços cervicais, foi critério sugestivo de infecção por *C. trachomatis*, com sensibilidade e especificidade de 37,5 e 100%, respectivamente, em relação à imunofluorescência direta. O método de Papanicolaou foi específico na detecção de infecção pelos agentes estudados, porém limitado quanto à sensibilidade. A análise dos resultados obtidos sugere que o exame de Papanicolaou pode contribuir na detecção de casos de DST.

PALAVRAS-CHAVE – Exame de Papanicolaou; citologia cérvico-vaginal, doenças sexualmente transmissíveis, *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*.

SUMMARY – The Papanicolaou method has been used thoroughly as a screening test for the detection of the cervical cancer and can be an important method for the diagnosis of Sexually Transmitted Diseases (STD). The purpose of this study was to verify if the Papanicolaou can be used for the detection of different STD-transmitted agents. For that, the vaginal discharge and cervical smears of 223 patients in the Community Health Unit Jardim Santos Andrade, in Curitiba, PR, Brazil, were examined by the Papanicolaou method and by culture in Sabourand agar for the diagnosis of *Candida sp.*, by freshly prepared wet mount for *T. vaginalis*, and by direct immunofluorescence assay for *C. trachomatis*. To *Candida sp.* detection the Papanicolaou method found sensibility and specificity in 23.3% and 96.8%, respectively, compared with the culture, but 86.3% with Gram method. The sensibility and specificity figured out for the diagnosis of *T. vaginalis* were, respectively, 60 and 99.5% when related to the wet mount analysed. The presence of eosinophilic inclusions, usually in metaplastic cells in Papanicolaou test, observed in 3.7% of the cervical smears, suggested infection by *C. trachomatis* and sensibility and specificity was 37.5 and 100%, respectively, when compared to the direct immunofluorescence test. The Papanicolaou method seems to be quite specific, but limited to the sensibility. The analysis of results suggests that the Papanicolaou test can contribute to the diagnosis of STD.

KEYWORDS – Papanicolaou test; cervical smear, sexually transmitted diseases, *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*.

INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são processos infecciosos causados por um grupo heterogêneo de agentes, agrupadas devido à significância epidemiológica do contato sexual, embora este não seja necessariamente o único meio de transmissão (Reese e Betts, 1991). Entre as DST consideradas pela OMS como de transmissão essencialmente sexual estão gonorréia, sífilis, cancro mole e linfogranuloma venéreo, e as de freqüente transmissão sexual, donovanose, herpes genital, condiloma acuminado, tricomoníase, candidíase, uretrite não gonocócica, uretrite

e endocervicite causadas por *Chlamydia trachomatis*, hepatite A e B, pitiríase, escabiose, pediculose e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

A colpocitologia pelo método de Papanicolaou é um exame de baixo custo, que pode ser empregado tanto para a pesquisa de malignidade ou de lesões pré-malignas, como para o rastreamento de agentes das DST. O uso de metodologia diagnóstica de rotina em programas de saúde para a pesquisa de agentes microbiológicos causadores de DST não é habitual, sendo o seu tratamento realizado com base em dados clínicos ou, muitas vezes, nem realizado. A indicação diagnóstica de algumas das DST pelo método de Papanicolaou se dá

Recebido em 20/8/2003
Aprovado em 16/12/2003

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

¹Professora Adjunta da Uniandrade – Curitiba, PR; ²Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná

³Professora Titular do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná. msue@ufpr.br

Apoio: UFPR, Prefeitura Municipal de Curitiba e Newprov

pela identificação direta ou por alterações citopáticas provocadas por certos microrganismos, com grau aceitável de sensibilidade e de especificidade, algumas vezes similar, ou mesmo superior a outras metodologias rotineiras (Moraes Filho e Longatto Filho, 2000).

A candidíase é a infecção fúngica mais freqüente do trato genitourinário, ocorrendo em geral em pacientes predispostos a um super crescimento de sua própria microbiota (Moraes Filho e Longatto Filho, 2000; Kowon-Chung e Bennett, 1992). As *Candida* sp. estão amplamente envolvidas em casos de vulvovaginites, que são causadas pela *C. albicans* em aproximadamente 85% dos casos. O restante deve-se principalmente a *Candida glabrata* e, raramente, outras espécies, *C. krusei* e *C. tropicalis* (Van Dick *et al.*, 2000).

O *Trichomonas vaginalis* é um parasita unicelular flagelado, oval ou piriforme, com tamanho médio de 10µm de comprimento por 7µm de largura, que se movimenta através de 3 a 5 flagelos, e cresce em pH 5,5-6,0. A intensidade da tricomoníase está diretamente relacionada às condições fisiológicas do hospedeiro e à microbiota concomitante. Os parasitas se apresentam isolados, mas podem formar colônias em infestações severas ou em pacientes imunodeprimidos (Moraes Filho e Longatto Filho, 2000; Petrin *et al.*, 1998; Consolaro *et al.*, 1999). A incidência anual de tricomoníase é de 170 milhões de casos em todo o mundo, e de 8 milhões nos EUA, com 10 a 50% de casos assintomáticos (Van Der Schee *et al.*, 1999; Petrin *et al.*, 1999). A infestação feminina por *T. vaginalis* está relacionada à diminuição da acidez com predomínio de uma microbiota mista, em geral composta por cocos e *Leptothrix* sp. (Consolaro *et al.*, 1999; Moraes Filho e Longatto Filho, 2000).

A *C. trachomatis* é uma bactéria gram negativa, intracelular obrigatória, que tem sido reconhecida como o mais comum dos patógenos sexualmente transmissíveis. Produz uma grande variedade de manifestações clínicas, dependendo do sorotipo envolvido. (Panuco *et al.*, 2000). Nos EUA, mais de 650.000 casos foram reportados em 1999, 3/4 em pessoas com menos de 25 anos. Em mulheres, a *C. trachomatis* está envolvida em casos de doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica e dor pélvica crônica (Chan *et al.*, 2000; CDC, 2001). Apesar de 50% dos casos serem assintomáticos, pode gerar danos irreparáveis às trompas de Falópio, levando à infertilidade (Paler *et al.*, 2000; Moraes Filho e Longatto Filho, 2000). Várias metodologias têm sido descritas para o diagnóstico da infecção pela *C. trachomatis* e um resultado confiável está diretamente associado a uma coleta representativa da região infectada, no caso de cervicites, a região endocervical.

O presente estudo teve o objetivo de investigar a relevância da Citologia Cérvico-Vaginal pelo método de Papanicolaou para a triagem de algumas DST, incluindo infecções por *Candida* sp, *T. vaginalis* e *C. trachomatis*, em população atendida na Unidade Santos Andrade de Assistência de Saúde Pública da Prefeitura Municipal de Curitiba, PR.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Após consentimento informado, realizou-se a coleta de material cérvico-vaginal de 223 mulheres atendidas para exame preventivo de câncer na Unidade de Saúde Santos Andrade da Prefeitura Municipal de Curitiba, com idades entre 13 e 70 anos, que freqüentavam o serviço de Saúde regularmente, com arquivos de exames anteriores e controle de freqüência realizado pelos agentes de saúde.

Após a colocação de espéculo na paciente, coletou-se secreção de fundo de saco posterior da vagina com swab estéril, confeccionando-se um esfregaço oval e uniforme, no centro de uma lâmina de microscopia e diluindo-se o restante em tubo de ensaio com 2 ml de NaCl 0,85 g/dl, estéril. Após limpeza prévia da endocérvice com uma gaze estéril, coletou-se secreção endocervical pela introdução de um swab alginatado cerca de 1cm no canal endocervical, girando-o delicadamente 8 a 10 vezes, e retirando-o sem tocar a parede vaginal. Para o teste de imunofluorescência direta na pesquisa de *C. trachomatis*, realizou-se um esfregaço fino e homogêneo em lâmina de microscopia própria, fixando-o com metanol, e mantendo-o sob congelamento a -20 °C.

Para exame de Papanicolaou, com o auxílio de uma espátula de Ayre, raspou-se material de fundo de saco vaginal em suas laterais e da junção escamo-colunar (JEC). Em seguida, com o auxílio de uma escova "cito-brush", coletou-se material endocervical, girando-se a escova delicadamente em um ângulo de 360 graus. Depositou-se os materiais obtidos em duas lâminas de microscopia com movimentos longitudinais, delicadamente, procurando não passar duas vezes pelo mesmo lugar. Cobriu-se o esfregaço com 2 gotas de polietilenglicol a 2%.

Realizou-se o exame a fresco para pesquisa de *T. vaginalis* até 90 minutos após a coleta, colocando-se 50ml da secreção vaginal em solução salina entre lâmina e lamínula, observando-se ao microscópio de luz, com aumento de 400X, a presença dos parasitas de forma ovalada ou arredondada, com motilidade variável. Em dias frios, colocou-se o frasco em banho maria a 37°C antes da preparação da lâmina, para aumentar a motilidade dos microrganismos.

Fixou-se o esfregaço de secreção vaginal pelo calor, a 60 °C ou em chama. Procedeu-se a coloração de Gram com: solução de violeta de genciana (1 min), lavagem com água corrente, lugol fraco 0,6% (1 min), nova lavagem e descoloração com álcool-acetona (5 seg ou até que a coloração violeta não desprendesse mais da lâmina), solução de fucsina fenicada (30 seg), lavagem em água corrente e secagem ao ar. No exame ao microscópio de luz (1000X), observou-se elementos leveduriformes de *Candida* sp. gram positivos, sob a forma de pseudo-hifas, com aspecto de filamentos retos ou encurvados, de comprimento variável, geralmente segmentadas como bambú e/ou células leveduriformes de forma ovóide ou arredondada, com 3 a 6mm de diâmetro. Semeou-se a secreção vaginal em solução salina, em meio agár Sabouraud. Observou-se o crescimento de colônias branco-amareladas e opacas a 37°C (Kwon-Chung e K. J.; Bennett).

Na pesquisa de *C. trachomatis* por imunofluorescência direta (IFD) utilizou-se reagentes (Omega Diagnostics, Bio-Rad ou Cellabs), seguindo-se as reco-

mendações de cada fabricante. Descongelou-se as lâminas e cobriu-se com 25 a 30 ml de conjugado fluorescente contendo anticorpo monoclonal murino para *C. trachomatis*, e incubando-as em câmara úmida a 37°C ou TA (15 a 30 min). Retirou-se o excesso de reagente por lavagem em PBS pH 7,4 ou água destilada. Cobriu-se o material com fluido de montagem e lamínula, pesquisando-se, ao microscópio de imunofluorescência (sistema de filtro l 480-490 nm, emissão média de l 510 nm, 400X), a presença de corpos de inclusão clamidiais redondos e de bordos lisos, fluorescentes, de cor verde-maçã brilhante.

Realizou-se a fixação e a coloração de Papanicolaou com reagentes Newprov, de acordo com as recomendações do fabricante. Montou-se as lâminas com Entellan e lamínulas 25X 60 mm. Realizou-se o escrutínio das lâminas ao microscópio de luz sob aumento de 100X e 400X.

Os critérios de análise do esfregaço para cada microrganismo estudado foram:

Candida sp: observou-se pseudo-hifas e células leveduriformes de coloração rósea, refringentes, geralmente circundadas por halo claro, isoladas ou em pequenos grupos, na periferia das células ou em acúmulos junto aos leucócitos e a detritos celulares (Kowon-Chung e Bennett, 1992).

T. vaginalis: observou-se a presença de estruturas ovais, redondas, piriformes ou irregulares, de 10 a 30 mm de diâmetro, com citoplasma geralmente cianofílico, cinza-azulado ou esverdeado pálido ou arroxeadado, apresentando grânulos citoplasmáticos eosinofílicos, núcleo excêntrico, pequeno, pouco definido, finamente vesiculoso, pálido e de aparência degenerada, flagelos geralmente mal conservados, confundíveis com muco, células degeneradas, neutrófilos ou pedaços de citoplasma (Moraes Filho e Longatto Filho, 2000).

C. trachomatis: observou-se a presença de fina vacuolização intracitoplasmática, com vacúolos únicos ou múltiplos, contendo inclusões eosinofílicas, freqüentemente uniformes, moldadas ou sobrepostas com bordos ondulados, e circundadas por uma área clara. Geralmente, tais inclusões são vistas em células metaplásicas pavimentosas e em células colunares endocervicais, podendo conferir às células um aspecto rarefeito (mordedura de traça) (Gupta *et al.*, 1979).

Utilizou-se o método estatístico de acurácia, com os testes de sensibilidade, especificidade, e taxas de erro falso positivo e falso negativo para analisar a relação entre os resultados obtidos com o método de Papanicolaou e com os métodos considerados padrões. Utilizou-se os testes de concordância e razão do teste kappa para analisar os índices de positividade para comparação entre dois métodos diagnósticos equivalentes. Calculou-se a porcentagem global de concordância e o índice kappa (Jekel *et al.*, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os casos positivos de infecção por *Candida sp.* estão ilustrados nas Fig. 1 e 2, de infecção por *T. vaginalis*, na Fig. 3 e, por *C. trachomatis*, na Fig. 4.

Para a pesquisa de *Candida sp.*, 220 pacientes foram incluídas no estudo, obtendo-se 30 (13,6%) culturas positivas e 190 (86,4%) culturas negativas. Pelo método de Gram, 14 (6,4%) foram positivas e 206 (93,6%), ne-

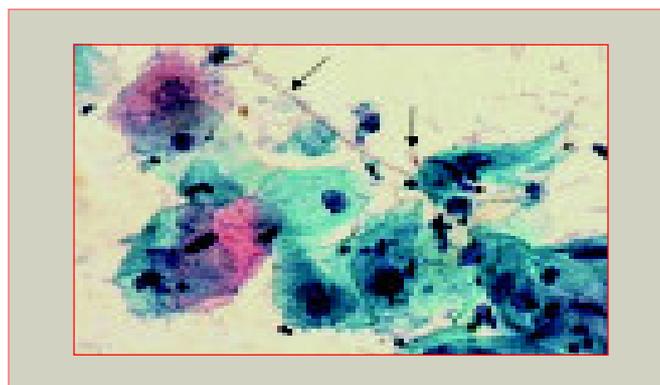


FIG. 1 - Fotomicrografia de esfregaço cérvico-vaginal. Coloração de Papanicolaou. Aumento de 400x. *Candida spp.*, células leveduriformes e pseudo-hifas.

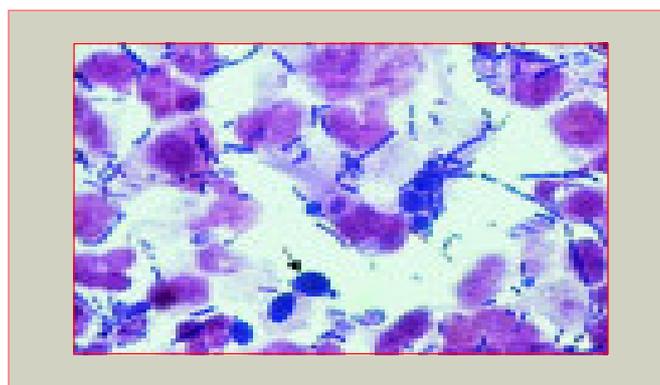


FIG. 2 - Fotomicrografia de esfregaço vaginal. Coloração de Gram. Aumento de 1000x. *Candida spp.*, células leveduriformes e *Lactobacillus sp.*

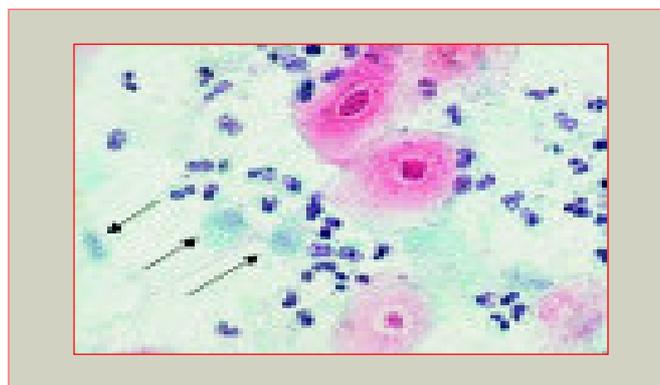


FIG. 3 - Fotomicrografia de esfregaço cérvico-vaginal. Coloração de Papanicolaou. Aumento de 400x. *Trichomonas vaginalis*.

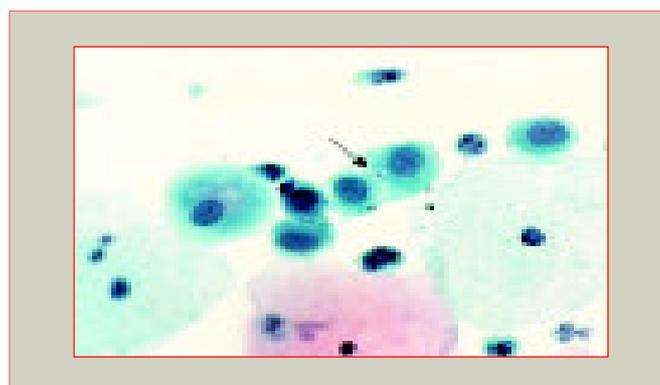


FIG. 4 - Fotomicrografia de esfregaço cérvico-vaginal. Coloração de Papanicolaou. Aumento de 400x. *Chlamydia trachomatis*.

TABELA I
Resultados positivos e negativos na comparação entre o Método de Papanicolaou e a pesquisa de *Candida sp.*, *T. vaginalis* e *C. trachomatis*

Resultado	CA	Tv	CT
VN	184	214	211
VP	7	3	3
FN	23	2	5
FP	6	1	0
Total	220	220	219

CA- *Candida spp.*; Tv- *T. vaginalis*, CT- *C. Trachomatis*; VN-valor negativo; VP-valor-positivo; FN-falso negativo; FP falso-positivo.

TABELA II
Sensibilidade, especificidade, taxas de erros positivos e negativos para comparação do Método de Papanicolaou e pesquisa de *Candida spp.*, *T. vaginalis* e *C. trachomatis*

Índices	CA (%)	Tv (%)	CT (%)
Sensibilidade	23,3	60	37,5
Especificidade	96,8	99,5	100
Prevalência	13,6	2,3	3,7
Taxa de erro falso positivo	3,2	0,5	0
Taxa de erro falso negativo	76,7	40	62,5

CA- *Candida sp.*; Tv- *T. vaginalis*,

TABELA III
Análise de concordância para comparação entre o Método de Papanicolaou e os Métodos de Gram e a fresco para a pesquisa de *Candida spp.* e *T. vaginalis*, respectivamente

Resultado	CA	Tv
Concordância positiva/positiva	11	5
Discordância negativa/positiva	2	0
Discordância positiva/negativa	3	2
Concordância negativa/negativa	203	213
Total	219	220

CA- *Candida spp.*; Tv- *T. vaginalis* CA - Percentagem global de concordância - 97,7%; kappa, 80,3% Tv - Percentagem global de concordância, 99,1%; kappa, 82,5%

gativas. O método de Papanicolaou apontou 13 (5,9%) amostras positivas e 207 (94,1%) negativas. Para a pesquisa de *T. vaginalis*, das 223 pacientes, 220 foram incluídas na pesquisa, sendo que pelo método a fresco, 5 amostras (2,3%) foram positivas e 215 (97,7%), negativas e; pelo método de Papanicolaou, 4 (1,8%), positivas e 216 (98,2%), negativas. Para a pesquisa de *C. trachomatis*, 219 pacientes foram incluídas, com 8 amostras (3,6%) positivas e 211 (96,3%) negativas por IFD; e com 3 (1,4%) positivas e 216 (98,7%) negativas pelo método de Papanicolaou. Os resultados positivos e negativos para a pesquisa de *Candida sp.*, *T. vaginalis* e *C. trachomatis*, comparados com o método de Papanicolaou estão descritos na Tab. I.

Os dados apresentados na Tab. II mostram a análise comparativa entre o método de Papanicolaou e os métodos utilizados para pesquisa de *Candida sp.*, *T. vaginalis* e *C. trachomatis*. Para uma prevalência de 13,6% de candidíase, o método de Papanicolaou, comparado com a cultura para diagnóstico de *Candida sp.*, apresentou sensibilidade de 23% e especificidade de 97%, com taxa de erro falso positivo de 3,2%, e taxa de erro falso negativo de 76,7% (Tab. II). No caso de infecção por *T. vaginalis*, a prevalência foi de 2,3%, com sensibilidade de 60%, especificidade de 99,5%, taxa de erro falso positivo de 0,5% e taxa de erro falso negativo de 40%, para o método de Papanicolaou em relação ao exame a fresco. A prevalência de *C. trachomatis* foi de 3,7%, com sensibilidade de 37,5%, especificidade de 100%, taxa de erro falso positivo zero e taxa de erro falso negativo de 62,5% para o método de Papanicolaou, quando comparado à IFD (Tab. II).

Na comparação entre o método de Papanicolaou e os métodos de Gram, para o diagnóstico de *Candida sp.*, observou-se uma porcentagem global de concordância de 97,7%, com um índice kappa de 80,3%; e, entre o método de Papanicolaou e a fresco, para o diagnóstico de *T. vaginalis*, a porcentagem global de concordância foi de 99,1%, e o índice kappa encontrado foi de 82,5% (Tab. III).

A baixa sensibilidade observada para o método de Papanicolaou na identificação de *Candida sp.* é devida à detecção de concentrações muito baixas de organismos viáveis no material de cultura, método considerado padrão para o diagnóstico. Porém, cabe ressaltar que nem sempre uma cultura positiva indica infecção, levando-se em consideração que este microrganismo está presente em 50% das mulheres com microbiota vaginal

normal, e que a presença apenas de células leveduriformes não é confirmatória de infecção (Moraes Filho e Longatto Filho, 2000). Ao se analisar dados obtidos em alguns estudos anteriores, sobre a prevalência de infecção por *Candida sp.*, que foram de 6,1% em Curitiba (Moraes Filho, em 1994),

41,8% em gestantes, em Brejo-CE (Lucena *et al.*, 1999), e 3,05%, na Eslovênia (Takac, 1998), pode-se observar uma grande variabilidade que, possivelmente, se deve a diferenças entre as populações estudadas, mas também poderia ser atribuída a variações na metodologia de coleta, forma de escrutínio dos esfregaços e critérios morfológicos para a identificação dos organismos fúngicos.

A prevalência do *T. vaginalis* descrita na literatura é bastante variável: Tafuri e Raso, 1991; 3,4% a 14,8%; Alvarenga *et al.*, 1998; 8,7%; Lucena *et al.*, 1999; 5,4%; Franklin e Monif, 2000; 12,6%; Sardana *et al.*, 1994; 5,1%, e Moraes Filho, 1994; 4,2%.

A citologia pelo método de Papanicolaou para o diagnóstico de *T. vaginalis* mostrou-se altamente específica (99,5%). A sensibilidade observada, de 60%, foi concordante com a relatada por Ohlemeyer *et al.* (1998), em adolescentes de St. Louis e Kansas, EUA, de 56%.

A prevalência de *C. trachomatis* na população estudada foi de 3,7%. Estudos demonstram que a prevalência deste microrganismo na população varia conforme os diferentes níveis sócio-econômicos (Raddi *et al.*, 1992; Edelman *et al.*, 2000; 2 a 23%; Passos *et al.*, 1994; 4%; Quinn *et al.*, 1987, 21% e 18,5%; Masatoshi *et al.*, 2000; 20 a 30%; Maeda *et al.*, 1991; 35,7%).

No presente estudo, os efeitos citopáticos sugestivos de infecção por *C. trachomatis* foram identificados em 1,4% das pacientes pelo método de Papanicolaou, e em 3,7%, por IFD. Forster *et al.*, (1985) identificaram *C. tra-*

TABELA IV
Porcentagem global de concordância entre os observadores a e b e a observadora AEMS, em relação à identificação de microrganismos, e/ou seus efeitos citopáticos, na revisão de 99 lâminas de material cérvico-vaginal

Microrganismos	Observadores	
	A	B
<i>Candida spp.</i>	91,8	92,9
<i>G. vaginalis</i>	88,7	90,9
<i>Mobiluncus spp.</i>	96,9	96,0
<i>Trichomonas vaginalis</i>	99,0	98,0
HPV	96,9	99,0
<i>Gardnerella/Mobiluncus</i>	97,9	99,0

chomatis em 37% de suas amostras por IFD e, em 13%, pelo método de Papanicolaou. Geerling *et al.* (1985), detectaram inclusões clamidiais em 10% dos esfregaços citológicos em uma primeira leitura e, após revisão das lâminas, com conhecimento dos resultados de cultura positivos, observaram-nos em 23% dos mesmos. Campos *et al.* (1986), identificaram alterações citológicas sugestivas de infecção em apenas 0,16% dos esfregaços cervicais. Maeda *et al.* (1987) identificaram inclusões clamidiais em 46% dos esfregaços corados por Papanicolaou e, em 66% dos casos por IFD, em amostras de pacientes para realização do exame preventivo. Cavaliere *et al.* (1989) obtiveram 9,3% de amostras positivas no exame citológico e 20,4%, por IFD. Panúco *et al.* (2000) identificaram *C. trachomatis* em 3,2% dos esfregaços.

É importante que os citologistas estejam devidamente treinados para observar não somente os processos pré-malignos e malignos do epitélio cérvico-vaginal, mas também a presença de microrganismos ou de seus efeitos citopáticos que possam levar a diferentes estados mórbidos, ou mesmo contribuir potencialmente para o desenvolvimento de doenças malignas. O método de Papanicolaou está sendo gradativamente incorporado à rotina da saúde pública brasileira e pode contribuir de forma substancial para o diagnóstico das DST.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que, como método de triagem para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp.* e *Chlamydia trachomatis*, o método de Papanicolaou apresentou elevada especificidade, apesar de ser limitado em relação à sua sensibilidade. Estudos adicionais devem ser realizados, procurando-se aprimorar os critérios citológicos utilizados e testando-se um maior número de casos. Os resultados obtidos sugerem que o exame de Papanicolaou pode contribuir na detecção de casos de DST na população feminina.

AGRADECIMENTOS

A Prefeitura Municipal de Curitiba, à equipe da Unidade de Saúde Jardim Santos Andrade e às pacientes que participaram deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Alvarenga, V. L. S.; Santiago, M. C. T. P.; Cicarelli, R. M. B. *Trichomonas vaginalis*: A comparative analysis of diagnostic methods. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 67-76, 1998.
- Campos, E. P.; Maeda, M. Y. S.; Shih, L. W. S.; Pacheco, G. R.; Alves, V. A. F. Rastreamento de alterações morfológicas atribuíveis a clamídias em 30.000 amostras de esfregaços vaginais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 46, n. 1/2, p. 59-64, 1986.
- Cavaliere, M. J.; Shih, L. W. S.; Yamamoto, L. S. U.; Maeda, M. Y. S.; Costa, L. M.; Santos, S. I. S. *Chlamydia trachomatis*: importância da colheita endocervical no diagnóstico pelo método de Papanicolaou. *Revista Paulista de Medicina*, São Paulo, v. 107, n. 1, p. 25-28, 1989.
- Cdc-Centers for Disease Control and Prevention National Center for HIV, STD and TB Prevention. Division of Sexually Transmitted Diseases. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nchstp/dstd/dstdp.html>> acesso em: 23 abril 2002.
- Chan, E. L.; Brandt, K.; Stoneham, H.; Antonishyn, N.; Horsman, G. B. Comparison of the effectiveness of polymerase chain reaction and enzyme immunoassay in detecting *Chlamydia trachomatis* in different female genitourinary specimens. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, Chicago, v. 124, 2000.
- Consolaro, M. E. L.; Suzuki, L. E.; Marques, E. B. A. Estudo da tricomoníase e sua abordagem no diagnóstico colpocitológico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 25-28, 1999.
- Edelman, M.; Fox, A.; Alderman, E.; Neal, W.; Shapiro, A.; Silver, E. J.; Spigland,

- I.; Suhrland, M. J. Cervical Papanicolaou smear abnormalities and *Chlamydia trachomatis* in sexually active adolescent females. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, Philadelphia, v. 13, p. 65-69, 2000.
- Forster, G. E.; Cooney, I.; Munday, P. E.; Richman, P. I.; Jha, R.; Coleman, D.; Thomas, B. J.; Hawkins, D. A.; Evans, R. T.; Taylor-Robinson, D. Investigation into the value of Papanicolaou stained cervical smears for the diagnosis of chlamydial cervical infection. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 38, p. 403-408, 1985.
- Franklin, T. L.; Monif, G. R. G. *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis. Coexistence in vaginal wet mount preparations from pregnant women. *The Journal of Reproductive Medicine*, St. Louis, v. 45, n. 2, 2000.
- Geerling, S.; Nettum, J. A.; Lindner, L. E.; Miller, S. L.; Dutton, L.; Wechter, S. Sensitivity and specificity of the Papanicolaou-stained cervical smears in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *Acta Cytologica*, St. Louis, v. 29, n. 5, p. 671-675, 1985.
- Gupta, P. K.; Lee, E. F.; Erozan, Y. S.; Frost, J. K.; Geddes, S. T.; Donovan, P. A. Cytologic investigations in *Chlamydia* infection. *Acta Cytologica*, St. Louis, v. 23, n. 4, p. 315-320, 1979.
- Kwon-Chung, K. J.; Bennett, J. E. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
- Jekel, J. F.; Elmore, J. G.; Katz, D. *Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva*. Porto Alegre: Limed, 1999.
- Lucena, A. L. M.; Barbosa, R. C. C. Incidência de *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* e fungos, em secreções vaginais de mulheres grávidas. *News-lab*, São Paulo, n. 44, p. 208-214, 1999.
- Maeda, M. Y. S.; Cavaliere, M. J.; Shih, L. W. S.; Yamamoto, L. S. U. *Chlamydia trachomatis* em esfregaços cervicais e vaginais: importância do método de Papanicolaou no rastreamento em grandes populações. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 47, n. 1/2, p. 45-50, 1987.
- Maeda, M. Y. S.; Longatto Filho, A.; Santos, D. R.; Cavaliere, M. J.; Shih, L. W. S.; Oyafuso, M. S.; Andrea Filho, A. D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* cervical infection: a comparison of Papanicolaou and immunofluorescent staining in smears obtained by Aire's spatula and citobrush. *Pathologica*, Genova, v. 83, p. 105-109, 1991.
- Masatoshi, T.; Hiroshi, N.; Kazuyuki, S.; Masashi, H.; Hiroshi, Y.; Tishikatsu, A.; Kohei, A.; Seiji, N. Evaluation of a new enzyme immunoassay (EIA) for the detection of *Chlamydia trachomatis* in male urine, female endocervical swab, and patient obtained vaginal swab specimens. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 55, n. 5, p. 350-354, 2000.
- Moraes Filho, A. Diagnóstico citológico de agentes microbiológicos e doenças sexualmente transmissíveis em programa de massa. In: *Xiv Congresso Brasileiro de Citopatologia*, 1994, Recife. *Relação de trabalhos*, Recife, 1994.
- Moraes Filho, A.; Longatto Filho, A. *Colo Uterino & Vagina*. Processos inflamatórios. Aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- Ohlemeyer, C. L.; Hornberger, L. L.; Lynch, D. A.; Swierkosz, E. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in adolescent females: In Pouch TV® culture versus wet-mount microscopy. *Journal of Adolescent Health*, New York, v. 22, n. 3, p. 205-208, 1998.
- Paler, R. J.; Simpson, D. R.; Kaye, A. M.; Gunn, S.; Felix, J. C. The relationship of inflammation in the Papanicolaou smear to *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk population. *Contraception*, New York, v. 61, p. 231-234, 2000.
- Panico, C. A. B.; Rodríguez, I. D.; Méndez, J. T. H.; Guzmán, L. A. M.; Fierro, D. A.; Murillo, J. M.; Maldonado, E. R. Detection of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women by the Papanicolaou technique, enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. *Acta Cytologica*, St. Louis, v. 44, n. 2, p. 114-123, 2000.
- Passos, E. P.; Focchi, J.; Cunha Filho, J. S. L.; Barcellos, S.; Goldim, J. R.; Vessermann, J. Incidência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres assintomáticas promíscuas e não-promíscuas. *Jornal Brasileiro de Ginecologia*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1-2, p. 7-9, 1994.
- Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R.; Garber, G. *Clinical and Microbiological Aspects of Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.
- Quinn, T. C.; Gupta, P. K.; Burkman, R. T.; Kappus, E. W.; Barbacci, M.; Spence, M. R. Detection of *Chlamydia trachomatis* cervical infection: a comparison of papanicolaou and immunofluorescent staining with cell culture. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, St. Louis, v. 157, n. 2, p. 394-399, 1987.
- Raddi, M. S.; Vidal, A. F. L.; Lorencetti, N. C.; Santana, D. M. Avaliação do exame bacterioscópico do material cervical em pacientes portadoras de *Chlamydia trachomatis*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 54-56, 1992.
- Reese, R. E.; Betts, R. F. A practical approach to infectious diseases. Boston: Little, Brown and Company, 1991.
- Sardana, S.; Sodhani, P.; Agarwal, S. S.; Sehgal, A.; Roy, M.; Singh, V.; Bhatnagar, P.; Murthy, N. S. Epidemiologic analysis of *Trichomonas vaginalis* infection in inflammatory smears. *Acta Cytologica*, St. Louis, v. 38, n. 5, p. 693-697, 1994.
- Tafuri, W. L.; Raso, P. Ocorrência de *Trichomonas vaginalis* em 100.000 exames citopatológicos cérvico-vaginais diagnosticados entre os anos de 1984 a 1989, em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Jornal Brasileiro de Ginecologia*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 11-12, 1991.
- Takac, I. The frequency of bacterial and yeast infection in women with different grades of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Acta Cytologica and Reproductive Biology*, Shannon, v. 80, p. 231-234, 1998.
- Van Der Schee, C.; Belkum, V.; Zwiigers, L.; Brugge, E.; O'Neill, E. L.; Luijckendijk, A. D.; Rijsoort-Vos, T.; Meijden, W. I.; Verbrugh, H.; Sluiter, H. J. F. Improved diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swabs and urine specimens compared to diagnosis by wet mount microscopy, culture and fluorescent staining. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 37, n. 12, p. 4127-4130, 1999.
- Van Dyck, E.; Meheus, A. Z.; Piot, P. Diagnóstico de laboratório de las enfermedades de transmisión sexual. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2000.

Otimização da detecção do polimorfismo Ala 677 – Val do gene que codifica a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)*

Optimization of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism detection

Darlene Camati Persuhn¹, Sandra Soares Melo², Carlos Leonardo Maccagnan Pinheiro Besen³, Fabiano Sansão⁴ & Iriane Eger Mangrich⁵

RESUMO – A mutação (C677T) no gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) tem sido associada à hiperhomocisteinemia e, possivelmente, ao risco elevado para doenças vasculares. O objetivo deste trabalho foi otimizar sua detecção por PCR para facilitar estudos populacionais. Foram testadas metodologias alternativas de purificação do DNA genômico humano e os resultados obtidos permitiram padronizar uma técnica com redução de reagentes para extração de DNA por precipitação com NaCl. Foram realizados experimentos variando a concentração dos componentes da reação de PCR que permitiram definir que reações contendo metade do volume inicial de deoxinucleotídeos e iniciadores (primers), assim como 0,5U de Taq DNA polimerase produzem essencialmente a mesma quantidade de amplificado que a reação anteriormente utilizada. Testou-se ainda, a redução do volume da reação de PCR com objetivo de utilizar o produto de amplificação diretamente para digestão com a enzima HinFI, evitando, assim, etapas de pipetagem que acarretam em risco de contaminação. Obteve-se sucesso com 15 mL de volume final, o que permitiu a utilização do sistema de PCR completo para digestão do produto amplificado. A importância deste estudo pode ser justificada pela significância que as doenças vasculares apresentam em termos populacionais e por este polimorfismo estar potencialmente relacionado com o risco de DAC (doença artério-coronariana) precoce.

PALAVRAS-CHAVE – Metilenotetrahidrofolato redutase, C677T, PCR.

SUMMARY – A common mutation C677T in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, involved in the metabolism of homocysteine, has been suggested to play a role in increasing cardiovascular disease risk. In order to facilitate to get population data studies, the objective of this work was improve its PCR detection. Leucocytes DNA purification alternative protocols were tested and a new low cost method of NaCl precipitation was developed. The composition of PCR mixture was also tested and we defined that the concentration of deoxynucleotides, primers and Taq DNA polymerase could be reduced in a half. The final volume of PCR mixture was reduced to 15mL, allowing the utilization of the same tube to amplification and HinFI digestion processes, avoiding extra steps. The significance of cardiovascular disease in populational data and the possibility of involvement of this mutation as risk factor of precocious ACD (arterial cardiovascular disease) justify this work.

KEYWORDS – Methylenetetrahydrofolate reductase, C677T, PCR.

INTRODUÇÃO

A hiperhomocisteinemia (elevação de homocisteína no plasma), tem sido reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças macrovasculares - doença cerebral, coronariana e arterial periférica (Munshi *et al.*, 1996). As manifestações clínicas da hiperhomocisteinemia grave incluem anormalidades neurológicas, retardo mental, episódios recorrentes de tromboembolismo e doenças vasculares na infância (Kang, 1996).

Existem vários fatores que influem nas concentrações de homocisteína. Suas concentrações aumentam gradativamente em indivíduos idosos quando comparados a indivíduos adultos de meia-idade, fato este que pode ser explicado pela diminuição da produção ou da atividade enzimática para o metabolismo da homocisteína, além da diminuição da biodisponibilidade de vitaminas como a B₆ e a B₁₂ ou folato, ou também mu-

lheres com diminuição hormonal pós-menopausa podem explicar este fenômeno (Folson *et al.*, 1998).

Várias formas de hiperhomocisteinemia são causadas por defeito(s) genéticos ou não genéticos, ou pela combinação de ambos fatores (Tab. I).

O polimorfismo C677T no gene da MTHFR foi descrito em 1995 por Frosst e colaboradores. Estes mesmos autores demonstraram que a mutação reduziu a atividade enzimática da MTHFR e estava associada com concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína. O papel desta mutação na predisposição à aterosclerose foi estudado posteriormente e o relato mostrou que houve uma maior frequência do polimorfismo C677T dentre os 60 pacientes com aterosclerose prematura em relação ao grupo controle (Kluijtmans *et al.*, 1997). Vários outros estudos envolvendo a avaliação da prevalência deste polimorfismo e seu envolvimento com predisposição a doenças foram realizados (Arai *et al.*, 1997, Kluijtmans *et al.* 1997, Rady *et al.*, 2002) e os

Recebido em 14/10/2003

Aprovado em 21/1/2004

*Projeto executado no laboratório de Biologia Molecular do CCS/UNIVALI-Itajaí/SC

¹Prof^ª dos Cursos de Farmácia e Medicina – UNIVALI; ²Prof^ª do Curso de Nutrição – UNIVALI; ³Bolsista do ProBIC/UNIVALI – Aluno do Curso de Farmácia - UNIVALI;

⁴Aluno do Curso de Farmácia - UNIVALI; ⁵Prof^ª do curso de Medicina – UNIVALI

TABELA I

Etiologia da hiperhomocisteinemia genética e não-genética

A – Hiperhomocisteinemia genética	B – Hiperhomocisteinemia não-genética (nutricional)
Deficiência da atividade da cistationina sintetase: mutações homozigóticas e heterozigóticas	Diminuição da atividade da sintetase devido à baixa concentração de piridoxina sérica
Deficiência da metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR): mutação severa heterozigótica e homozigótica e MTHFR termolábil	Diminuição da atividade da MTHFR devido a baixas concentrações séricas de folato ou tetra-hidrofolato
Deficiência da metionina sintetase devido à depleção de metilcobalamina	Diminuição da metionina sintetase devido à baixa concentração de B ₁₂ sérica
	Diminuição da metiltransferase homocisteína-betaína devido à baixa concentração de colina
	Síntese aumentada de homocisteína devido à alta ingestão de metionina

Fonte: KANG, 1996

resultados mostraram que existe grande variabilidade de ocorrência em diferentes grupos étnicos assim como exibiram discussões controversas relativas ao seu real envolvimento como fator de risco genético para doenças vasculares.

A metodologia para detecção do polimorfismo Ala677 – Val do gene que codifica a enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase já foi descrita (Arruda *et al.*, 1997), no entanto, um dos principais fatores da restrição de sua utilização é o elevado custo dos reagentes e conseqüentemente do exame. Assim, padronização de uma técnica rápida e barata de extração do DNA e de amplificação do fragmento gene que codifica a enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase é de grande interesse para a realização de triagens populacionais.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Seleção de pacientes

Para a caracterização genotípica, participaram do estudo pacientes com *Diabetes mellitus* Tipo 2, assistidos pelo Programa de Diabetes e Hipertensão da Unidade de Saúde e Saneamento – Balneário Camboriú – SC. Amostras de DNA de pacientes com genótipos heterozigoto foram selecionados e utilizados no estudo de otimização da detecção do polimorfismo C677T.

Anteriormente a coleta de dados, todos os pacientes foram informados sobre a finalidade do estudo e sobre os procedimentos experimentais que participaram, sendo solicitado as suas assinaturas em um termo de consentimento pós-informação.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Pesquisas em Humanos da Universidade do Vale do Itajaí – SC.

Purificação de DNA de leucócitos humanos

Após centrifugação de 1,5mL de sangue periférico coletado em presença de EDTA (3minutos, 5.000rpm), o tapete de leucócitos resultante foi recolhido em tubo plástico limpo de 1,5mL. Às células foi adicionado 1,0mL de tampão de lise I. A mistura resultante foi centrifugada por 5 minutos, 5.000rpm, ressuspensa em 250µL de tampão de liseII e 5µL de SDS 20%. Após homogeneização em vortex, adicionou-se 100µL de NaCl saturado. A mistura foi novamente homogeneizada em vortex e centrifugada por 3 minutos, 5000rpm. O sobrena-

dante resultante foi recolhido em tubo limpo. Adicionou-se 300µL de isopropanol absoluto. O DNA foi centrifugado por 5 minutos, 5000rpm e lavado duas vezes com solução de etanol 75%. Após 12h em repouso a temperatura ambiente, o DNA foi hidratado com 50µL de água ultra pura autoclavada. Utilizamos 5µL de amostra nas reações de amplificação (metodologia modificada a partir de Miller *et al.*, 1988).

Tampão de Lise I

- 0,3M de Sacarose (PM=342,3)
- 10mM Tris-HCl (pH=7,5)
- 5mM MgCl
- Triton x-100 1%
- Estocado em recipiente âmbar, sob refrigeração (4°C)

Tampão de Lise II

- 0,075M NaCl
- 0,024M Na-EDTA
- pH = 8,0, ajustado com NaOH
- Estocado à temperatura ambiente

Amplificação por PCR de um fragmento do gene que codifica a enzima MTHFR e que compreende o local da mutação C677T

Modificou-se a composição do sistema de PCR, tanto na concentração de reagentes quanto no volume final de reação.

A reação original utilizava 2µL de solução de DNTPs (solução estoque 5mmol/L), 1µL de cada primer (solução estoque 10pmol/µL), 1,5µL de solução de MgCl₂ (solução estoque 50mmol/L), 2,5µL de tampão de Taq DNA Polimerase (fornecido pelo fabricante da enzima), 1U de Taq DNA Polimerase e 2,5µL de DNA purificado conforme descrito por Miller e colaboradores (1988) num volume final de 25µL. O sistema era incubado por 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de incubação a 94°C (um minuto), 55°C (um minuto) e 72°C (dois minutos), além de uma etapa extra de extensão de 5 minutos. Para diagnosticar o polimorfismo C677T, o fragmento de 198pb obtido necessita ser digerido com enzima *HinfI*. Oito microlitros do amplificado foi recolhido em novo tubo plástico ao qual foi adicionado tampão e enzima *HinfI* (1U) além de água suficiente para completar 15µL. O sistema foi incubado a 37°C por 12 horas e o produto analisado em gel de eletroforese em poli-acrilamida 7% ou agarose 1,5%.

A fim de reduzir custos e etapas de pipetagem, testamos diversos sistemas alternativos até chegarmos ao que produziu resultados satisfatórios: 1µL de solução de DNTPs (Gibco-BRL), 0,5µL de cada primer (Gibco-BRL), 1,5µL de solução de MgCl₂, 1,5µL de tampão de Taq DNA Polimerase (fornecido pelo fabricante da enzima), 0,5U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies) e 1,5µL de DNA purificado conforme descrito num volume final de 15µL. O sistema de incubação foi idêntico ao citado acima. Para a digestão com a enzima *HinfI* (Gibco-BRL), bastou adicionar ao tubo onde foi realizada a amplificação uma mistura contendo enzima, tampão e água totalizando um volume final de 20µL.

RESULTADOS

As reações de amplificação do fragmento de 198pb correspondente à região do gene da MTHFR que compreende o polimorfismo C677T foram conduzidas conforme descrito em Materiais e Métodos. O volume final das reações foi 15µL, contendo 1,5µL de DNA; 1,0µL de DNTPs; 1,5µL de MgCl₂; 1,5µL de tampão de Taq DNA Polimerase; 0,5µL de primers (1 e 2); 0,5U ou 1,0U

de Taq DNA polimerase.

- Linha 1: marcador de peso molecular (100pb).

- Linha 2: 1,0U de Taq DNA polimerase.

- Linha 3: 0,5U de Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação do fragmento de 198pb correspondente à região do gene da MTHFR que compreende o polimorfismo C677T foram conduzidas conforme descrito em Materiais e Métodos. O volume final das reações foi 15µL, contendo 1,5µL de DNA; 1,0µL de DNTPs; 1,5µL de MgCl₂; 1,5µL de tampão de Taq DNA polimerase; 0,5µL de primers (1 e 2); 0,5U de Taq DNA polimerase. Linhas 1 e 2: controles contendo DNA amplificado e digerido conforme metodologia anterior à modificação.

- Linha 1: amostra 1 de DNA heterozigoto amplificada.

- Linha 2: amostra 1 de DNA heterozigoto amplificada e digerida com *HinfI*.

- Linha 3: amostra 2 de DNA heterozigoto amplificada.

- Linha 4: amostra 2 de DNA heterozigoto amplificada e digerida com *HinfI*.

- Linha 5: amostra 3 de DNA heterozigoto amplificada e digerida com *HinfI*.

- Linha 6: amostra 3 de DNA heterozigoto amplificada.

A Fig. 1 apresenta o resultado da amplificação do fragmento de 198pb do gene da MTHFR utilizando o sistema com concentrações reduzidas de reagentes e volume final de 15 microlitros na presença de 1,0 ou 0,5 unidade de Taq DNA polimerase, mostrando que houve sucesso em ambas as reações de amplificação. Para testar a eficiência da digestão com a enzima *HinfI*, submetemos o material amplificado em volume final de 15µL à digestão no mesmo tubo da amplificação conforme descrito na metodologia. Utilizamos somente DNA de pacientes previamente diagnosticados como heterozigotos para evidenciar o resultado, uma vez que no homozigoto normal, não ocorre digestão do fragmento de 198pb, e no DNA portador de alelo alterado, o fragmento é digerido e gera duas bandas: 175 e 23 pares de base, conforme aparecem na Fig. 2, mostrando o sucesso da reação e da digestão.

DISCUSSÃO

A técnica de purificação de DNA adaptada de Miller *et al.* (1988) mostrou-se efetiva. A vantagem desta em

relação a original é a utilização de um volume reduzido de amostra e de reagentes.

A otimização da composição do sistema de PCR mostrou que é possível reduzir a quantidade de reagentes de alto custo da reação, inclusive da enzima Taq DNA polimerase mantendo a capacidade de amplificação e reduzindo os custos da análise. Além disso, os experimentos com volume final reduzido da reação de PCR permitiram economizar uma etapa de pipetagem e utilização de tubos plásticos para a digestão com a enzima *HinfI*. A visualização de duas bandas após digestão com a enzima na Fig. 2, demonstra que o processo de identificação do polimorfismo não foi prejudicado pelas modificações efetuadas.

CONCLUSÃO

Através do protocolo estabelecido neste trabalho é possível realizar o dobro de análises de identificação do polimorfismo C677T da MTHFR com a mesma quantidade de reagentes, sem prejuízo na qualidade de interpretação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao programa de financiamento PRO-BIC/ UNIVALI pela concessão de recursos para execução deste projeto.

REFERÊNCIAS

1. Arai, K.; Yamasaki, Y.; Kajimoto, Y.; Watada, H.; Umahara, Y.; Kodama, M.; Sakamoto, K.; Hori, M. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid arterial wall thickening and myocardial infarction in NIDDM. *Diabetes*, v. 46, p. 2102-2104, 1997.
2. Arruda, V. R.; Zuben, P. M.; Chiapari, L. C.; Annichino-Bizzacchi, J. M.; Costa, F. F. The mutation Ala677@Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb and Haemost*, v. 77, n. 5, p. 818-821, 1997.
3. Folsom, A. R.; Nieto, J.; McGovern, P. G.; Tsai, M. Y.; Malinow, M. R.; Eckfeldt, J. H. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine related genetic polymorphisms and B vitamins. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation*, v. 98, p. 204-210, 1998.
4. Frosst, P.; Blom, H. J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C. A.; Matthews, R. G.; Boers, G. J. H.; Den Heijer, M.; Kluijtmans, L. A. J.; Van Den Heuvel, L. P.; Rozen, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, v. 10, p. 111-3, 1995.
5. Kang, S. S. Treatment of hyperhomocyst(e)inemia: physiological basis. *J. Nutr.*, v. 126, p. 1273S-1275S, 1996.
6. Kluijtmans, L. A. J.; Kastelein, J. J. P.; Lindemans, J.; Boers, G. H. J.; Heil, S. G.; Brusckhe, A. V. G.; Jukema, J. W.; Heuvel, L. P. W. J.; Trijbels, F. J. M.; Boerma, G. J. M.; Verheugt, F. W. A.; Willms, F.; Blom, H. J. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*, v. 96, p. 2573-2577, 1997.
7. Miller, S. A.; Dykes, D. D.; Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. *Nuc A Res*, v. 16, p. 1215, 1988.
8. Munshi, M. N.; Stone, A.; Fink, L.; Fonseca, V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism*, v. 45, n. 1, p. 133-135, 1996.
9. Rady, P. L.; Szucs, S.; Grady, J.; Hudnall, S. D.; Kellner, L. H.; Nitowsky, H.; Tyring, S. K.; Refsum, H.; Ueland, P. M.; Nygard, O. & Vollset, S. E. *Annu. Rev. Med.*, v. 49, p. 31-62, 2002.

Endereço para correspondência

Darlene Camati Persuhn

E-mail: darlene@ccs.univali.br

Rua Uruguaí, 458 Bloco 27, Sala 313

Laboratório de Biologia Molecular

CEP: 88302-202 Itajaí - SC

Aconselhamento ao paciente infectado pelo vírus linfotrópico de células-T humanas do tipo I e II (HTLV-I/II)

Advising to human T-cell lymphotropic virus type I and II (HTLV-I/II) infected persons

Fred Luciano Neves Santos*

RESUMO – Indivíduos com resultados positivos para HTLV-I/II devem receber informações adequadas sobre as vias de transmissão do vírus, doenças associadas, possibilidade de desenvolvimento de doenças e que estes vírus não provocam AIDS. Aconselha-se que o portador desta infecção seja instruído a compartilhar esta informação com os profissionais de saúde aos quais procuram auxílio, não doar sangue, sêmen, órgãos ou tecidos, não compartilhar seringas ou similares, utilizar preservativos de látex e não amamentar, embora o risco de transmissão do HTLV-II por esta última via seja incerta. É recomendado que os indivíduos infectados realizem uma avaliação médica rotineira, incluindo exame físico, neurológico e avaliação hematológica. Os indivíduos que desenvolverem alguma doença devem ser encaminhados a médicos especializados para receber tratamentos individualizados.

PALAVRAS-CHAVE – HTLV-I/II, transmissão, patologias, diagnóstico, aconselhamento.

SUMMARY – HTLV-I/II infected persons should be informed about modes and efficiency of transmission, disease association, the probability of developing disease and should know that HTLV is not the AIDS virus. These individuals should be advised to share the information with their physician, avoid donating blood, semen, body organs or other tissues, sharing-needles or syringes with anyone, consider the use of latex condoms and breast-feeding infants, although the risks of HTLV-II transmission by this way is unknown. A periodic medical evaluation of HTLV-I and/or HTLV-II-infected persons is recommended, including a physical, neurological and a complete blood count peripheral smear examination. Individuals with any disease associated to HTLV-I should be conducted to experts to receive individualized treatments.

KEYWORDS – HTLV-I/II, transmission, pathologies, diagnostic, recommendations.

INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-I) e tipo II (HTLV-II) foram os primeiros retrovírus humanos descobertos^{23,48}. Ambos pertencem a sub-família *oncovirionae* e são capazes de transformar linfócitos *in vitro*, imortalizando-os. Não são relacionados ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV-1 e HIV-2), os quais pertencem à sub-família *lentivirinae* e causam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS ou SIDA). O HTLV-I diferencia-se do HTLV-II principalmente por uma sequência genômica denominada *pX* que, no entanto, são homólogas em 60%. O HTLV-I e o HTLV-II têm propriedades biológicas similares e tropismo para linfócitos T^{14,15,21}, porém o HTLV-I infecta preferencialmente linfócitos T CD4+, enquanto o HTLV-II tem tropismo para linfócitos T CD8+, com efeito hematológico diferente do HTLV-I⁴².

O objetivo deste trabalho foi levantar aspectos relevantes quanto às possíveis vias de transmissão do HTLV-I/II, patologias associadas a estes dois vírus, diagnóstico laboratorial e, principalmente, recomendações que devam ser consideradas pelos profissionais de saúde ao trabalharem com indivíduos infectados pelo HTLV-I/II.

Vias de transmissão

A transmissão do HTLV-I ocorre, principalmente, por três vias:

a) *horizontal (contato sexual)*, a qual parece ser mais freqüente do homem para a mulher do que o inverso. Em um estudo realizado no Japão, durante um período

de 10 anos, foi demonstrado que a eficiência da transmissão sexual de homens para mulheres é de cerca de 60.8%, comparado com menos de 1% da transmissão da mulher para o homem²². Em outro estudo, a presença de anticorpos para a proteína Tax no homem foi associada a uma transmissão sexual para sua parceira⁸. Na Jamaica, úlceras genitais nos homens foram identificadas como fatores predisponentes para a infecção pelo HTLV-I através da relação sexual⁴¹. Nos Estados Unidos, cerca de 25 a 30% de parceiros(as) sexuais de doadores(as) de sangue infectados(as) são soropositivos(as)^{31,60}. Presume-se que a infecção adquirida através da atividade sexual ocorra em consequência de linfócitos infectados presentes no sêmen e na secreção vaginal²²;

b) *vertical (da mãe para o filho)*, caracterizada por transmissão transplacentária, durante o parto ou pela amamentação^{2,53}. No entanto, a via mais importante é a amamentação. Em áreas endêmicas para o HTLV-I, aproximadamente 25% dos recém-nascidos amamentados por mães infectadas pelo HTLV-I adquirem o vírus. Alguns estudos sugerem que esta transmissão pode estar associada à presença de anticorpos maternos para a proteína Tax²⁸, uma proteína transativadora do vírus, ou mães com elevados títulos de anticorpos anti-HTLV-I¹⁸. Entretanto, a utilidade clínica desses marcadores ainda não está bem definida. A transmissão intrauterina ou perinatal pelo HTLV-I também pode ocorrer, mas com uma freqüência bem menor que a transmissão através do aleitamento materno. Takahashi e colaboradores, em 1991, observaram que cerca de 5% das crianças não

Recebido em 21/10/2003

Aprovado em 29/1/2004

*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia

amamentadas e nascidas de mães infectadas pelo HTLV-I adquiriram a infecção⁵⁵; e

c) *parenteral*, ocorre através da transfusão de sangue contaminado e seus produtos, bem como uso de seringas contaminadas. Entretanto, a transmissão do HTLV-I é menos freqüente que a do vírus da imunodeficiência humana (HIV) devido à baixa carga viral e à infecção ser dependente do contato célula-célula²⁴. A transmissão do HTLV-I através de sangue contaminado ou de seus derivados (concentrados de eritrócitos, leucócitos ou plaquetas) ocorre através de transfusão sanguínea, mas não através de plasma dos indivíduos infectados pelo HTLV-I⁷. Em áreas endêmicas, taxas de soroconversão de 44 a 63% foram relatadas em receptores de componentes celulares infectados pelo HTLV-I^{37,45}. Nos Estados Unidos, essas taxas são de aproximadamente 20%⁵⁴. A probabilidade de transmissão através do sangue total ou concentrado de células vermelhas parece diminuir com aumento do tempo de estocagem: este achado foi atribuído a depleção de células infectadas, presumivelmente dos linfócitos T^{10,37}. O compartilhamento de seringas contaminadas é uma importante rota de transmissão tanto do HTLV-I/II quanto do HIV-1, HIV-2 e do vírus da hepatite B entre os usuários de drogas.

O HTLV-II parece ser transmitido da mesma forma que o HTLV-I. No entanto, muito pouco é conhecido sobre os modos e a eficiência da transmissão deste vírus. Em 1992, Kaplan e colaboradores, ao avaliarem vinte recém-nascidos não amamentados e filhos de mães infectadas pelo HTLV-II, demonstraram pouca eficiência de transmissão por esta via²⁷, apesar do vírus já ter sido detectado no leite materno¹⁷. O HTLV-II pode também ser transmitido por via sexual¹⁹ e por transfusão de sangue ou por hemoderivados^{10,54}. Assim como para o HTLV-I, a possibilidade de transmissão por concentrado de eritrócitos também diminui com o aumento do tempo de estocagem do material⁵⁴. A alta prevalência entre usuários de drogas ocorre devido ao compartilhamento de seringas contaminadas¹¹.

Da mesma forma que o HIV, o HTLV-I/II não é transmitido por contato casual. Entretanto, profissionais da área de saúde devem ser precavidos ao manipularem o sangue de pessoas infectadas pelo HTLV-I/II, utilizando técnicas de biossegurança para evitar exposição percutânea a este material. Em um estudo realizado no Japão, em 1990, Katoaka e colaboradores observaram a soroconversão de somente um profissional de saúde que se acidentou com uma agulha contaminada com o sangue de um paciente com leucemia/linfoma de células T do adulto²⁹. No entanto, não foi observada soroconversão em 31 profissionais que se expuseram ao material contaminado pelo HTLV-I através ferimentos superficiais¹.

Doenças associadas ao HTLV-I/II

O HTLV-I é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células-T do adulto (LLTA)⁵⁷ e da paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV-I (PET/MAH)^{12,46}. Está associado também a outras condições clínicas como artropatias⁴³, polimiosites⁴⁰, uveítes³⁹, dermatite infectiva³², síndrome de Sjögren³⁸, dentre outras. As diversas manifestações clínicas podem depender do tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro para os antígenos do HTLV-I e do local ou órgão no qual a reação inflamatória acontece.

A LLTA ou a PET/MAH desenvolve-se em uma pequena proporção nas pessoas infectadas. Cerca de 98% dos portadores permanecem assintomáticos^{36,45}. Alguns estudos demonstraram que uma grande parte da po-

pulação japonesa é portadora do vírus, porém, o risco estimado para desenvolver LLTA nos portadores é de 2 a 4%, enquanto que o risco para desenvolvimento de mielopatia é de somente 0.25%^{25,56}. Não há dados no Brasil indicando a porcentagem de indivíduos portadores e a quantidade destes que evoluem para alguma forma clínica associada ao vírus.

A LLTA é uma doença maligna de linfócitos T CD4+. Nesta doença, o HTLV-I é integrado monoclonalmente em uma população de células. Os principais sinais e sintomas são: astenia, dor abdominal, tosse, ascite, diarreia e episódios de infecções repetitivas. A hipercalemia é uma complicação freqüente e sinais e sintomas secundários à mesma agravam o quadro inicial. Pacientes no estágio inicial da doença geralmente apresentam prurido, não sendo ainda bem estabelecido o mecanismo pelo qual este sintoma ocorre. Os achados mais freqüentes ao exame físico incluem linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, palidez e lesão de pele. Em alguns casos são encontradas ascite, efusão pleural e lesões líticas^{4,30}. As lesões de pele são freqüentes sob a forma de eritrodermia, nódulos e pápulas. Há uma grande confusão entre a relação do HTLV-I com micoses fungóides devido à semelhança clínica das lesões de pele e à presença de células convolutas circulantes. A LLTA pode se apresentar como quadro leucêmico ou como linfoma (com pouco ou nenhum envolvimento do sangue periférico). Atualmente a LLTA pode apresentar 4 formas clínicas distintas: aguda, crônica, linfomatosa ou *smoldering*. A forma leucêmica aguda é a mais freqüente, ocorrendo em 65% dos casos, e se caracteriza por sua agressividade. Freqüentemente, o paciente apresenta leucocitose, hipercalemia e lesões de pele. Há uma leucocitose com células linfóides muito atípicas, apresentando núcleos convolutos. Estas células são conhecidas como *flower cells* e é um achado comum nesta doença. A forma linfomatosa é indistinguível de outros linfomas não-Hodgkin. Assim como a forma aguda, a forma linfomatosa apresenta um mau prognóstico, tendo uma evolução fatal. Há um aumento exagerado de células tumorais, hipercalemia incontrolável, presença de septicemia bacteriana e várias outras infecções oportunistas, como pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Já a forma crônica é caracterizada por uma linfocitose persistente às custas de células T, com pouco ou nenhum envolvimento de órgãos. Dentro de meses ou anos esta forma pode ser tornar aguda. A forma *smoldering*, também chamada de pré-leucêmica, não apresenta um número elevado de células anormais circulantes. Os pacientes são normalmente assintomáticos e a contagem de leucócitos é normal, com menos de 3% de linfócitos atípicos⁵⁰.

A PET/MAH é uma doença progressiva caracterizada por fraqueza dos membros inferiores, espasticidade, hiperflexia, distúrbios sensoriais e incontinência urinária. Em pacientes com PET/MAH, diferentemente daqueles com esclerose múltipla, os sinais e sintomas não diminuem, os nervos cranianos não são envolvidos e as funções cognitivas não são afetadas. Anticorpos anti-HTLV-I são caracteristicamente encontrados no fluido cerebrospinal¹³. O período de latência do vírus para o desenvolvimento de PET/MAH é menor do que para o desenvolvimento de LLTA. Alguns casos de PET/MAH foram associados à transfusão sanguínea, com um intervalo médio de 3.3 anos entre a transfusão e o desenvolvimento da doença⁴⁷.

As infecções causadas pelo HTLV-II não estão claramente associadas a doenças. Este vírus foi isolado, inicialmente, de dois pacientes com leucemia de células cabeludas^{23,51}, porém, nenhuma evidência de que o

HTLV-II era o responsável pelo desenvolvimento desta leucemia foi encontrada em outros pacientes⁵². Raros casos de PET/MAH²⁰, micoses fungóides⁶² e leucemia linfocítica³⁵ foram relacionados a pessoas infectadas pelo HTLV-II. Casos de eritrodermite e infecções de pele por bactérias foram associadas a indivíduos co-infectados pelo HIV-1 e HTLV-II²⁶.

Diagnóstico sorológico e molecular da infecção causada pelo HTLV-I/II

O diagnóstico rotineiro da infecção causada pelo HTLV-I baseia-se na detecção sorológica de anticorpos específicos para componentes antigênicos das diferentes porções do vírus (core e envelope). Uma vez que os métodos de triagem sorológica para HTLV, os ensaios imunoenzimáticos, apresentam freqüentes reações falso-positivas^{5,49,61}, o imunodiagnóstico dessa retrovírose depende de confirmação da sororeatividade, através de *Western Blot* ou da reação em cadeia da polimerase (PCR). O algoritmo empregado para detecção sorológica inicial preconiza a utilização de testes imunoenzimáticos com amostras de soro em duplicata. Esta técnica possui a vantagem de ser simples, possuir alta sensibilidade e ainda poder ser automatizada para testagem simultânea de grande número de soros. Sua sensibilidade pode, no entanto, variar dependendo da base antigênica empregada na reação⁹. As amostras que apresentam resultados repetidamente reagentes aos testes imunoenzimáticos necessitam sempre serem submetidas a testes confirmatórios, como o *Western blot*. Estes testes apresentam baixa possibilidade de resultados falso-positivos e, por isso, constituem o método de escolha para o diagnóstico confirmatório de infecção por HTLV-I/II⁵⁹. Dessa forma, indivíduos soropositivos são aqueles em que se detectam anticorpos contra antígenos do core (anti-p24), juntamente com anticorpos contra glicoproteínas do envelope (r21-e, gp46 ou gp61/68) nos testes confirmatórios. Os indivíduos indeterminados são aqueles que apresentam anticorpos séricos que reagem com antígenos de HTLV-I/II, porém com padrão de reatividade diferente do acima descrito para soropositivos. Os negativos são aqueles cujos soros não reagem com antígenos do HTLV.

O diagnóstico molecular de infecção por HTLV-I ou HTLV-II é indicado para o esclarecimento de casos inconclusivos aos testes sorológicos, quer seja por apresentarem resultados indeterminados ao teste de *Western blot*, ou mesmo quando a reação de *Western blot*, embora positiva, seja incapaz de distinguir infecção por HTLV-I daquela causada por HTLV-II. Além disso, este diagnóstico pode facilitar a identificação de lactentes infectados por transmissão vertical, a partir de mães soropositivas, uma vez que as provas sorológicas nessa situação não permitem descartar a presença de anticorpos maternos transferidos passivamente por via transplacentária ao sangue das crianças^{2,44}.

Os testes moleculares baseiam-se na pesquisa de seqüências genômicas provirais em células mononucleares periféricas, lisadas enzimaticamente pela proteinase K^{3,16,58}. Empregam-se técnicas de amplificação de segmentos genômicos, por meio da PCR. Entretanto, a maioria dos indivíduos soroindeterminados não se mostra infectada após a investigação por diagnóstico molecular^{33,34}. Porém, aqueles indivíduos que se mostram soroindeterminados à reação de *Western blot*, e que mostraram-se infectados pelo HTLV-I ou HTLV-II através do diagnóstico molecular, revelam-se positivos em investigação sorológica complementar conduzida posteriormente. Pois a soroconversão de indivíduos infectados

pelo HTLV pode ocorrer anos após da infecção, sendo que alguns pacientes produzem anticorpos anti-HTLV em baixa concentração, os quais são dificilmente detectados pelos testes sorológicos convencionais.

Aconselhamento aos indivíduos infectados pelo HTLV-I/II

Os indivíduos com resultados repetidamente positivos para HTLV-I/II, mas não confirmados por testes mais específicos, devem ser informados que este resultado não é conclusivo, podendo ser uma reação falso-positiva. Testes adicionais mais específicos devem ser realizados para confirmar ou afastar as suspeitas. Estes indivíduos devem receber informações adequadas sobre as vias de transmissão do vírus e que estes não provocam AIDS, sendo esta causada por um vírus diferente, chamado HIV. Devem ser informados que o HTLV-I/II provoca uma infecção prolongada e que, no caso do HTLV-I, somente uma pequena percentagem dos portadores desenvolvem alguma doença associada ao vírus. Caso esteja infectado pelo HTLV-II, o indivíduo deve ser informado que este vírus não foi concretamente associado a nenhuma doença específica.

Se o indivíduo infectado pelo HTLV-I/II possuir uma relação monogâmica é recomendado que sua(seu) parceira(o) seja testado(a). Caso o resultado seja positivo nenhuma recomendação específica precisa ser dada. Contudo, se for negativo, o casal deve ser aconselhado a utilizar preservativos de látex com o objetivo de prevenir a transmissão do vírus⁶. Já no caso de indivíduos com múltiplos(as) parceiros(as) sexuais a utilização de preservativos de látex deve ser exaustivamente recomendada.

Pessoas com resultados positivos para HTLV-I e HTLV-II nos testes confirmatórios devem receber atenção especial. Inicialmente deve-se buscar alternativas para confirmar o subtipo viral que está provocando a infecção, pois há diferenças na epidemiologia e desenvolvimento de doenças entre os dois vírus. Se este esforço fracassar, esses indivíduos devem receber informações sobre as possíveis vias de transmissão, doenças associadas e possibilidade de desenvolvimento de doenças tanto em relação ao HTLV-I quanto ao HTLV-II. Já os indivíduos com resultado indeterminado para HTLV devem ser avisados que tiveram resultados reativos nos testes de triagem, mas que devem ser confirmados por um segundo teste mais específico que o anterior como, por exemplo, os testes moleculares.

O indivíduo infectado pelo HTLV-I/II deve ser instruído a compartilhar esta informação com os profissionais de saúde aos quais procuram auxílio, não doar sangue, sêmen, órgãos ou tecidos, não compartilhar seringas ou similares, utilizar preservativos de látex e não amamentar, embora o risco de transmissão do HTLV-II por esta última via seja incerta. Entretanto, como há um risco teórico de transmissão e de desenvolvimento de doenças, como para o HTLV-I, é prudente que mães portadoras do HTLV-II não amamentem seus filhos, buscando alternativas nutricionais.

Os pacientes devem também ser instruídos a compartilhar esta informação com seus familiares a fim de buscar apoio psicológico. Os filhos destes indivíduos devem receber orientação no sentido de se investigar uma possível transmissão vertical.

Além de todos estes aspectos, é recomendada uma avaliação médica periódica dos indivíduos infectados pelo HTLV-I. A esta avaliação devem ser incluídos exame físico, neurológico e avaliação hematológica. Avaliações médicas para indivíduos portadores de HTLV-II devem ser consideradas normais. Os indivíduos que

desenvolverem alguma doença devem ser encaminhados a médicos especializados para receber tratamentos individualizados. Mães soropositivas que sejam aconselhadas a não amamentar seus filhos devem receber apoio psicológico, caso seja necessário.

AGRADECIMENTOS

A Carlos Lúcio Rego Pertigas pela revisão da versão final do artigo.

REFERÊNCIAS

- Amin, R. M.; Jones, B.; Rubert, M. Risk of retroviral infection among Retrovirology laboratory and health care workers. In: American Society for Microbiology 92nd General Meeting, New Orleans, Louisiana, 1992.
- Ando, Y.; Matsumoto, Y.; Nakano, S.; Saito, K.; Kakimoto, K.; Tanigawa, T.; Ekuni, Y.; Kawa, M.; Toyama, T. Long term follow up study of vertical HTLV-I infection in children breast-fed by seropositive mothers. *J. Infect.*, 46(3):177-9, 2003.
- Andrada-Serpa, M. J.; Araújo, A. Q.; Taffarel, M.; Schor, D.; Scheiner, M. A.; Ferreira, O.; Schatzmayr, H. G. Detection and isolation of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) from cultured lymphocytes of a Brazilian TSP/HAM patient. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28(1): 51-7, 1995.
- Blunn, P. A.; Schechter, G. P.; Jaffe, E. *et al.* Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 309:257-64, 1983.
- Caterino-de-Araujo, A.; de los Santos-Fortuna, E.; Meleiro, M. C.; Suleiman, J.; Calabro, M. L.; Favero, A.; De Rossi, A.; Chieco-Bianchi, L. Sensitivity of two enzyme-linked immunosorbent assay tests in relation to western blot in detecting human T-cell lymphotropic virus types I and II infections among HIV-1 infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 30(3): 173-82, 1998.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendation for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR*, 36(suppl 2):3-18, 1987.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendation for counseling persons infected with human T-lymphotropic virus, types I and II. Recommendation on prophylaxis and therapy for disseminated Mycobacterium avium complex for adults and adolescents infected with human immunodeficiency virus. *MMWR*, 1993.
- Chen, Y. M.; Okayama, A.; Lee, T. H.; Tachibana, N.; Mueller, N.; Essex, M. Sexual transmission of human T-cell leukemia virus type I associated with the presence of anti-Tax antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(4):1182-6, 1991.
- Cossen, C.; Hagens, S.; Fukuchi, R.; Forghani, B.; Gallo, D.; Ascher, M. Comparison of six commercial human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) enzyme immunoassay kits for detection of antibody to HTLV-I and HTLV-II. *J. Clin. Microbiol.* 30(3): 724-5, 1992.
- Donegan, E. Transfusion Safety Study (TSS) Group. Comparison of HTLV-I/II with HIV-1 transmission by component type and shelf storage before administration. *Transfusion*, 29:S29, 1989.
- Feigal, E.; Murphy E.; Wachsman, W. *et al.* A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 315:372-7, 1986.
- Gessain, A.; Barin, F.; Vernant, J. C.; Gout, O.; Maurs, L.; Calender, A.; de The, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 2(8452):407-10, 1985.
- Gessain, A.; Caudie, C.; Gout, O.; Vernant, J. C.; Maurs, L.; Giordano, C.; Malone, G.; Tournier-Lasserre, E.; Essex, M.; de The, G. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *J. Infect Dis.*, 157(6):1226-34, 1988.
- Hall, W. W. Human T cell lymphotropic virus type I and cutaneous T-cell leukemia/lymphoma. *J. Exp. Med.*, 180(5):1581-5, 1994.
- Hall, W.W.; Kubo, T.; Ijichi, S.; Takahashi, T.; Zhu, S. W. *et al.* Human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. *Semin. Virol.*, 5:165-78, 1994.
- Hashimoto, K.; Higuchi, I.; Osame, M.; Izumo, S. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. *J. Neurosci.*, 15(14): 67-72, 1998.
- Heneine, W.; Woods, T.; Green, D.; Fukuda, K.; Giusti, R.; Castillo, L.; Arminen, B.; Gracia, F.; Kaplan, J. E. Detection of HTLV-II in breastmilk of HTLV-II infected mothers. *Lancet*, 340(8828):1157-8, 1992.
- Hino, S.; Doi, H.; Yoshikuni, H.; Sugiyama, H.; Ishimaru, T.; Yamabe, T.; Tsuji, Y.; Miyamoto, T. HTLV-I carrier mothers with high-titer antibody are at high risk as a source of infection. *Jpn. J. Cancer Res.*, 78(11):1158-8, 1987.
- Hjelle, B.; Cyrus, S.; Swenson, S. G. Evidence for sexual transmission of human T lymphotropic virus type II. *Ann. Intern. Med.*, 116(1):90-1, 1992.
- Hjelle, B.; Appenzeller, O.; Mills, R.; Alexander, S.; Torrez-Martinez, N.; Jahnke, R.; Ross, G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet*, 339(8794):645-6, 1992.
- Hollingsberg, P. & Hafler, D. A. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. *N. Engl. J. Med.*, 328(16):1173-82, 1993.
- Kajiyama, W.; Kashiwagi, S.; Ikematsu, H.; Hayashi, J.; Nomura, H.; Okochi, K. Intrafamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. *J. Infect. Dis.*, 154:851-7, 1986.
- Kalyanaraman, V. S.; Sarngadharan, M. G.; Robert-Guroff, M.; Miyoshi, I.; Golde, D.; Gallo, R. C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, 218(4572):571-3, 1982.
- Kamihira, S.; Nakasima, S.; Oyakawa, Y.; Moriyu, Y.; Ichimaru, M.; Okuda, H.; Kanamura, M.; Oota, T. Transmission of human T cell lymphotropic virus type I by blood transfusion before and after mass screening of sera from seropositive donors. *Vox. Sang.*, 52(1-2):43-4, 1987.
- Kaplan, J. E.; Osame, M.; Kubota, H.; Igata, A.; Nishitani, H.; Maeda, Y.; Khabbaz, R. F.; Janssen, R. S. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 3(11):1096-101, 1990.
- Kaplan, M. H.; Hall, W. W.; Susin, M.; Pahwa, S.; Salahuddin, S. Z.; Heilman, C.; Fettes, J.; Coronese, M.; Farber, B. F.; Smith, S. Syndrome of severe skin disease, eosinophilia, and dermatopathic lymphadenopathy in patients with HTLV-II complicating human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Med.*, 91(3):300-9, 1991.
- Kaplan, J. E.; Abrams, E.; Schaffer, N.; Cannon, R. O.; Kaul, A.; Krasinski, K.; Bamji, M.; Hartley, T. M.; Roberts, B.; Kilbourne, B.; *et al.* Low risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type II in non-breast-fed infants. *J. Infect. Dis.*, 166(4):892-5, 1992.
- Kashiwagi, S.; Kajiyama, W.; Hayashi, J.; Noguchi, A.; Nakashima, K.; Nomura, H.; Ikematsu, H.; Sawada, T.; Kida, S.; Koide, A. Antibody to p40tax protein of human T-cell leukemia virus 1 and infectivity. *J. Infect. Dis.*, 161(3):426-9, 1990.
- Kataoka, R.; Takehara, N.; Iwahara, Y.; Sawada, T.; Ohtsuki, Y.; Dawei, Y.; Hocino, H.; Miyoshi, I. Transmission of HTLV-I by blood transfusion and its prevention by passive immunization in rabbits. *Blood*, 76(8):1657-61, 1990.
- Kawano, F.; Yamaguchi, K.; Nishimura, H. *et al.*, Variation in the clinical courses of adult T-cell leukemia. *Cancer*, 55:851-6, 1985.
- Kleinman, S.; Fitzpatrick, L.; Lee, H. Transmission of HTLV-I/II from blood donors to their sexual partners. In: International Society of Blood Transfusion/American Association of Blood Banks, 1990, Los Angeles, p.129.
- La Grenade, L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 13(Suppl 1):S46-9, 1996.
- Lal, R. B.; Brodine, S.; Kazura, J.; Mbidde-Katonga, E.; Yanagihara, R.; Roberts, C. Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp-21)-spiked western immunoblot for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections. *J. Clin. Microbiol.*, 30(2): 296-9, 1992.
- Lipka, J. J.; Young, K. K.; Kwok, S. Y.; Reyes, G. R.; Sninsky, J. J.; Fong, S. K. Significance of human T-lymphotropic virus type I indeterminate serological findings among healthy individuals. *Vox. Sang.*, 61(3): 171-6, 1991.
- Loughran, T. P. J.; Coyle, T.; Sherman, M. P.; Starkebaum, G.; Ehrlich, G. D.; Ruscetti, F. W.; Poiesz, B. J. Detection of human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II, in a patient with large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 80(5):1116-9, 1992.
- Mahieux, R.; Ibrahim, F.; Mauclere, F.; Herve, V.; Michel, P.; Tekcia, F.; Chappey, C.; Garin, B.; Van Der Ryst, E.; Guillemain, B.; Ledru, E.; Delaporte, E.; de The, G.; Gessain, A. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J. Virol.*, 71(2):1317-33, 1997.
- Manns, A.; Wilks, R. J.; Murphy, E. L.; Haynes, G.; Figueroa, J. P.; Barnett, M.; Hanchard, B.; Blattner, W. A. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int. J. Cancer*, 51(6):886-91, 1992.
- Mariette, X.; Cherot, P.; Cazals, D.; Brocheriou, C.; Brouet, J. C.; Agbalika, F. Antibodies to HTLV-I in Sjögren's syndrome. *Lancet*, 345(8941): 71, 1995.
- Mochizuki, M.; Ono, A.; Ikeda, E.; Hikita, N.; Watanabe, T.; Yamaguchi, K.; Sagawa, K.; Ito, K. HTLV-I uveitis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 13(Suppl 1):S50-6, 1996.
- Morgan, O. S.; Rodgers-Johnson, P.; Mora, C.; Char, G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet*, 2(8673):1184-7, 1989.
- Murphy, E. L.; Figueroa, J. P.; Gibbs, W. N.; Brathwaite, A.; Holding-Cobhan, M.; Waters, D.; Cranston, B.; Hanchard, B.; Blattner, W. A. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann. Intern. Med.*, 111(7):555-60, 1989.
- Murphy, E. L. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 13(Suppl 1):S215-9, 1996.
- Nishioka, K.; Maruyama, I.; Sato, K.; Kitajima, I.; Nakajima, Y.; Osame, M. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *Lancet*, 1(8635):441, 1989.
- Nyambi, P. N.; Ville, Y.; Louwagie, J.; Bedjabaga, I.; Gwacczower, E.; Peeters, M.; Kerouedan, D.; Dazza, M.; Larouze, B.; van der Groen, G.; Delaporte, E. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) in Gabon: a prospective follow-up of 4 years. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 12(2): 187-92, 1996.
- Okochi, K.; Sato, H.; Himuna, Y. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox. Sang.*, 46(5):245-53, 1984.
- Osame, M.; Usuku, K.; Izumo, S.; Ijichi, N.; Amitani, H.; Igata, A.; Matsumoto, M.; Tara, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, 1(8488):1031-2, 1986.
- Osame, M.; Janssen, R.; Kubota, H.; Nishitani, H.; Igata, A.; Nagataki, S.; Mori, M.; Goto, I.; Shimabukuro, H.; Khabbaz, R.; *et al.* Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann. Neurol.*, 28(1):50-6, 1990.
- Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Gazdar, A. F.; Bunn, P. A.; Minna, J. D.; Gallo, R. C. Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7415-9, 1980.
- Poiesz, B. J.; Dube, S.; Choi, D.; Esteban, E.; Ferrer, J.; Leon-Ponte, M.; de Perez, G. E.; Glaser, J.; Devare, S. G.; Vallari, A. S.; Schochetman, G. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-I/II infection. *Transfusion*, 40(8): 924-30, 2000.
- Pombo-de-Oliveira, M. S.; Loureiro, P.; Carvalho, S. M. Leucemia/Linfoma de células T do adulto (ATLL): características clínicas/patológicas e apresentações no Brasil. In: *Cadernos Hemomina. Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais*, 2000, p.76-107.
- Rosenblatt, J. D.; Golde, D. W.; Wachsman, W.; Giorgi, J. V.; Jacobs, A.; Schmidt, G. M.; Qian, S.; Gasson, J. C.; Chen, I. S. A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 315(6):372-7, 1986.
- Rosenblatt, J. D.; Gasson, J. C.; Gaspy, J.; Bhuta, S.; Aboud, M.; Chen, I. S.; Golde, D. W. Relationship between human T-cell leukemia virus-II and atypical hairy cell leukemia: a serologic study of hairy leukemia patients. *Leukemia*, 1(4):397-401, 1987.
- Sugiyama, H.; Doi, H.; Yamaguchi, K.; Tsuji, Y.; Miyamoto, T.; Hino, S. Significance of postnatal mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type-I on the development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J. Med. Virol.*, 20(3):253-60, 1986.
- Sullivan, M. T.; Williams, A. E.; Fang, C. T.; Grandinetti, T.; Poiesz, B. J.; Ehrlich, G. D. Transmission of human T-lymphotropic virus types I and II by blood transfusion. *Arch. Intern. Med.*, 151(10):2043-8, 1991.
- Takahashi, K.; Takezaaki, T.; Oki, T.; Kawakami, K.; Yashiki, S.; Fujiyoshi, T.; Usuku, K.; Mueller, N.; Osame, M.; Miyata, K.; *et al.* Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I. *Int. J. Cancer*, 49(5):673-7, 1991.
- Tokudome, S.; Tokunaga, O.; Shimamoto, Y.; Miyamoto, Y.; Sumida, I.; Kikuchi, M.; Takeshita, M.; Ikeda, T.; Fujiwara, K.; Yoshihara, M. Incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma among human T-lymphotropic virus type I carriers in Saga, Japan. *Cancer Res.*, 49(1):226-8, 1989.
- Uchiyama, T. *et al.* Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. *Blood*, 50:481-92, 1977.
- Vallejo, A. & García-Sáiz, A.: Typing human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I and HTLV-II) by nested polymerase chain reaction: application to clinical specimens. *J. Virol. Methods*, 51(1):9-17, 1995.
- Varma, M.; Rudolph, D. L.; Knuchel, M.; Switzer, W. M.; Hadlock, K. G.; Velligan, M.; Chan, L.; Fong, S. K.; Lal, R. B. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 infections by western blot (immunoblot) assays containing recombinant glycoproteins. *J. Clin. Microbiol.*, 33(12): 3239-44, 1995.
- Williams, A. E.; Sullivan, M. T.; Fang, C. T. HTLV-I/II infection in contacts of HTLV-I+ blood donors and recipients identified by lookback. In: *Third Annual Retrovirology Conference*, 1990, Hawaii, p.12-14.
- Zehender, G.; De Maddalena, C.; Gianotto, M.; Cavalli, B.; Santambrogio, S.; Orso, M.; Moroni, M.; Galli, M. High prevalence of false-negative anti-HTLV type I/II enzyme-linked immunosorbent assay results in HIV type 1-positive patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 13(13): 1141-6, 1997.
- Zucker-Franklin, D.; Hooper, W. C.; Evatt, B. L. Human lymphotropic retroviruses associated with mycosis fungoides: evidence that T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) as well as HTLV-I may play a role in the disease. *Blood*, 80(6):1537-45, 1992.

Endereço para correspondência

Fred Luciano Neves Santos

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia.

Rua Oito de Dezembro, 121/901, Graça, Salvador - Bahia. CEP 40150-000

E-mail: flucianon@hotmail.com

Avaliação bioquímica do líquido hidrocelico em indivíduos residentes em área endêmica de *Wuchereria bancrofti*

Biochemically of hydrocele fluid from individuals living in endemic areas with bancroftian filariasis

Alexandre Brito¹; Guilherme Lima²; Sandra Alves³; Zulma Medeiros³; Ana Aguiar-Santos³; José Luis⁴; Ulisses Montarroyos⁵ & Abraham Rocha³

RESUMO – A proposta deste estudo foi avaliar aspectos bioquímicos em amostras de líquido hidrocelico de indivíduos vivendo em área endêmica de bancroftose, tendo como referência amostras pareadas dos seus respectivos soros. Ocorreu diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$) nos níveis de proteína, albumina, globulina, cálcio, alanina-transaminase (ALT), aspartato-transaminase (AST), colesterol, triglicerídeo, desidrogenase láctica (DHL) e fosfatase alcalina (FA) nas amostras séricas quando comparadas às amostras de líquido hidrocelico. Por outro lado, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos níveis de glicose, creatinina e uréia. Os níveis de ácido úrico foram semelhantes estatisticamente tanto no soro quanto no líquido hidrocelico somente nos indivíduos amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos. Apesar de o líquido hidrocelico ser considerado um filtrado do plasma, não ocorreu seletividade nos parâmetros bioquímicos de glicose, uréia, creatinina e ácido úrico. Possivelmente, a microfilaria esteja envolvida no processo de livre passagem desses elementos do soro para a cavidade escrotal. Apesar dos 10 indivíduos portadores de hidrocele envolvidos no estudo serem negativos para bancroftose não podemos afastar a etiologia filarial nesse processo fisiopatológico uma vez que esses indivíduos residem em área de grande prevalência da doença.

PALAVRAS-CHAVE – Hidrocele, bioquímica do líquido hidrocelico.

SUMMARY – This study evaluates biochemically samples of hydrocele fluid from individuals living in endemic areas of bancroftian filariasis, using as reference samples serum from the same individuals. There was a significant difference ($p < 0,05$) in the levels of protein, albumin, globulin, calcium, ALT, AST, cholesterol, triglyceride, DHL and alkaline phosphatase in the serial samples when compared with the hydrocele fluid. On the other hand, there was no significant difference ($p > 0,05$) in the levels of glucose, creatinine, and urea. The levels of uric acid were similar in both the serum and hydrocele fluid. Even though the hydrocele fluid was considered a filtrate of the plasma, there was no section in the biochemical parameters of glucose, urea, creatinine and uric acid. Possibly, the filarial was involved in this process of free passage of these elements from the serum into the scrotal cavity. Even though the individuals without microfilaria and adult live worms were negative for filariasis they could not be removed from etiological filarial in the physiological process of the hydrocele since they reside in the area of high prevalence of the disease.

KEYWORDS – Hydrocele, biochemically of hydrocele fluid.

INTRODUÇÃO

A *Wuchereria bancrofti* é um parasito da classe nematoda, que possui a particularidade de só infectar o ser humano. A doença causada por este parasito é denominada de bancroftose¹. Esta doença é considerada como um importante problema de saúde pública, afetando cerca de 115 milhões de indivíduos que vivem em regiões de clima tropical e subtropical em aproximadamente 80 países ao redor do mundo². A transmissão ocorre através da picada do mosquito fêmea em sua forma infectante (L3) que, na maioria das regiões do mundo, é o *Culex quinquefasciatus*. As L3 possuem atração, ainda não bem esclarecida até o momento, pelo sistema linfático³, onde irão estabelecer-se até o seu estágio adulto. Os vermes adultos apresentam sexos distintos e habitam o sistema linfático (vasos de transporte e linfonodos)⁴. Após a cópula, a fêmea libera para a circulação sanguínea as formas embrionadas chamadas microfíliarias.

A manifestação da doença é complexa, dependendo, dentre outros fatores, do estágio do parasito e da resposta imunológica do indivíduo, acarretando as mais diversas formas clínicas. A hematúria e a eosinofilia pulmonar tropical ou EPT

são causadas pela microfilaria, e as demais formas agudas (linfangites e linfadenite) e as crônicas (hidrocele, quilocele, linfo-escroto, quilúria e linfedema) são causadas pelo estágio adulto do parasita⁵.

A forma clínica da hidrocele está presente nos indivíduos que vivem nas regiões tropicais de todo mundo, e decorre do acúmulo de líquido entre o testículo e a membrana que o envolve, denominada de túnica vaginal⁶. Este líquido é geralmente de cor amarelo claro e tem sua origem na filtração passiva do plasma por filtração capilar⁶. A hidrocele é considerada uma das seqüelas da bancroftose nas áreas endêmicas. É a mais comum expressão clínica crônica da doença no sexo masculino chegando a comprometer cerca de 40-50% dos homens que vivem nas áreas onde a *W. bancrofti* é endêmica⁷.

O conteúdo do líquido hidrocelico intriga os urologistas desde o século XV, quando, Ambroise Paré (1510-1590), foi o primeiro a descrever sobre o assunto⁸.

Vários autores, dentre eles Madlala⁸, têm estudado a composição bioquímica do líquido hidrocelico em indivíduos de área não endêmica de filariose. Entre os vários parâmetros estudados, os autores demonstraram que a elevação da presença de proteínas no líquido hidrocelico pode ser

Recebido em 22/10/2003

Aprovado em 29/1/2004

¹Biomédico- Patologista Clínico- Menstrando do Curso de Antomia Patológica; ²Hospital Getúlio Vargas - Serviço de Cirurgia e Urologia, Recife, Brasil.

³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Departamento de Parasitologia- Serviço de Referência Nacional em Filariose; ⁴Laboratório Central de Análises Clínicas da Prefeitura Municipal do Recife; ⁵Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Núcleo de Saúde Coletiva, FIOCRUZ, Recife, Brasil

um dos fatores que podem aumentar a pressão osmótica dentro da bolsa escrotal, fazendo com que ocorra um acúmulo de líquido nesta região. Por outro lado, até o momento, nenhum trabalho tem demonstrado se o processo ocorre nos indivíduos de área endêmica de filariose.

Com o advento da ultra-sonografia para identificação de vermes adultos vivos de *W. bancrofti*, foi possível detectar indivíduos microfilarêmicos, na sua grande maioria assintomáticos, portadores de vermes adultos vivos em linfáticos localizados na região escrotal⁹. Entretanto, em um determinado grupo de indivíduos não se detectam microfíliarias circulantes em sangue periférico, mesmo examinando-se volumes de até dezesseis ml¹⁰. Nesse grupo, a ultra-sonografia e a pesquisa de antígeno filarial utilizando os monoclonais Oq4C3 e AD12^{11,12}, tornam-se ferramentas diagnósticas de fundamental importância, pois nenhuma outra metodologia conseguiria diagnosticá-los^{13,14,15}.

No presente trabalho, avaliamos diversos níveis bioquímicos de amostras pareadas no soro e líquido hidrocélico de indivíduos residentes em área endêmica para bancroftose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados indivíduos portadores de hidrocele que vivem em área endêmica de filariose, atendidos no Serviço de Referência Nacional em filariose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), e que seguiram o protocolo de rotina (clínicos e laboratoriais vigentes no serviço), utilizado no Ambulatório de Doenças Tropicais e do Serviço de Referência Nacional em Filariose do CPqAM. Os indivíduos foram divididos em três grupos de acordo com a caracterização parasitológica da infecção filarial: Grupo I - indivíduos amicrofilarêmicos e sem vermes adultos detectados em linfáticos de bolsa escrotal; Grupo II - indivíduos portadores de microfíliaria circulante e com vermes adultos detectados em linfáticos de bolsa escrotal; Grupo III - indivíduos amicrofilarêmicos e com vermes adultos vivos detectados em linfáticos de bolsa escrotal.

Para a caracterização parasitológica, todos os indivíduos foram submetidos à ultra-sonografia de bolsa escrotal para confirmação ou não do "Sinal da Dança da Filária"⁹ e ao exame de pesquisa e quantificação de microfíliaria. A pesquisa de microfíliaria foi realizada em 1ml de sangue venoso, com horário de coleta entre 23:00 e 01:00h da manhã, posteriormente filtrado através de uma membrana de policarbonato com 13mm de diâmetro e com poro de 3mm¹⁶. A membrana foi fixada com álcool metílico, corada com hematoxilina de Carrazzi e examinada sob microscopia óptica com aumento de 160X. Nos casos de indivíduos amicrofilarêmicos, amostras adicionais de 5ml e, posteriormente de 10ml, totalizando um volume final de 16ml, seriam coletadas com um intervalo de uma semana, caso o indivíduo permanecesse negativo na avaliação anterior¹⁰. Amostras de 10ml de sangue foram coletadas em período simultâneo da obtenção do líquido hidrocélico (por hidrocelectomia ou por punções de bolsa escrotal) e posteriormente centrifugadas a 2.500rpm por 10min, a 20°C. As amostras foram alíquotadas (no volume de 500ml por alíquota), identificadas e armazenadas (a -20°C), no banco de espécimes biológicos (BEB) do Serviço de Referência Nacional em Filariose do CPqAM.

As amostras foram colhidas entre o período de 1993 – 1995, vinculado ao um projeto aprovado pela comissão de ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federais de Pernambuco e estocadas no BEB, estas amostras foram processadas e analisadas em paralelo e duplo cego no Laboratório Central de Análises Clínicas da Prefeitura Municipal do Recife no equipamento Cobas Integra 700 a 37°C, com comprimento da faixa de luz entre infravermelho e o visível, utilizando os reagentes de procedência americana (Roche, USA). Foram realizados os seguintes parâmetros bioquímicos: uréia; creatinina; cálcio; triglicerídeo; proteínas

totais; albumina; globulina; glicose; colesterol; ácido úrico; fosfatase alcalina (FA); aspartato aminotransferase (AST); alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) totalizando 322 testes.

Para a análise estatística utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras sorológicas e seus respectivos líquidos hidrocélicos pareadas por grupo, tendo como nível de confiabilidade de 95% ($p < 0,05$).

O projeto que gerou essa pesquisa foi submetido vinculado ao um projeto aprovado pela comissão de ética e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

RESULTADOS

Um total de 23 indivíduos com idade média de 31,3 (16-75) anos portadores de hidrocele, residentes na Região Metropolitana do Recife foram agrupados de acordo com a caracterização parasitológica da infecção filarial (Tab.I). A maioria dos indivíduos 13/23 (56.5%) eram portadores da infecção filarial (Tab.I). Os indivíduos microfilarêmicos apresentaram média de densidade de microfíliaria de 268 (1-1245) mf/ml

No Gráf. 1 observa-se que a distribuição por grupo etário dos indivíduos portadores de hidrocele ficou concentrada em cerca de 70% entre 20-39 anos, ocorrendo uma queda significativa ($p=0,0003$) após esta faixa etária.

O volume do líquido hidrocélico punccionado da bolsa escrotal variou de 14 a 500ml. Todos apresentaram coloração amarela citrino. Enquanto, o volume de soro variou de 6 a 8ml.

Amostras sorológicas e seus respectivos líquidos hidrocélicos foram analisados bioquimicamente de forma pareada por grupo.

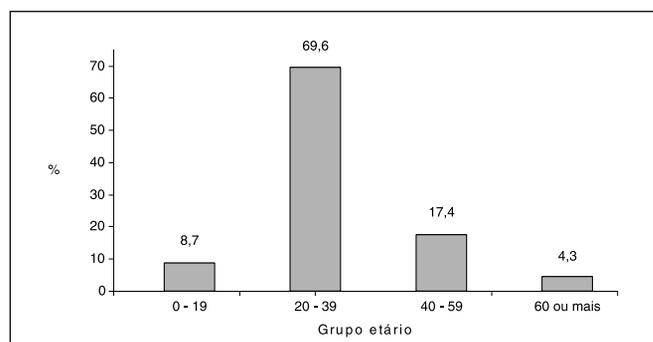
Nos três grupos estudados, os níveis de proteína, albumina, globulina, cálcio, ALT, AST, colesterol, triglicerídeo, LDH, FA, glicose, ácido úrico, creatinina e uréia foram mais elevados no soro, em relação aos seus respectivos líquidos hidrocélicos.

Apesar dos níveis dos parâmetros bioquímicos estudados, serem mais elevados no soro do que no líquido hidrocélico, estatisticamente não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos parâmetros bioquímicos de glicose, creatinina e uréia quando comparados com o líquido hidrocélico

TABELA I
Número de indivíduos amicrofilarêmicos e não portadores de verme adultos (MF- VA-), microfilarêmicos e portadores de vermes adultos (MF+ VA+) e amicrofilarêmicos e portadores de verme adultos (MF- VA+) diagnosticados pela filtração em membrana de policarbonato e Ultra-som

CP ^a	Nº de indivíduos	FN ^c	US ^d
Grupo I (MF-VA-)	10 (43,5%)	Negativo	Negativo]
Grupo II (MF+VA+)	8 (34,8%)	Positivo	Positivo
Grupo III (MF-VA+)	5 (21,7%)	Negativo	Positivo
Total	23 (100%)	-	-

a - Caracterização parasitológica; b - Número; c - Filtração noturna; d - Ultra-sonografia



GRÁF. 1 - Distribuição por grupo etário dos indivíduos portadores de hidrocele.

em cada grupo estudado. Entretanto, os níveis de ácido úrico foram semelhantes estatisticamente tanto no soro quanto no líquido hidrocélico somente no grupo III ($p=0,138$).

Analisando os parâmetros bioquímicos entre os grupos, verificamos que no líquido hidrocélico do grupo I *versus* o grupo III ocorreu diferença significativa nas dosagens AST ($P=0,030$), ALT ($P=0,045$) e LDH ($P=0,045$).

DISCUSSÃO

Os dados do presente trabalho relatam de forma pioneira a análise bioquímica do líquido hidrocélico dos indivíduos vivendo em área de bancroftose. Hoshino¹⁷ foi o primeiro a estudar a composição do líquido hidrocélico. Os autores fizeram uma comparação entre o líquido hidrocélico oriundo de indivíduos portadores de hidrocele idiopática frente aos soros de indivíduos normais, ambos de área não endêmica de filariose. Dentre os vários parâmetros bioquímicos estudados os autores destacaram os níveis de creatinina elevados no líquido hidrocélico quando comparados aos soros. Entretanto, os dados do presente trabalho demonstram que não houve diferença significativa entre as amostras estudadas nos níveis da creatinina, glicose, uréia nos três grupos estudados. Possivelmente isso seja decorrente da dilatação dos vasos linfáticos onde estão localizados os vermes adultos de *W. bancrofti* fazendo com que haja uma alteração mecânica (movimentos intensos dos vermes adultos no interior do vaso) ou bioquímica (elementos secretórios e excretórios dos vermes adultos e microfíliarias) na permeabilidade tanto do vaso linfático quanto do vaso venoso presente na parede da bolsa escrotal, ocorrendo desta forma livre trânsito deste composto orgânico entre os vasos e a cavidade escrotal.

No presente trabalho verificou-se que os níveis de concentrações dos parâmetros bioquímicos estudados foram maiores no soro em comparação com o líquido hidrocélico estando em concordância com os achados de Madlala⁸. Exceção se fez nos níveis de proteínas, onde os referidos autores verificaram que a concentração de proteína no líquido hidrocélico foi maior que no soro. Na análise interespecífica dos parâmetros bioquímicos no líquido hidrocélico dos três grupos estudados verificamos que ocorreu diferença estatisticamente significativa nas dosagens dos parâmetros de AST, ALT e LDH entre os grupos I e III.

Não houve diferença significativa nos níveis de ácido úrico entre os indivíduos amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos (grupo III). Achado semelhante também ocorreu entre os indivíduos portadores de hidrocele idiopática de área não endêmica de filariose¹⁷. Provavelmente os indivíduos do grupo III diferiram dos outros dois grupos I e II, por estarem infectados somente pelos vermes adultos de um único sexo ou por parasitas estéreis. Somado a esta informação até o momento não se sabe qual o papel da microfíliaria na patogênese das várias formas clínicas da bancroftose, dentre elas a hidrocele (com exceção da hematúria e a eosinofilia pulmonar tropical)¹. A ausência da microfíliaria nos indivíduos com a forma clínica de hidrocele portadores de vermes adultos *per se* faria com que elementos excretórios ou secretórios dos parasitas fossem mais prejudiciais à parede dos vasos linfáticos facilitando assim a passagem livre, não seletiva, dos elementos orgânicos de creatinina, glicose, uréia e ácido úrico?

Interessantemente, 70% da faixa etária dos pacientes envolvidos no trabalho está entre de 20 a 39 anos de idade, o qual compreende o período produtivo do homem, esta informação é extremamente importante principalmente no aspecto sócio-econômico. Em decorrência das formas crônicas da bancroftose a Índia e África, países de elevados números de indivíduos com esta parasitose, deixam anualmente de produzir para as suas economias internas cerca de um bilhão de dólares por ano^{18,19}. Na África, mais de 80% dessas perdas são decorrentes as formas debilitantes da hidrocele. Na Índia aproximadamente 7-8% dos homens não conseguem empregos formais em decorrência de doenças crônicas envolvendo a bolsa

escrotal^{20,19}. No Brasil até o momento não se tem dados estatísticos nas áreas endêmicas (Belém-PA, Maceió-AL, e Recife-PE) para aferir o número de homens portadores de hidrocele que não conseguem um emprego formal.

Diante dos dados acima apresentados ainda não se pode afirmar com certeza qual a participação da filaria na patogênese da hidrocele principalmente na alteração da permeabilidade da membrana tanto dos vasos linfáticos (habitat dos vermes adultos) quanto dos vasos sanguíneos, entretanto, existe um consenso de que o número de portadores de hidrocele é bem mais frequente nas áreas onde co-existe a *W. bancrofti* do que nas áreas livres deste parasito^{7,18}.

Sendo assim, verificamos que o líquido hidrocélico oriundo de indivíduos vivendo em área endêmica de filariose não parece ser um filtrado do plasma por não ter ocorrido uma seletividade dos compostos orgânicos tais como: glicose, uréia, creatinina e ácido úrico, como tem sido demonstrado em trabalhos anteriores oriundos de área não endêmica de bancroftose^{17,8}.

Desta forma trabalhos precisam ser direcionados no sentido de melhor conhecer e estudar com profundidade os fatores biológicos envolvendo a microfíliaria (ação irritativa da parede dos vasos) ou mecânicos (movimento dos vermes adultos no interior dos vasos linfáticos) que possam alterar a permeabilidade do vaso linfático e sanguíneo fazendo com que estes sistemas percam a capacidade de seletividade dos compostos orgânicos e a repercussão dos mesmos no processo histopatológico da formação da hidrocele de origem filarial.

REFERÊNCIAS

- 1 - Rocha, A. Métodos laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da filariose bancroftiana. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v.32, n. 4, 2000.
- 2 - Michael, E., Bundy, D. A. P., Grenfell B.T. Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. Parasitology, v. 112, p. 409-428, 1996.
- 3 - Dreyer, G., & Rocha, A. Filariose bancroftiana. In: Ferreira, W., & Ávila, S. Diagnóstico Laboratorial. Avaliação de métodos de diagnósticos das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. Correlação clínico-laboratorial. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996a. cap.22, p.194-200.
- 4 - Ottesen, E. A. Filarial infections. Infection Diseases Clinics of North America, v.7, p. 619-633, 1993.
- 5 - Bhatnagar, B. N. S., Dube, B., Shukla, A., P. Testicular Histology in Tropical Vaginal Hydrocele. International Surgery, v. 53, p. 167-170, 1970.
- 6 - Addiss, D., G. Dreyer, G. Treatment of lymphatic filariasis. In: Nutman, T., B. Lymphatic Filariasis, 1st ed. London: Tropical Medicine, Cap.- 7, p. 151-199, 2000.
- 7 - Kumaraswami, V. The clinical manifestations of lymphatic filariasis. In: Nutman, T., B. Lymphatic Filariasis, 1st ed. London: Tropical Medicine, 2000. Cap. 5, p. 103-125.
- 8 - Madlala T.S.I., Rencken R.K., Bornman M.S., M.S., Reif S., Joubert H.F. Biochemical analysis of tunic vaginal fluid in patients with or without idiopathic hydroceles. British Journal Urology, v. 74, p. 511-514, 1994.
- 9 - Amaral, F., Dreyer, G., Samico, S. C., Santos, A., Coutinho A. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.50, p.753-757, 1994.
- 10 - Dreyer, G., Brandão, A. C., Amaral, F., Medeiros, Z. & Addiss, D., Detection by ultrasound of living adult *Wuchereria bancrofti* in the female breast. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, n. 91, p. 95-96, 1996b.
- 11 - More, S., J., Cooperman, D., B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. Tropical Medicine and Parasitology, v. 41, p. 403-406, 1990.
- 12 - Weil, G. J., Lammie, P. J. & Weiss, N. The ICT filariasis test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. Parasitology Today, v. 13, p. 401-404, 1997.
- 13 - Chanteau, S., Moulia-Pelat, J., P. Glaziou, N. L. Og4C3 circulating antigen: A marker of infection and adult worm burden in *Wuchereria bancrofti* filariasis. Journal of infectious diseases, v. 170, p. 247-250, 1994.
- 14 - Rocha, A., Addiss, D., Ribeiro, M. E., Norões, J., Baliza, M., Dreyer, G. Evaluation of the OG4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: Infected persons with undetectable or ultra-low microfilarial densities. Tropical Medicine and International Health, v. 1, p. 859-864, 1996.
- 15 - Rocha, A., Junqueira Ares, C., Frtado, A. Molecular Approach in the diagnosis of lymphatic filariasis by *Wuchereria bancrofti*. Revista de Patologia Tropical, v. 31(2), p. 161-174, 2002.
- 16 - Chularerak, P., Desowitz, R., S. A Simplified membrane filtration technique for the diagnosis of microfilariaemia. Journal of Parasitology, v. 56, p. 623-624, 1970.
- 17 - Hoshino, H., Nakajima, N., Hihara, T., Hayakawa, M., Kawamura, N. What are the contents of a hydrocele testis? Tokai Journal Exp. Clin. Medicine, v. 9, n. 1, p. 49-51, 1984.
- 18 - Ramaiah, K., D., Das, P. K., Michael, E., Guyatt, H. The economic burden of lymphatic filariasis in India. Parasitology Today, v. 16, n. 6, p. 251-253, 2000.
- 19 - Hadix, A. C., Kestler, A. Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem. Lymphatic filariasis: economic aspects of the disease and programmes for its elimination. Trans R Soc Trop Med Hyg n. 94, p. 592-593, 2000.
- 20 - Ramu, K., Ramaiah, K., D. Guyatt, H. & Evans, D. Impact of lymphatic filariasis on the productivity of male weavers in a south indian village. Trans R Soc Trop Med Hyg n. 90, p. 669-670, 1996.

Endereço para correspondência

Dr. Abraham Rocha - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Depto. de Parasitologia/Coordenador do Serviço de Referência Nacional de Filariose
Av. Moraes Rego, S/N, Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife - Brasil
Tel: (0xx81)3301-2575 - fax (0xx81)3453-2449 - E-mail: rocha@cpqam.fiocruz.br

Perfil de sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* isolados em pacientes internados

Sensibility profile of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus negative coagulase* strains isolated from inpatients

Jucelene Marchi Blatt¹ & Carmela Elandia Piazza²

RESUMO – O *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (ORSA) é atualmente um problema nos hospitais brasileiros, assumindo um importante papel no cotidiano de uma instituição com relação a vigilância do seu perfil de sensibilidade. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de resistência do *Staphylococcus aureus* e *coagulase negativo* (SCN) em diferentes espécimes clínicos de pacientes hospitalizados no Hospital Maternidade Marieta Konder Bornhausen - Itajaí-SC. Foram analisadas 145 amostras de *Staphylococcus sp.*, no período de dezembro de 2001 à dezembro de 2002, isoladas em ágar-sangue e identificadas por meio de coloração de Gram, provas de catalase, manitol e staphy test. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi o disco de difusão descrito por Kirby-Bauer. A frequência de *Staphylococcus aureus* e SCN observada nos diferentes espécimes clínicos, demonstrou que o SCN foi predominante nas hemoculturas e *S. aureus* nas secreções em geral. Com relação ao perfil de sensibilidade do *Staphylococcus aureus* observamos que este microrganismo apresentou 37% de resistência à oxacilina, o *Staphylococcus coagulase negativo* demonstrou 66% de resistência a este antibiótico nas diversas amostras clínicas. As amostras ORSA e ORSCN foram geralmente resistentes também aos antimicrobianos como os β -lactâmicos, macrolídeos, lincosaminas, aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas e sulfas usualmente utilizados na terapêutica. A ocorrência de *Staphylococcus aureus* nas amostras clínicas foi maior que *Staphylococcus coagulase negativo* mas, este último apresentou um perfil de resistência maior à oxacilina. Assim, evidenciamos a necessidade da vigilância com relação ao perfil de resistência destes microrganismos em isolados de amostras clínicas nosocomiais.

PALAVRAS-CHAVE – *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus coagulase negativo*, oxacilina.

SUMMARY – Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) is actually a problem in the Brazilian hospitals, being most important in the daily institution with relationship with the surveillance of its sensibility profile. The objective of this work was to analyze the *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus sp.* its resistance profile in different clinical specimens of intern patients at the Hospital Maternidade Marieta Konder Bornhausen - Itajaí-SC. Samples of coagulase negative *Staphylococcus sp.* were analyzed between December, 2001 to December, 2002 and isolated in agar-blood and identified by means of Gram coloration, catalase tests, manitol and staphy test. The sensibility test to the antimicrobials were made through the diffusion disk described by Kirby-Bauer. The frequency of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus sp.* observed in the different clinical specimens, demonstrated that coagulase negative *Staphylococcus sp.* was in general predominant in the hemocultures and *S. aureus* in the secretions. To the sensibility profile of the *S. aureus* it was observed that this microrganism were presented in 37% to oxacillin, resistance coagulase negative *Staphylococcus sp.* demonstrated 66% of resistance to this antibiotic in several clinical samples. The samples ORSA generally be resistant to countless antimicrobials as the β -lactams, macrolides, lincosamides, aminoglycosides, tetracyclins, quinolones and trimeth-sulfa usually used in the therapeutics. The occurrence of *Staphylococcus aureus* in the clinical samples was higher than negative coagulase *Staphylococcus* but, this last one presented a resistance profile higher to oxacillin. Thus, we evidenced the need of the surveillance with relationship to the profile of resistance of these microorganisms in isolated of specimens clinics hospital.

KEYWORDS – *Staphylococcus aureus*; negative coagulase *Staphylococcus*, oxacillin.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a drogas revela um sério problema de saúde pública e precisa de medidas de controle urgentes para reduzir ao máximo a pressão seletiva aos antimicrobianos.

O *Staphylococcus aureus* é um agente etiológico de infecções adquiridos na comunidade assim como em hospitais, é a espécie mais virulenta dos *Staphylococcus sp.*, apresentando uma ampla gama de fatores que contribuem para essa virulência, como as toxinas e enzimas que mediam a invasão tecidual e a sobrevivência no sítio da infecção⁹.

Apesar de estarem associados a variados tipos de infecções, os *Staphylococcus sp.* usualmente colonizam a pele e as mucosas do corpo. Por isso, as infecções freqüentemente resultam da introdução dessas cepas em locais previamente estéreis, após um trauma, abra-

são da pele ou mucosas ou durante procedimento cirúrgico. Muitas das infecções, mesmo as superficiais, podem se tornar potencialmente fatais se não tratadas prontamente².

Os *Staphylococcus sp.* também podem ser transmitidos de pessoa a pessoa, sendo portanto este contato interpessoal um dos fatores disseminadores no ambiente hospitalar, particularmente quando as cepas envolvidas forem multirresistentes aos antibióticos¹¹.

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, tanto hospitalares quanto domiciliares, apresentam morbidade e mortalidade elevadas. O aumento crescente da frequência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) e a possibilidade do aparecimento de amostras resistentes à vancomicina tornam importante o desenvolvimento de novas drogas com atividade antiestafilocócicas⁵.

Os antibióticos mais utilizados para o tratamento

Recebido em 24/10/2003
Aprovado em xx/xx/xxxx

¹Bioquímica do Laboratório Escola da UNIVALI, setor de microbiologia & ²Aluna de Farmácia Habilitação em Análises Clínicas - UNIVALI

de infecções por este microrganismo são os beta-lactâmicos, que atuam ligando-se nas chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PLPs). Essas proteínas são enzimas diretamente relacionadas com a síntese da parede celular das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ao se ligar nessas proteínas (PLPs), os beta-lactâmicos provocam um prejuízo na síntese da parede celular o que vai resultar na morte bacteriana¹¹.

As alterações das proteínas fixadoras podem ocorrer por um processo controlado por um único gene *MecA* que codifica para variante PLP2a de *Staphylococcus aureus*. Estes *Staphylococcus* produzem PLPs diferenciadas, que tem baixa afinidade pelos beta-lactâmicos diminuindo sua ação³.

Muitas cepas de ORSA têm se mostrado resistentes também aos demais antibióticos como eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, sulfatrimetoprim, o que dificulta o tratamento e controle dessas infecções. Nos casos de cepas resistentes à oxacilina, opta-se pelo uso da vancomicina, que é ativa contra essas bactérias. Entretanto, já foram reportados casos de *Staphylococcus aureus* resistentes a esta droga¹⁴.

O presente estudo portanto, tem como objetivo, o de verificar o perfil de sensibilidade do *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* e sua frequência em isolados de espécimes clínicos de pacientes internados no hospital Maternidade Marieta Konder Bornhausen (HMMKB)- Itajaí-SC.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 145 amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* as quais foram isoladas de secreções em geral, hemocultura, ponta de cateter e outros materiais clínicos de pacientes internados no HMMKB, no período de dezembro de 2001 a dezembro de 2002. Estas amostras foram processadas no Laboratório Escola de Análises Clínicas da UNIVALI - Itajaí-SC, no setor de microbiologia clínica.

As amostras clínicas foram coletadas conforme procedimento padrão para cada espécime clínico, utilizou-se frascos de hemocultura adulto e pediátrico, frascos estéreis para coleta de urina e ponta de cateter e meio de Stuart sem carvão para coleta de secreções em geral.

As cepas de *Staphylococcus sp.* foram isoladas em ágar-sangue e identificadas por meio de coloração Gram, provas de catalase, manitol e staphy test.

O método utilizado para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi o disco de difusão descrito por Kirby-Bauer, segundo as normas preconizadas pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1998). A padronização do inóculo foi feito com uma suspensão bacteriana com turvação conforme a escala de McFarland 0,5%.

O perfil de sensibilidade à oxacilina foi realizada através do Agar screening para ORSA. Estes procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar.

RESULTADOS

A Tab. 1 em anexo, apresenta a frequência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp. coagulase negativo* nas 145 amostras analisadas, nos diferentes espécimes clínicos, sendo que a maioria das secreções estavam infectadas por *S. aureus*. Nas amostras obtidas de hemoculturas positivas, a ocorrência de SCN foi superior aos demais sítios.

Na Tab. 2, o percentual de ORSA observado de acordo com o espécime clínico, evidenciou que das 103 amostras de *Staphylococcus aureus*, apenas 5 foram isoladas de hemocultura, sendo que estas não apresentaram resistência à oxacilina, 84 (82%) foram isoladas de secreções em geral, e destas, 30% apresentaram resistência à oxacilina. Em isolados de ponta de cateter, em um total de 7 amostras, 3 foram resistentes. A Tab. II demonstra que a maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* foram isolados de secreções em geral (82%) e o total de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina foi de 37% nos diversos espécimes clínicos.

A Tab. III apresenta o perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus coagulase negativo* e das 42 amostras positivas, 28 (68%) foram isoladas de hemoculturas, sendo que 40% destas foram resistentes à oxacilina. As amostras de secreções representaram 7 (16%) dos isolados para *Staphylococcus coagulase negativo*, e 14% também foram resistentes, como também dos isolados de ponta de cateter, 7 (16%), 12% também apresentaram resistência.

De acordo com a Tab. IV, a resistência aos antibióticos conferida pelo *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina foi mais evidente frente à clindamicina e eritromicina seguida pelo aminoglicosídeo (gentamicina), sulfametoxazol/ trimetoprim e quinolonas (ciprofloxacina).

Na Tab. V, com relação aos *Staphylococcus coagulase negativo* oxacilina resistente (ORSCN) pode-se observar uma tendência à resistência também aos grupos de antibi-

TABELA I
Frequência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) de acordo com o espécime clínico Itajaí, dez/2001 a dez/2002 (n = 145)

Espécime clínico	<i>S. aureus</i>		SCN	
	Nº	%	Nº	%
Hemocultura	5	5	28	67
Secreções em geral	85	82	7	16,5
Ponta de cateter	7	7	7	16,5
Outros	6	6	-	-
Total	103	100	42	100

TABELA II
Perfil de sensibilidade do *Staphylococcus aureus* à oxacilina de acordo com o espécime clínico Itajaí, dez/2001 a dez/2002 (n = 103)

Espécime clínico	Sensível		Resistente	
	Nº	%	Nº	%
Hemocultura	5	5	0	0
Secreções em geral	54	52	31	30
Ponta de cateter	4	4	3	3
Outros	2	2	4	4
Total	65	63	38	37

TABELA III
Perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus coagulase negativo* à oxacilina de acordo com o espécime clínico Itajaí, dez/2001 a dez/2002 (n = 42)

Espécime clínico	Sensível		Resistente	
	Nº	%	Nº	%
Hemocultura	12	28	16	40
Secreções em geral	1	2	6	14
Ponta de cateter	2	4	5	12
Total	15	34	27	66

TABELA IV
Perfil de sensibilidade do *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e aos outros antibióticos testados Itajaí, dez/2001 a dez/2002 (n=38)

Antibióticos	Resistente	
	Nº	%
Clindamicina	34	89
Eritromicina	33	87
Gentamicina	25	66
Ciprofloxacina	22	58
Sulfametoxazol / trimetoprim	25	66
Tetraciclina	21	55

TABELA V
Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus coagulase negativo* resistente à oxacilina e aos outros antibióticos testados Itajaí, dez/2001 a dez/2002 (n = 27)

Antibióticos	Resistente	
	Nº	%
Clindamicina	9	33
Eritromicina	18	67
Gentamicina	13	48
Ciprofloxacina	11	41
Sulfametoxazol / trimetoprim	11	41
Tetraciclina	4	15

óticos utilizados como os macrolídeos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfas e, em menor proporção à tetraciclina.

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas o *Staphylococcus aureus* têm adquirido papel de destaque, não só por ser um patógeno humano responsável por infecções superficiais e sistêmicas, que atingem indivíduos em diferentes faixas etárias, como também pela sua multirresistência aos antimicrobianos, usualmente utilizados na terapêutica⁹.

Como evidenciado no presente estudo, estes microrganismos foram responsáveis por infecções em diversos espécimes clínicos em pacientes internados.

O *Staphylococcus coagulase negativo* apesar de fazer parte da microbiota normal da pele, vem ganhando importância, estando relacionado ao aumento de morbidade em doentes internados em UTI e berçários de alto risco¹³.

O *Staphylococcus aureus* foi mais prevalente em isolados de secreções em geral, representando 82% dos casos. O seu perfil de sensibilidade frente ao antibiótico oxacilina foi de 63% e apresentando portanto, 37% de resistência a este antibiótico.

De acordo com o programa Sentry, a resistência do *S. aureus* em alguns hospitais brasileiros está em torno de 34% e do *S. coagulase negativo* 80%¹⁸.

Em comparação com *Staphylococcus coagulase negativo*, podemos observar que este microrganismo foi mais prevalente em hemoculturas com 68%, seu perfil de sensibilidade a oxacilina foi de 34% e a resistência a este antibiótico foi de 66%.

Podemos observar que, a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em isolados foi maior que *Staphylococcus coagulase negativo* mas, este último apresentou um perfil de resistência à oxacilina superior, e sendo este microrganismo isolado mais freqüente em hemoculturas, revela a necessidade da vigilância com relação ao seu perfil de sensibilidade.

Essas infecções nosocomiais por ORSA representam um grande problema para as instituições de saúde, visto que os fatores predisponentes a essas infecções são: tratamento antimicrobiano prévio, internação prolongada, ventilação mecânica, internação em UTI, cateterismo intravascular e ferimentos em tecidos moles¹⁹. Estudos realizados nos Estados Unidos mostraram que este patógeno foi a principal causa de infecção em unidades hospitalares, e a sua incidência aumentou de 2,4% para 29% entre 1975 e 1991, e atualmente está em torno de 40%. Na Inglaterra os índices aumentaram de 1,5% para 13,2% entre 1989 e 1995, sendo que em 1996 foi de 21,1%, embora a proporção varie enormemente de instituição para instituição e de países¹⁴. O *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (ORSA) é um dos principais agentes das infecções hospitalares em nosso meio. No Hospital São Paulo o ORSA é endêmico, representando cerca de 65% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas, ocasionando morbidade, mortalidade e custos consideráveis⁸. O controle da disseminação dessa bactéria nos hospitais exige a adoção de medidas específicas¹⁵.

O isolamento de *Staphylococcus coagulase negativo* em materiais clínicos, deve ser avaliada pois esta bactéria pode tanto ser um contaminante da pele quanto um causador de bacteremia, posteriormente à colonização de cateteres¹⁰.

O *Staphylococcus coagulase negativo* foi mais prevalente em isolados de hemoculturas (68%), isto talvez deve-se ao uso de cateteres intravenosos, quando a barreira da pele é rompida, quanto mais tempo permanecerem no local, maior o risco de infecção local e bacteremia. O risco de infecção relacionada ao cateter intravenoso é geralmente influenciado pelo tipo de cateter e a duração da cateterização¹¹. Neste estudo obser-

vamos que 16% do total de amostras de *Staphylococcus coagulase negativo* foram isolados de ponta de cateter.

Em relação ao perfil de resistência antibiótica nos isolados de ORSA e ORSCN, observamos que ocorre também uma resistência múltipla aos outros grupos de antibióticos¹⁸. A avaliação do padrão de sensibilidade aos aminoglicosídeos se faz importante, uma vez que essa classe de antimicrobianos pode ser utilizada em associação com β -lactâmicos ou glicopeptídeos como a vancomicina para o tratamento de infecções graves¹¹.

O padrão de sensibilidade à sulfametoxazol/ trimetropim pode variar bastante, enquanto alguns estudos apresentam alta sensibilidade das amostras ORSA, outros trabalhos mostram que esse patógeno tende a ser resistente à sulfametoxazol/trimetropim⁴. Neste trabalho foram encontrados 66% (ORSA) e 41% (ORSCN) de amostras resistentes.

O antibiótico ciprofloxacina mostrou baixa atividade contra isolados ORSA evidenciando a aquisição de resistência por parte desse microrganismo às quinolonas⁶.

São vários os mecanismos pelos quais o *Staphylococcus aureus* desenvolve resistência às quinolonas. O mecanismo mais importante e mais freqüente é decorrente da alteração do sítio de ação desses antimicrobianos (DNA girase) e se deve a mutações no gene Gyr A⁷. Com relação aos macrolídeos representados pela eritromicina, também evidenciamos uma sensibilidade diminuída em isolados de ORSA e ORSCN.

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que a resistência à oxacilina no HMMKB é evidente em isolados de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo*, contribuindo também para a resistência a outros grupos de antibióticos.

O laboratório de microbiologia desempenha um papel importante não somente na detecção da resistência aos antimicrobianos de uso clínico como também, na vigilância do perfil de sensibilidade dos microrganismos considerados problema de uma instituição.

REFERÊNCIAS

1. Scoott, J.R. Sex and the single circle: conjugative transposition. *J Bacteriol.* 174: 6005-6010, 1992.
2. Waldvogel, F. A: chapter 173. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. (eds), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th ed, pp 1754-1777, 1995.
3. Jacoby, G.A. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Ann Rev Medicine.* 47: 169-79, 1996.
4. Chambers, H. F. Methicillin-resistant *Staphylococcus*. *Clin Microbiol. Rev.* 1: 173-83, 1998.
5. 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, 1993.
6. Peterson L. R.; Quick J. N.; Jensen B. et al. Emergence of ciprofloxacin resistance in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Arch Intern Med.* 150: 2: 151-5, 1990.
7. Trucksis M.; Wolfson J. S.; Hooper D. C. A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 173: 5: 854-60, 1991.
8. Freitas M. R. Análise de custo-efetividade das medidas para prevenção e controle de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina em unidade de terapia intensiva. São Paulo; s.n: 112, 2000.
9. Kruszynska, E.; Bialek, M.; Janicka, et al. Susceptibility to antibiotics of *Staphylococcus aureus* strains. *Med Dosw Microbiol.* 49: 141-4, 1997.
10. Garrett, D. O.; Jochimsen, E.; Murfit, K.; et al. The emergence of decreased susceptibility to Vancomicina in *Staphylococcus epidermidis*. *Infection Journal of Medicine.* 20: 167-170, 1999.
11. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; et al. Diagnóstico microbiológico. 5th. Edition, 2001.
12. Schwalbe, R. S.; Stapleton, J. T.; Gilligan, P. H. Emergence of Vancomycin resistance in coagulase negative *Staphylococcus*. *New England Journal of Medicine.* 316: 927-931, 1987.
13. Tenover, F. C.; Lancaster, M. V.; Hill, B. et al. Characterization of *Staphylococcus* with reduced susceptibilities to Vancomicina and others glicopeptídeos. *J. Clin Microb.* 36(4): 1020-1027, 1998.
14. Caldas, F. A. A.; Troncoso, F. T.; Fernandes, S. T. et al. Estudo da frequência de isolamento de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina em diferentes enfermarias do Hospital de clínicas da Faculdade de Medicina de Marília. São Paulo, 1998.
15. Cámaras, F. H. Resistência de Methicillin em *Staphylococci*: base Molecular e Bioquímica e implicações clínicas. *Clin Microbiol. Rotação.* 10: 781-91, 1997.
16. Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. A functional classification scheme for β -lactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrob agents Chemother.* 39: 1211-1233, 1995.
17. Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínicos (NCCLS). Padrões de desempenho para suscetibilidade de disco de antimicrobiano testam: M2- A6 standard aprovado. Sexta edição. Wayne, PA, 1998.
18. Sader, H., et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospital: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *BJID.* 5(4):201-213, 2001.
19. Huang, S.; Platt, R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *36:281-5*, 2003.