

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Desenvolvimento e Utilização de Conservante Químico em Amostras de Urina para Análises Microbiológicas (Urocultura) e Rotina (E.A.S.)*	137
<i>Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva; Alessandro Pereira Lins; Davi Rodrigues de Souza; Caroline Sathler Oliveira da Cruz & Giselle Cristina Bergamaschi</i>	
<i>Development and Evaluation of a Chemical Preservative for Microbiological and Routine Urinalysis of Urine Samples.</i>	
PÉ DIABÉTICO: Epidemiologia da Resistência a Antimicrobianos de 61 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> Isoladas de 141 Pacientes Ambulatoriais	149
<i>R. Motta Neto; C.B.M. Carvalho; A.M. Dias; M.M. Oliveira & LMC Câmara.</i>	
<i>DIABETIC FOOT: Epidemiologia of the Resistance Isolated aureus the 61 Antimicrobials of cepas of Staphylococcus of 141 Ambulatoriais Patients</i>	
Efeito do Benzonidazol em Fígados de Ratos Perfundidos	153
<i>Aurea Regina Telles Pupulin; Andrey Paludetto; Sandra Vieira da Silva & Ana Maria K. Bracht</i>	
<i>Benzonidazol Effects in Perfused Rat Liver</i>	
Bases Moleculares da Resistência do <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> as Drogas Usadas no Tratamento da Tuberculose* - Revisão	157
<i>Francisco Afrânio Cunha & Cristiane Cunha Frota</i>	
<i>Molecular Bases of the Resistance of <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> to the Drugs Used in the Treatment Against Tuberculosis</i>	
Incidência de Hipotireoidismo Auto-Imune em Pacientes Atendidos na Cidade de Três de Maio, RS	163
<i>Tathiane Hofstetter & Leticia Beatriz Matter</i>	
<i>Incidence of hypothyroidism autoimmune in patients checked in Três de Maio City, RS</i>	
Avaliação do Emprego de Teste Combinado Antígeno/Anticorpo na Identificação de Infecção Recente de Hiv-1/Ii em Doadores de Sangue*	169
<i>Paulo Germano de Carvalho; Francisco Braga Andrade; Aparecida Tiemi Nagao Dias; Jorge Heukelbach; Fernando César de Carvalho & José Ajax Nogueira Queiroz</i>	
<i>Evaluation of a Combined Antigen/ Antibody Test for the Identification of Recent Hiv 1/Ii Infection in Blood Donors*</i>	
Comparação de dois métodos de PCR para detecção da mutação de Leiden no fator V	175
<i>Fabian Friedrich; Paulo Osório; Sidney Orelli Braga; Mauricio P. Andrade; Marco Antônio Largura & Alvaro Largura.</i>	
<i>Comparison of two PCR methods for the detection of the factor V Leiden mutation</i>	
Identificação dos Atributos de Qualidade Mais Importantes na Percepção dos Usuários de um Laboratório Clínico	179
<i>Tatsuya Sakuma; Adriane Faria de Queiroz; Erci Tibana Sakuma; Thais Harumi Sakuma & Tatiana Tiemi Sakuma</i>	
<i>Identification of the most important quality attributes perceived by users of a clinical laboratory in Brazil</i>	
Viabilidade celular de linfócitos como auxiliar na Instituição da Terapia Antirretroviral na Infecção pelo HIV-1	185
<i>G.L. Baggio; J.C. Verdi; A. Treitinger; J. Cunha; S.I.A.C.P. Ferreira & C. Spada.</i>	
<i>Cellular viability of lymphocytes as an auxiliary for the Institution of Antiretroviral Therapy in the Human Immunodeficiency Virus infection</i>	
Prevalência de Enteroparasitoses em Escolares do Bairro Morro de Santana no Município de Ouro Preto, MG	191
<i>Maria Ruth Gonçalves Gaede Carrillo; Angélica Alves Lima & Roney Luiz de Carvalho Nicolato</i>	
<i>Prevalence of intestinal parasitosis in students from public school in Morro de Santana, Ouro Preto, MG</i>	
Efeitos da Antocianina de Uva no Peso e Níveis Sangüíneos de Glicose e Triacilgliceróis em Coelhos Diabéticos	195
<i>Joselito Nardy Ribeiro; Tânia Toledo de Oliveira; Tanus Jorge Nagem; Ednaldo Queiroga Lima; Paulo César Stringheta & Davilson Bragiane Ferreira Junior</i>	
<i>Effects of Anthocyanin of Grape in the Weigth and Blood Levels of Glucose and Triacylglycerols in Diabetics Rabbits</i>	

3

VOLUME 37
2005

Caros leitores,

A atual diretoria da SBAC vem cumprindo o que se propôs a fazer. Realizou de 22 a 26 de maio o maior e melhor Congresso dos últimos anos.

Com participação recorde de público, pois saltamos de 3937 congressistas em 2004 para 6035 em 2005 na cidade de Goiânia-GO. Com abertura solene, prestigiada por inúmeras autoridades políticas, programação científica de altíssimo quilate, professores nacionais e internacionais dos mais renomados, atingindo assim novos objetivos. Programação social de elevado nível, sorteio de 03 carros 0 Km marca Peugeot-2006.

Prezado sócio mesmo assim o número de participantes de não sócios foi maior que os de sócios. Venha participar da SBAC que é sua, nos congressos você tem descontos vantajosos aproveite esta condição.

No campo institucional a SBAC tem lutado junto com as outras entidades do setor por melhores remunerações aos serviços prestados pelos laboratórios, mas esta é uma luta difícil.

O Ministério da Saúde não quer reconhecer as dificuldades do nosso setor, após muitos anos de luta quando achamos que tínhamos conseguido um aumento, qual foi a nossa surpresa, de última hora cancelaram o referido aumento. Nosso representante para esse fim é o Vice-presidente da SBAC Dr. Irineu Keiserman Grinberg que tem lutado, mas só a SBAC e entidades afins não irão conseguir; Devemos nos mobilizar na esfera política, pois se não cobrarmos, isso o dinheiro que seria para nosso aumento continuará indo para financiar campanhas e talvez para aprovar medidas do interesse exclusivo do governo e nós, parece que não somos do interesse do governo.

Desenvolvimento e Utilização de Conservante Químico em Amostras de Urina para Análises Microbiológicas (Urocultura) e Rotina (E.A.S.)*

Development and Evaluation of a Chemical Preservative for Microbiological and Routine Urinalysis of Urine Samples.

Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva¹; Alessandro Pereira Lins²; Davi Rodrigues de Souza³; Caroline Sathler Oliveira da Cruz⁴ & Giselle Cristina Bergamaschi⁴

RESUMO - O trato urinário é um sítio comum de infecção em pacientes hospitalizados e também em pacientes da comunidade. A urina coletada para análise é geralmente contaminada com microbiota uretral, da pele, da genitália ou pela flora fecal, apesar dos esforços para se obter um jato intermediário adequado. É recomendada a cultura imediata da amostra ou a refrigeração da mesma. Nos casos tanto de pacientes que trazem suas amostras de urina de casa e também naqueles hospitalizados, uma rápida inoculação da amostra e até mesmo a sua refrigeração em geral é difícil. Isso também se aplica quando se avalia amostras de urina de crianças pequenas, nas quais dispositivos externos são necessários para se obter o espécime clínico (como sacos coletores). Por estas limitações, avaliamos um sistema conservante para amostras de urina em um estudo com 75 amostras clínicas. Este sistema utiliza ácido bórico estéril (em concentração final de 15 g/L) em conjunto com um copolímero inerte de L-cisteína como agente conservante desenvolvido em nosso laboratório. Trata-se de um sistema mais fácil de se utilizar e mais eficaz que a refrigeração para a manutenção das contagens microbianas e dos parâmetros químicos e microscópicos. Este sistema se apresentou como bacteriostático e fungistático para quase todos os patógenos urinários comuns, eliminando de forma acentuada os resultados falso-positivos obtidos a partir de amostras não preservadas quando estas não são cultivadas após 2 horas. Não houve evidência de que o sistema apresentasse toxicidade para os patógenos urinários encontrados comumente em infecções urinárias. O sistema também foi eficaz na preservação de glicose, bilirrubina, cilindros, leucócitos e hemácias. Em resumo, o sistema avaliado é uma alternativa eficaz e conveniente à refrigeração das amostras e é particularmente útil naqueles casos onde a refrigeração ou o cultivo imediato da amostra não possam ser realizados.

PALAVRAS-CHAVE - Conservante Químico; Urocultura; Urinálise.

SUMMARY - The urinary tract is a common site of infection in the hospitalized, institutionalized, and ambulatory patient population. Voided urine is often contaminated with urethral, skin, genital, or fecal flora despite efforts to obtain clean-catch, midstream specimens. Immediate culture or refrigeration of urine is recommended. In the evaluation of patients at their homes or in long-term care facilities, rapid plating or refrigeration may not be practical. This is also true when evaluating small children in whom external collection devices are required to obtain a specimen. Because of these limitations, we evaluated a urine preservative and transport system in a study of 75 clinical specimens. It utilizes sterile boric acid (15 g/L final concentration) with an inert L-cysteine co-polymer as a preservative developed in our lab. The system was easy to use and was more effective than refrigeration in maintaining microbial counts, chemical and microscopic parameters. It was bacteriostatic or fungistatic for very nearly all the common urinary pathogens largely eliminating the false positive results obtained with unpreserved specimens when delay before culture was more than 2 hours. There was no evidence that the system is toxic to the urinary pathogens encountered in naturally infected urine. It also preserves glucose, bilirubin, casts, leukocytes and erythrocytes in urine and thereby marginally improved the diagnosis of pyuria. In summary, the system is a reliable and convenient alternative to refrigeration and it is particularly useful in those settings where prompt refrigeration or plating of urine cannot be assured.

KEYWORDS - Chemical Preservative; Urine Culture; Urinalysis.

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) constituem entidade clínica multifatorial de grande incidência em todo o mundo e estão entre as infecções mais frequentemente encontradas na prática médica. Pode ser considerada a segunda infecção mais comum, levando em conta o estado gripal como a mais frequente^{2,5,33,27}. As infecções do trato urinário se destacam não só pela sua frequência como também pela possibilidade de causarem complicações graves, como insuficiência renal e septicemia. ITUs são diagnosticadas sem dificuldades nos pacientes sintomáticos^{24,12,7,10}. Em outras situações sua progressão pode ser insidiosa (as-

sintomática), levando ao comprometimento renal.

As infecções urinárias agudas podem ser divididas em duas grandes categorias anatômicas: a infecção das vias urinárias baixas (uretrites, cistites) e a infecção das vias urinárias altas (pielonefrites agudas). A septicemia nestes diversos pontos pode ser produzida de forma conjunta ou separada e ser assintomática ou resultar em síndromes clínicas que poderão se estender^{27,37,41,47}.

Existe infecção das vias urinárias quando são isolados microrganismos patogênicos da urina, uretra ou rins. Na maioria dos casos, o crescimento de mais de 10⁵ microrganismos por mL em uma amostra de urina corretamente coletada (com correta assepsia dos genitais externos e coleta do jato intermediário), indica a existência de infecção, ain-

Recebido em 28/12/2004

Aprovado em 28/01/2005

Prêmio Newprov, XXXI CBAC, Salvador - BA

¹ Farmacêutico-Bioquímico - Laboratório Marcos Daniel (Vitória/ES)

² Farmacêutico-Bioquímico - Laboratório Medical-Lab (Domingos Martins/ES)

³ Acadêmico do curso de Farmácia e Bioquímica - UNIVIX (Vitória/ES) e estagiário do Lab. Marcos Daniel

⁴ Acadêmicas do curso de Farmácia e Bioquímica - EMESCAM (Vitória/ES) e estagiárias do Lab. Marcos Daniel

da que em algumas circunstâncias a infecção urinária autêntica possa não apresentar bacteriúria significativa e ser isolado um menor número de bactérias (10^3 a 10^4 por mL), enquanto que quando há crescimento de número inferior a 10^3 UFC/mL, pode se tratar de bacteriúria não significativa, com alta possibilidade de essas bactérias serem apenas contaminantes. Nas amostras de urina obtidas por punção suprapúbica ou por cateterismo, contagens de colônias de 10^2 a 10^4 por mL indicam, geralmente, a existência de infecção. Quando em cultura crescem 10^5 microrganismos ou mais por mL de urina diz-se que há colonização significativa e alta probabilidade de se tratar de uma verdadeira infecção urinária^{9,11,19,21,47,33}.

Membros da família *Enterobacteriaceae* são os agentes etiológicos mais comuns das ITU^{22,27,33}. Outros agentes menos frequentes incluem cocos Gram-positivos, bactérias anaeróbias, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, micobactérias, leveduras, protozoários e vírus^{3,8,20}. Sem que seja realizada uma cultura de urina quantitativa, é praticamente impossível associar o(s) microrganismo(s) isolado(s) em cultura com infecção urinária^{2,16,19}. Muitas vezes, a origem destes na urina normal é a uretra, através da qual passa a urina normalmente estéril^{3,7,42}.

Para uma interpretação semiológica correta do exame sumário de urina e de exames específicos como a urocultura, é indispensável que se tenha uma amostra verdadeiramente representativa e que os métodos laboratoriais sejam criteriosamente aplicados^{9,17,31,44}. A coleta de urina deve obedecer a uma série de preceitos básicos, a fim de obtermos uma amostra que reflita as alterações físico-químicas e microbiológicas que nos propomos analisar. O jato médio da primeira micção matinal fornece uma amostra de urina relativamente volumosa, bem conservada e que ficou retida na bexiga durante a noite. Sabendo-se que o tipo de dieta determina o volume urinário e interfere, de modo direto, em seus constituintes, o laboratório deve ter mais atenção no que tange à alimentação do paciente^{20,28,33,37}. Os elementos físicos da urina (cor, densidade e pH) em muito dependem da ingestão de alimentos. Uma dieta predominantemente proteica proporciona uma urina ácida e permite melhor conservação dos elementos figurados na sedimentoscopia^{24,3,18,15}. A alcalinização da urina, às vezes resultante de uma dieta vegetariana, ocasiona destruição das hemácias, dissolução dos cilindros e precipitação de fosfatos e uratos, o que dificulta o exame microscópico do sedimento^{1,33,47}.

O fato de a amostra de urina ser de fácil e rápida obtenção, muitas vezes, induz a certo descuido no tratamento da amostra após a coleta. Ocorrem alterações na composição da urina não só "in vivo" mas também "in vitro", havendo, portanto, necessidade de técnicas corretas no manuseio da amostra após a sua coleta^{38,11,31,39}. Mesmo o paciente tendo recebido o frasco esterilizado para a coleta de urina e as instruções anexas de como efetuar a coleta, são inúmeras as amostras que chegam contaminadas ao laboratório^{2,18}. Muitas das vezes as urinas são coletadas em recipientes impróprios (urinóis, por exemplo) e só em seguida transferidas para o frasco esterilizado. Ou acontece que, coletadas corretamente no frasco esterilizado, seguidos todos os imperativos de assepsia, conservadas em temperatura ambiente, são levadas ao laboratório somente várias horas mais tarde^{25,27}. Verifica-se, assim, nestas condições, contaminação bacteriana grosseira, alcalinização da urina, lise das hemácias e leucócitos e dissolução dos cilindros. Além disso, em muitos locais as amostras de urina são coletadas em recipientes de vidro ou plástico usados e apenas superficialmente lavados e/ou de-

sinfetados. Para evitar este tipo de problema, os laboratórios devem fornecer ao paciente frascos limpos, secos e esterilizados adequadamente e a urina deve ser entregue ao laboratório imediatamente, devendo ser analisada dentro de 1 a 2 horas, no máximo^{2,25,31,33}. As amostras que não puderem seguir este critério devem ser refrigeradas ou receber conservantes químicos apropriados.

O método de conservação mais usado para amostras de urina é a refrigeração, capaz de evitar a decomposição da urina pelo período de uma noite^{22,27,44}. A refrigeração da amostra pode provocar, entretanto, aumento da densidade bem como a precipitação de fosfatos e uratos amorfos, que podem prejudicar a análise microscópica do sedimento^{4,9,17}. Quando a amostra necessitar ser transportada a grandes distâncias e não for possível refrigerá-la, deve-se acrescentar conservantes químicos^{12,24,29,30}. O agente ideal deve conservar os elementos figurados do sedimento, ao mesmo tempo em que não interfere nos testes bioquímicos. Portanto, é importante escolher um conservante que se ajuste às necessidades da análise solicitada.

Dentre os diversos conservantes apropriados para amostras de urina (refrigeração, timol, formalina, clorofórmio, tolueno, ácido bórico, fluoreto de sódio, fenol), o ácido bórico apresenta maiores vantagens sobre os demais pois conserva bem as proteínas e os elementos figurados, não interferindo nas análises de rotina, exceto a do pH, apesar de que em grandes concentrações pode provocar precipitação de cristais^{6,19,27,37}. O ácido bórico mantém o pH em torno de 6,0 e age como um bacteriostático (não bactericida), podendo ser usado para o transporte de amostras de urina destinadas a cultura, apesar da sua interferência nas dosagens de medicamentos e hormônios^{44,35,9,2}.

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi determinar a eficiência de um sistema para preservação de amostras de urina desenvolvido em nosso laboratório (ácido bórico estéril a 1,5% p/v associado a um copolímero inerte de L-cisteína estéril) como agente conservante tanto da contagem bacteriana e fúngica como dos elementos figurados e substâncias químicas em amostras de urina destinadas à realização de exame sumário de rotina (E.A.S.) e urocultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas, aleatoriamente, 75 amostras de urina de pacientes diferentes, enviadas ao setor de Microbiologia do Laboratório Marcos Daniel (Vitória/ES) para realização de E.A.S. (elementos anormais e sedimentoscopia) e urocultura. Os espécimes clínicos eram provenientes de crianças e adultos com sintomas clínicos de infecção do trato urinário e mulheres grávidas para triagem de bacteriúria assintomática. As amostras de urina foram coletadas em frascos plásticos descartáveis, estéreis, confeccionados em polipropileno, adquiridos comercialmente e transportadas ao laboratório da forma habitual. Todas as amostras analisadas possuíam um volume mínimo de 70mL e todas eram provenientes de jato intermediário. Quando da chegada ao setor de Microbiologia, cada amostra foi imediatamente cadastrada e retirou-se assepticamente, no interior de uma capela de fluxo laminar vertical, metade de seu conteúdo, transferindo-o para outro frasco de coleta idêntico contem-

do em seu interior o conservante químico estéril ácido bórico + copolímero de L-cisteína (concentração final de 1,5% de ácido bórico ativo). Neste momento, a alíquota do frasco original, sem conservante (denominado Frasco-1) foi semeada em placa de Petri contendo ágar BROLACIN® (Azul de Bromotimol-Lactose-Cistina, Merck KGa, Darmstadt, Alemanha) com o auxílio de alça bacteriológica plástica descartável, estéril, com loop de 1µL e incubada em estufa bacteriológica regulada a 35°C durante 24 horas, em aerobiose, segundo as técnicas microbiológicas de rotina. Esta foi denominada "cultura de referência-A". Deste mesmo Frasco-1 foi retirada alíquota para realização da pesquisa de elementos anormais e sedimentoscopia (E.A.S.), utilizando-se para tanto fita reativa COMBUR10 TEST® UX (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), sendo este denominado "E.A.S. de referência-A". O mesmo procedimento de cultura e realização de E.A.S. foi feito para a alíquota do Frasco-2 (com conservante químico), sendo estes ensaios denominados "cultura de referência-B" e "E.A.S. de referência-B", respectivamente. Após, os frascos 1 e 2 foram deixados à temperatura ambiente (25 ± 2°C) durante 3 horas. Transcorrido este tempo, as amostras de ambos os frascos foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BROLACIN® e incubadas conforme descrito anteriormente. Estas culturas foram denominadas Cultura-2 e Cultura-3, respectivamente. Novos E.A.S. foram realizados neste momento nas amostras de ambos os frascos (denominados E.A.S.-2 e E.A.S.-3, respectivamente). Posteriormente, as amostras dos Frascos-1 foram refrigeradas (4-8°C) durante 24 horas e as amostras dos Frascos-2 foram deixadas à temperatura ambiente durante 24 horas. Após 24 horas, todo o procedimento anteriormente citado foi refeito com as amostras dos Frascos-1 e 2 (E.A.S. e urocultura) e os dados foram registrados em protocolo próprio para posterior comparação dos resultados. Estas culturas e E.A.S. foram denominados Cultura-4 e Cultura-5, E.A.S.-4 e E.A.S.-5, respectivamente.

O conservante químico foi elaborado pelo próprio laboratório (patente requerida) e a adição do copolímero de L-cisteína teve como finalidade dar maior estabilidade química ao ácido bórico e permitir uma melhor dissolução do mesmo quando em contato com a amostra de urina. Testes foram exaustivamente realizados com o copolímero para se verificar sua toxicidade ou possível fonte de nutrientes. Utilizou-se caldo BRAIN-HEART INFUSION (Infusão de Cérebro e Coração, B.H.I., Becton-Dickinson, Maryland, EUA) inoculado com diluições seriadas de diversos microrganismos com contagens conhecidas^{13,17,37,25}. Os microrganismos utilizados foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, com inóculos padronizados de 10³ microrganismos/mL de caldo após incubação em aerobiose durante 24 horas a 35°C. Após a incubação desta quantidade conhecida de cada microrganismo em caldo B.H.I. contendo 3% de copolímero de L-cisteína em estufa bacteriológica regulada a 35°C durante 24 horas e subsequente plaqueamento de alíquota deste caldo em placas de ágar sangue (feito somente com hemácias de carneiro), não foram observadas diferenças nas contagens de quaisquer dos microrganismos utilizados. Portanto, o copolímero de L-cisteína não possui ação tóxica ou é fonte de nutrientes para os microrganismos testados, sendo considerado útil para uso no presente estudo.

Para propósito de análise e comparação de dados, as uroculturas que obtiveram crescimento monomicrobiano com contagem de colônias maior que (>) 10⁵ UFC/mL foram consideradas positivas. Os isolados destas culturas foram identificados bioquimicamente segundo rotinas padronizadas pelo laboratório. Culturas com crescimento menor que (<) 10³ UFC/mL foram consideradas negativas. Os isolados destas culturas foram identificados e reportados somente com base em suas características coloniais e morfo-tintoriais após coloração de Gram (ex: cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-negativos, etc). Culturas negativas também incluíram aquelas onde houve crescimento de microrganismos considerados "contaminantes" (microbiota acompanhante com contagem de colônias <10² UFC/mL de cada microrganismo com relação às culturas de referência). As contagens de colônias foram reportadas como > 10⁵, 10⁴ a 10⁵, 10³ a 10⁴ UFC/mL ou ausência de crescimento microbiano. A interpretação das reações químicas nas tiras reativas foi realizada segundo as recomendações do fabricante e a análise microscópica do sedimento foi realizada após centrifugação de 10mL da amostra a 2.000 rpm durante 5 minutos.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas são reportados nas Tabelas 1 e 2. Vinte e seis (34,67%) uroculturas foram positivas, isto é, onde houve crescimento >10⁵ UFC/mL. Destas, 20 (76,92%) representaram cultivos puros, monomicrobianos e em 2 (7,69%) houve o isolamento de 2 microrganismos diferentes, com contagens de colônias entre 10⁴ e 10⁵ UFC/mL cada. Não houve crescimento polimicrobiano apresentando mais de 3 microrganismos com contagem >10⁵ UFC/mL. *Escherichia coli* foi a bactéria mais comumente isolada nas culturas consideradas positivas (38,46%).

Culturas sem conservantes após 3 horas em temperatura ambiente, após refrigeração, com conservante químico após 3 horas em temperatura ambiente e após 24 horas também em temperatura ambiente obtiveram crescimento de microrganismos considerados contaminantes em 18,67%, 16%, 2,67% e 2,67%, respectivamente. Um total de 19 (25,33%) "culturas de referência-A" e 30 (4%) "culturas de referência-B" foram negativas (<10³ UFC/mL ou ausência de crescimento microbiano).

Tabela 1
Comparação das uroculturas após refrigeração versus conservação química com os resultados das culturas de referência.

"CULTURA DE REFERÊNCIA-A"		Cultura-2	Cultura-4
Positiva (≥10 ⁵ UFC/mL) ¹	26 (34,67%)	29 (38,67%)	31 (41,33%)
10 ⁴ a 10 ⁵ UFC/mL	19 (25,33%)	21 (28%)	21 (28%)
10 ³ a 10 ⁴ UFC/mL	7 (9,33%)	2 (2,67%)	1 (1,33%)
Negativa (<10 ³ UFC/mL)	19 (25,33%)	9 (12%)	10 (13,33%)
"Contaminada"	4 (5,33%)	14 (18,67%)	12 (16%)
"CULTURA DE REFERÊNCIA-B"		Cultura-3	Cultura-5
Positiva (≥10 ⁵ UFC/mL) ¹	26 (34,67%)	26 (34,67%)	26 (34,67%)
10 ⁴ a 10 ⁵ UFC/mL	10 (13,33%)	9 (12%)	9 (12%)
10 ³ a 10 ⁴ UFC/mL	8 (10,67%)	9 (12%)	9 (12%)
Negativa (<10 ³ UFC/mL)	30 (40%)	30 (40%)	30 (40%)
"Contaminada"	2 (2,67%)	2 (2,67%)	2 (2,67%)

Tabela II
Identificação dos microrganismos isolados das 26
uroculturas positivas.

Microorganismos	Nº de culturas (%)
<i>Escherichia coli</i>	10 (38,46%)
<i>Klebsiella spp.</i> ¹	3 (11,54%)
<i>Enterobacter spp.</i> ²	2 (7,69%)
<i>Proteus spp.</i> ³	2 (7,69%)
<i>Providencia stuartii</i>	1 (3,85%)
Enterococos ⁴	3 (11,54%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (7,69%)
<i>Candida albicans</i>	1 (3,85%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 (3,85%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 (3,85%)

¹ Inclui as espécies *pneumoniae* (2) e *oxytoca* (1);

² Inclui as espécies *aerogenes* (1) e *cloacae* (1);

³ Inclui as espécies *mirabilis* (1) e *vulgaris* (1);

⁴ Inclui as espécies *faecalis* (2) e *faecium* (1).



FIGURA 1: (aumento de 1.000x). Cilindro hemático na amostra 2256 sem conservante após 24 horas sob refrigeração. Há deformação na estrutura do cilindro em função da lise e crenação das hemácias.

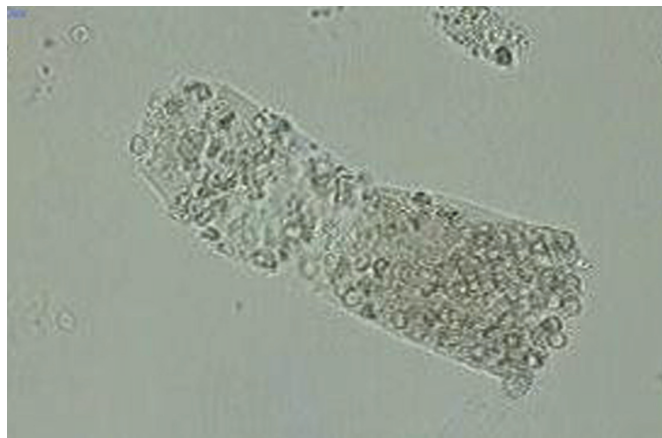


FIGURA 2: (aumento de 1.000x). Cilindro hemático íntegro na amostra 2256 com conservante químico após 24 horas em temperatura ambiente. Há conservação da estrutura do cilindro.

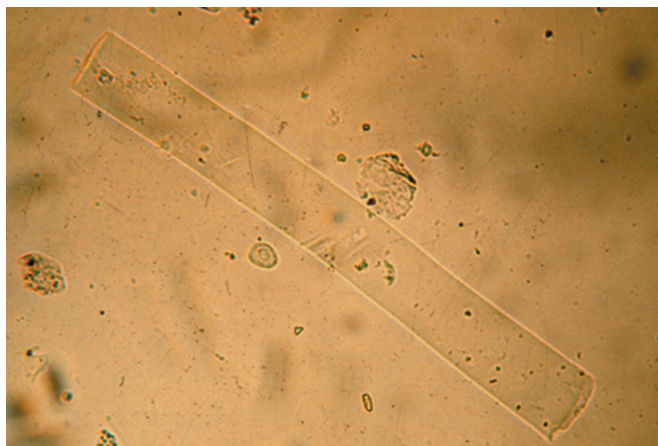


FIGURA 3: (aumento de 1.000x). Cilindro hialino íntegro na amostra 2410 com conservante químico após 24 horas em temperatura ambiente. Há conservação da estrutura do cilindro.

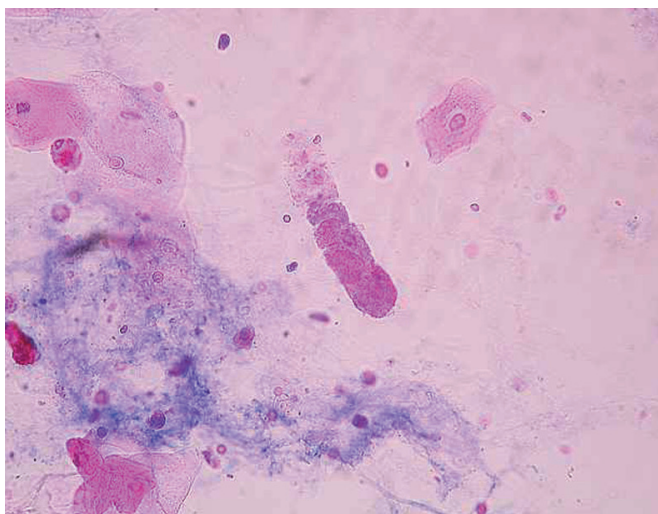


FIGURA 4: (aumento de 400x, coloração de Sternheimer-Malbin). Cilindro granuloso na amostra 2902 com conservante químico após 24 horas em temperatura ambiente. Há conservação da estrutura do cilindro.

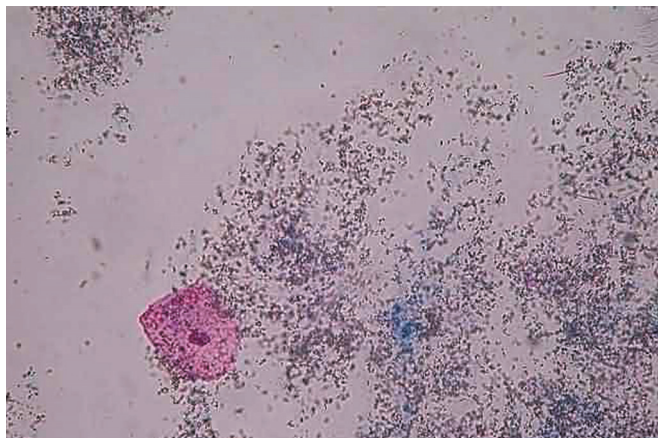


FIGURA 5: (aumento de 400x, coloração de Sternheimer-Malbin). Cristais de uratos amorfos na amostra 2217 sem conservante após 24 horas sob refrigeração. Há precipitação grosseira de cristais devido à refrigeração da amostra.

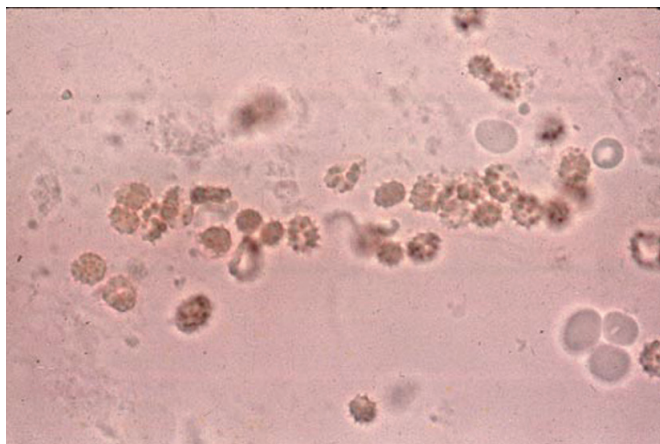


FIGURA 6: (aumento de 1.000x). Hemácias íntegras e crenadas após 24 horas sob refrigeração sem conservante químico na amostra 2244.



FIGURA 7: (aumento de 1.000x). Hemácias e leucócito íntegros na presença de conservante químico após 24 horas em temperatura ambiente na amostra 2244.

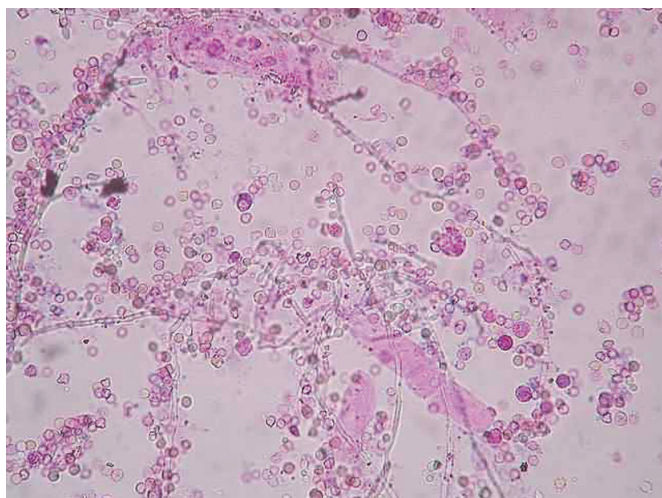


FIGURA 8: (aumento de 400x, coloração de Sternheimer-Malbin). Presença de numerosas células leveduriformes com formação de pseudo-hifas em amostra com conservante químico após 24 horas em temperatura ambiente. Há preservação da estrutura celular e viabilidade para crescimento em cultura.

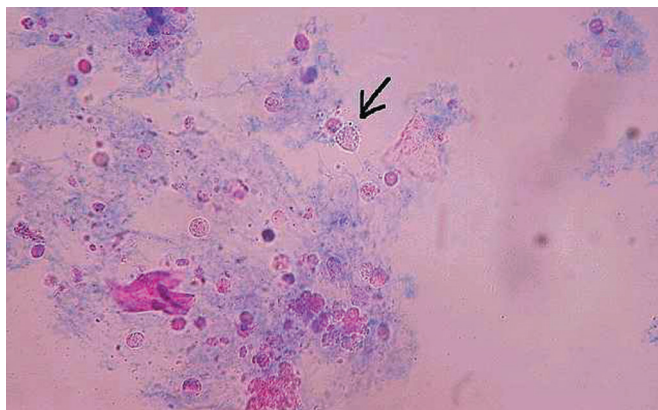


FIGURA 9: (aumento de 400x, coloração de Sternheimer-Malbin). Presença de *Trichomonas vaginalis* íntegro em amostra com conservante químico após 24 horas em temperatura ambiente. Há preservação da estrutura celular e motilidade.

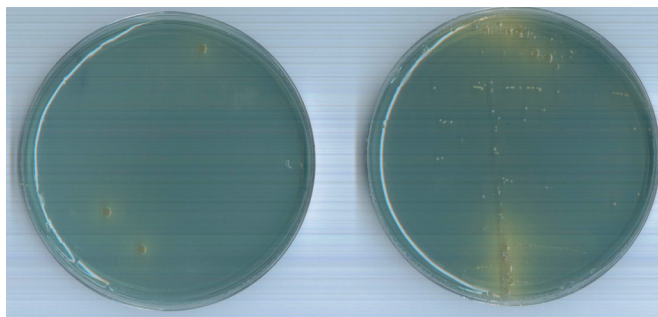


FIGURA 10A: Amostra 2224 (amostra após 3 horas em temperatura ambiente). Placa da esquerda: urocultura negativa (3.000 UFC/mL) semeada de frasco com conservante químico. Placa da direita: urocultura negativa (?) com contagem entre 10.000 a 15.000 UFC/mL semeada de frasco sem conservante químico.

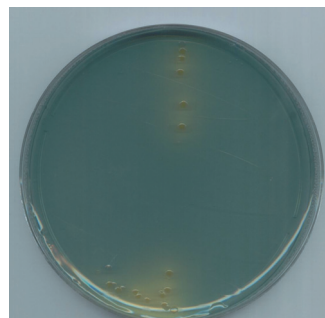


FIGURA 10B: Amostra 2224 (amostra após 24 horas em temperatura ambiente). Urocultura negativa (<10.000 UFC/mL) semeada de frasco com conservante químico.

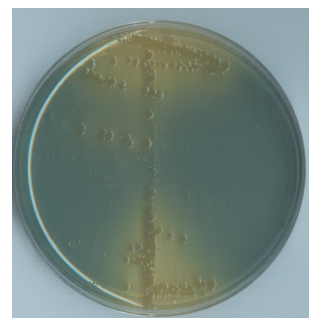


FIGURA 10C: Amostra 2224 (amostra após 24 horas sob refrigeração). Contagem de colônias gerando interpretação duvidosa quanto à positividade da urocultura, semeada de frasco sem conservante químico. Há multiplicação bacteriana mesmo com a amostra sob refrigeração durante 24 horas.

DISCUSSÃO

A urina é um excelente meio de cultura para muitos microrganismos, especialmente bactérias. Os contaminantes que inicialmente estejam presentes em baixas contagens numa amostra não preservada (10^2 a 10^4 UFC/mL) podem se multiplicar na urina, elevando suas contagens para $>10^5$ com extrema facilidade, especialmente em se tratando de bactérias de crescimento rápido como as enterobactérias^{13,8,36,40}. O tempo mínimo requerido para os contaminantes alcançarem concentrações tais que possam simular uma infecção urinária verdadeira ($>10^5$ UFC/mL na maioria dos casos) é variável e depende da taxa de crescimento do microrganismo, o grau inicial de contaminação da amostra e da temperatura ambiente. A maioria dos estudos indica 2 a 3 horas como tempo máximo para que uma amostra de urina não preservada seja cultivada objetivando recuperação quantitativa^{27,29,31,36,40,42}. As recomendações atuais concentram-se no estabelecimento de 1 a 2 horas ou que a amostra seja refrigerada por no máximo 2 horas como sendo o tempo padrão para tal procedimento^{9,18,19,21,43}. Entretanto, na grande maioria dos laboratórios clínicos isso é praticamente impossível de ser seguido em todas as amostras de urina recebidas para análise.

Os problemas relacionados a conservação das amostras de urina podem ser considerados pouco importantes se levarmos em conta as alterações que ocorrem quando a urina não é conservada. As amostras mantidas à temperatura ambiente por mais de 2 horas, sem conservantes, podem apresentar alterações como: aumento do pH decorrente da degradação da uréia e sua conversão em amônia por bactérias produtoras de urease, diminuição da glicose em decorrência de glicólise e de sua utilização pelas bactérias, diminuição das cetonas em decorrência de volatilização, diminuição da bilirrubina por exposição à luz, diminuição do urobilinogênio por sua oxidação e conversão em urobilina, aumento do nitrito em decorrência da redução do nitrato pelas bactérias, aumento da turvação causada por proliferação bacteriana e possível precipitação de material amorfo, desintegração das hemácias e dos cilindros, particularmente na urina alcalina diluída, alterações na cor devido à oxidação ou à redução de metabólitos e formação de cristais em amostras não conservadas ou conservadas em geladeira, mascarando outros componentes de maior significado clínico^{2,5,9,11,22,29,31,37}.

Pela adição de ácido bórico ao copolímero de L-cisteína foi possível obter-se uma rápida dissolução do conservante na urina, sem a necessidade de homogeneização prolongada^{14,20}. Neste estudo ficou comprovada a eficiência do copolímero de L-cisteína como agente aglutinante do ácido bórico sem que aquele demonstrasse ação tóxica e/ou fosse fonte de nutrientes para os microrganismos encontrados nas amostras de urina, o que provocaria falsos resultados negativos e positivos, respectivamente, invalidando a sua utilização como agente conservante.

Obteve-se claramente efeito bacteriostático e fungistático melhor do que a refrigeração, além da conservação de várias características importantes do sedimento urinário e dos elementos químicos pesquisados no exame sumário de urina. Trabalhos anteriores demonstraram toxicidade do uso de ácido bórico entre 1,8 e 2,0 p/v sozinho ou em associação com formato de sódio e glicerol em *E.coli*, *Pseudomonas* e *Proteus* após 24 horas^{4,13}. Além disso, os sistemas baseados nesta composição não são apropriados para a realização do exame sumário de urina (E.A.S.) pela obtenção de resultados discrepantes principalmente com relação aos

elementos químicos pesquisados (resultados falso-positivos de hemoglobina e bilirrubina, resultados falso-negativos de glicose e cetonas)^{19,27,31} e quanto à sedimentoscopia (dissolução de cilindros e cristais, crenação precoce de hemácias e lise de leucócitos)^{2,7,41}. Outros trabalhos enfatizam a diminuição da viabilidade de *Enterococcus* e *Pseudomonas* em amostras refrigeradas por mais de 12 horas, tornando-as portanto impróprias para cultivos de repetição nos casos de contra-prova quando da presença destes microrganismos^{3,8,32,46}. No presente estudo as alterações físicas e químicas encontradas foram importantes para a concordância com dados de literatura.

A terminologia usada para descrever a coloração da urina normal pode diferir ligeiramente de um laboratório para outro. As descrições mais comuns são amarelo-claro, amarelo, amarelo-escuro e âmbar. A urina amarelo-escuro ou âmbar nem sempre significa concentração anormal, mas pode ser causada pela presença anormal do pigmento bilirrubina. Se este estiver presente, será detectado durante a análise química, porém deve-se suspeitar de sua presença se aparecer uma espuma amarela quando a amostra é agitada^{4,9,25}. A conversão de grande quantidade de urobilinogênio excretado como urobilina também produzirá coloração amarelo-alaranjada, mas neste caso, a agitação não provocará o aparecimento de espuma amarela. Um achado laboratorial também muito frequente é a coloração amarelo-alaranjada causada pela administração de derivados de piridina como adjuvante para o tratamento de infecções urinárias. Esse pigmento espesso e alaranjado não só modifica a cor natural da amostra de urina como também interfere nas análises químicas baseadas em reações cromáticas. Se a urina for ácida e as hemácias permanecerem por muitas horas neste pH, a coloração final poderá ser marrom-escuro em virtude da conversão da hemoglobina em metahemoglobina^{12,36}.

O aspecto ou aparência de uma amostra de urina é um termo geral que se refere à transparência da mesma. Os termos comumente usados para descrever o aspecto são: límpida, ligeiramente turva e turva. A urina normal, recém-eliminada, geralmente é transparente, porém aparece certa opacidade causada pela precipitação de fosfatos amorfos e carbonatos na forma de névoa branca^{36,43}. A urina ácida normal também pode mostrar-se opaca devido à precipitação de uratos amorfos, cristais de oxalato de cálcio ou de ácido úrico. A opacidade da urina ácida muitas vezes lembra pó de tijolo, devido ao acúmulo de pigmento róseo de uroeritrina na superfície dos cristais. Esta substância é um constituinte normal da urina^{2,9,15}. A presença de células epiteliais de descamação e de muco, principalmente na urina de mulheres, também pode ser normal apesar da opacidade. Além dos cristais amorfos, os outros constituintes que mais comumente causam turvação da urina são: leucócitos, hemácias, células epiteliais e microrganismos^{4,21}. Outras substâncias que podem provocar turvação na urina são: lipídios, sêmen, muco, linfa, cristais, matéria fecal e contaminação externa (cremes, talco, etc). No presente estudo, quando comparamos os itens "cor" e "aspecto" da amostra de urina observamos que houve boa concordância entre a presença do conservante químico em temperatura ambiente após 3 e 24 horas, ao contrário do que ocorreu com as amostras em temperatura ambiente sem conservante químico após 3 horas e nestas mesmas após 24 horas mantidas sob refrigeração^{17,26,30}. A lise de hemácias e o surgimento de pigmentos de bilirrubina alteraram sobremaneira a cor das amostras sem conservante químico e a precipitação de

cristais nas amostras refrigeradas também foi marcante para gerar resultados discrepantes no caso da necessidade de reanálise destas após 24 horas.

A densidade urinária é uma medida da densidade das substâncias químicas dissolvidas na amostra. Por ser uma medida da densidade da amostra, é influenciada não só pelo número de partículas nela presentes, mas também pelo tamanho dessas partículas^{27,36}. A densidade da urina depende também da quantidade de água excretada e da quantidade inversa entre o volume de urina e sua densidade. Havendo, por exemplo, uma ingestão hídrica excessiva, obtém-se maior volume urinário e, conseqüentemente, diminuição da densidade. A densidade da urina normal varia entre 1,015 e 1,025 podendo, entretanto, apresentar variações fisiológicas acentuadas na dependência da maior ou menor ingestão de líquidos. Nas restrições drásticas de líquidos ou nas perdas exageradas, os valores podem oscilar entre 1,030 e 1,040. Valores acima desses níveis podem ser ocasionados pela presença de produtos metabólicos de certas drogas ou de grande quantidade de glicose ou proteínas na urina. No presente estudo observamos que houve em quase todas as amostras com conservante químico diferenças nos resultados da densidade em comparação com as amostras sem conservante químico^{2,4,11,43}. Uma vez que na maioria dos casos houve um acréscimo de 0,005 a 0,010 com relação aos parâmetros de "referência", pode-se inferir que isso deveu-se especialmente ao fato da adição de mais substâncias além daquelas já presentes na amostra de urina^{4,9}.

Durante o processo metabólico normal o organismo humano produz excesso de ácidos. Essa sobrecarga ácida é compensada pelos rins através da excreção urinária de ácidos e da reabsorção de bicarbonato. Por esse motivo o pH da urina é habitualmente ácido (5,5 a 6,5), enquanto o pH plasmático e do líquido extracelular é um pouco alcalino (7,36 a 7,44). O pH urinário, entretanto, pode variar amplamente de 4,5 a 8,4 mesmo na ausência de alterações patológicas. Em circunstâncias habituais, o pH da urina é modificado sobretudo pelas características dietéticas^{9,33,40}. Variações climáticas podem também determinar oscilações fisiológicas do pH urinário. Conseqüentemente, não existem valores normais para o pH urinário e esse fator deve ser considerado em conjunto com outras informações do paciente, tais como o valor do equilíbrio ácido-básico do sangue, função renal, presença de infecções do trato urinário, ingestão de alimentos e tempo transcorrido depois da coleta. A precipitação de substâncias químicas inorgânicas dissolvidas na urina produz cristais urinários e cálculos renais. Alguns microrganismos também são responsáveis pela grande alcalinidade encontrada em amostras que ficaram muito tempo sem conservantes. No presente estudo também notou-se ligeira diminuição no pH das amostras com conservante químico^{2,5,19,39}. Mesmo sendo um ácido fraco, o ácido bórico determinou o abaixamento do pH na maioria das amostras de urina em comparação com aquelas sem a presença deste conservante, mas variando minimamente estes valores, levando-nos a acreditar que este fato, isoladamente, não determinou variações significativas nos outros elementos pesquisados. Nas amostras sem conservante químico após 3 horas em temperatura ambiente, quando da presença de bactérias com a capacidade de produção da enzima urease, houve elevação significativa dos valores de pH pela ação desta enzima "in vitro", produzindo amônia na urina estocada^{20,36,14,4}. Nas amostras sem conservante químico mas refrigeradas por 24 horas observou-se manutenção ou diminuição dos valores de pH em comparação

com os E.A.S. de referência, especialmente devido à precipitação de cristais de uratos amorfos, gerando íons H⁺ livres^{4,9,22}.

A análise química da urina de rotina inclui provas para determinações de pH, densidade, proteínas, glicose, cetonas, nitrito, hemoglobina, entre outras, de acordo com o tipo de tira reativa utilizada. Estes procedimentos podem ser medidos qualitativamente (resultados "positivos" ou "negativos") ou semi-quantitativamente (+, ++, +++). Desde a introdução das tiras reativas simples e múltiplas, o exame químico da urina se converteu em um procedimento sensível e rápido. Atualmente é possível analisar várias provas diferentes em poucos segundos^{1,9,22,35,44,45}.

Em geral, um teste de nitrito positivo na urina é altamente sugestivo de bacteriúria, indicando uma contagem bacteriana igual ou superior a 10⁵ UFC/mL de amostra. Apesar disso, não se destina a substituir a urocultura como principal prova de diagnóstico e controle das infecções urinárias, mas sim a detectar os casos em que a necessidade de cultura pode não ser evidente^{8,18,24,44}. O fundamento bioquímico da prova é a capacidade que certas bactérias têm de reduzir o nitrato, constituinte normal da urina e convertê-lo em nitrito, que normalmente não aparece na urina. A detecção é feita pela reação de Griess, na qual o nitrito reage em pH ácido com uma amina aromática (ácido para-arsanílico ou sulfanilamida), formando um sal de diazônio que em seguida reage com 3-hidroxi 1,2,3-tetraidrobencil-(h)-quimolona e produz coloração rósea. A prova de Griess é excelente para detectar a presença de enterobactérias porém muito precária para o rastreamento de estafilococos e estreptococos. Obtêm-se resultados falso-positivos quando a prova de nitrito não é feita com amostras recém-coletadas, pois a multiplicação das bactérias contaminantes logo produzirá quantidades mensuráveis de nitrito^{2,4,5,17}. Embora os resultados falso-positivos sejam extremamente raros, frequentes são os resultados falso-negativos. Em determinados casos, mesmo em presença de bacteriúrias significativas e comprovadas por meio de cultura, os testes de nitrito mostram-se negativos^{4,13,17}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da prova de nitrito tanto das amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 76% e 73% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. Essa dissonância de resultados deve-se a fatores como: a) a presença de substâncias inibidoras na urina poderia interferir no processo metabólico/enzimático das bactérias (como piridina, bilirrubina e azul de metileno); b) na realidade não existiria uma bacteriúria verdadeira e o resultado da urocultura representaria uma contaminação do espécime clínico; c) redução do nitrito com sua conversão em nitrogênio, que não é detectável pela prova de Griess (isso pode ocorrer quando o número de bactérias é alto, especialmente contaminantes cujo crescimento não foi impedido especialmente nas amostras sem conservante químico em temperatura ambiente durante 3 horas).

A bilirrubina e o urobilinogênio são produtos intermediários da degradação da hemoglobina. No fígado, a bilirrubina conjuga-se com o ácido glicurônico pela ação da glicuronil-transferase, formando o diglicuronídeo de bilirrubina, que é hidrossolúvel. Geralmente essa bilirrubina conjugada não aparece na urina porque passa diretamente do fígado para o ducto biliar e daí para o intestino.

Neste, é reduzida pelas bactérias intestinais e convertida em urobilinogênio e, finalmente, excretada nas fezes na forma de urobilina^{19,23,27}. A bilirrubina conjugada aparece na urina quando o seu ciclo normal de degradação é interrompido pela obstrução do ducto biliar ou quando a integridade do fígado está comprometida, permitindo o seu extravasamento para a circulação. A bilirrubina, em condições normais, não é encontrada na urina. A presença de bilirrubina na urina pode ser a primeira indicação de hepatopatia. Aproximadamente metade do urobilinogênio é reabsorvido pelo intestino, caindo no sangue, circulando e voltando para o intestino através do ducto biliar. O urobilinogênio aparece na urina porque, ao circular no sangue a caminho do fígado, pode passar pelos rins e ser filtrado pelos glomérulos. Desta forma, normalmente se encontra pequena quantidade de urobilinogênio na urina. Pode-se observar grande quantidade de urobilinogênio na urina nas hepatopatias e nos distúrbios hemolíticos. No presente estudo destaca-se a importância da conservação química da amostra para a manutenção dos níveis destes dois importantes parâmetros, uma vez que a determinação destas substâncias na urina está sujeita a certas limitações^{9,12,17}. Certas drogas (sulfisoxazol e ácido para-aminossalicílico) interferem nos testes gerando resultados falso-positivos. A tetraciclina atua sobre a capacidade redutora das bactérias diminuindo a transformação da bilirrubina em urobilinogênio ao nível intestinal, podendo-se encontrar, deste modo, resultados falso-negativos. Também pode-se encontrar resultados falso-negativos quando há grande quantidade de nitrito na urina, o que ocorreu em certas amostras sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas^{22,29,41,46}. Especificamente com relação à determinação de bilirrubina em amostras de urina, destaca-se que as amostras têm que ser recentes. A bilirrubina é um composto instável, rapidamente destruído quando exposto à luz. Nas urinas envelhecidas (mesmo refrigeradas) ou expostas à luz intensa, há um processo de oxidação do glicuronato de bilirrubina (forma conjugada) gerando, respectivamente, bilirrubina livre (não conjugada) e biliverdina, que não reagem nos métodos colorimétricos habituais. Este fato pode ser a resposta para os resultados falso-negativos que ocorreram em 3,33% das amostras sem conservante químico e refrigeradas por 24 horas em comparação com os resultados dos E.A.S. de referência, o que não ocorreu em nenhuma amostra adicionada do conservante químico.

A hemoglobina pode estar presente na urina em forma de hemácias íntegras (gerando hematúria) ou de hemoglobina, que é um produto da destruição das hemácias (gerando hemoglobinúria). O achado de hematúria ou de hemoglobinúria sempre é considerado de grande importância clínica. A hemoglobinúria pode ocorrer como resultado da lise das hemácias no trato urinário ou pode ser causada por hemólise intravascular com subsequente filtração de hemoglobinas através dos glomérulos^{2,9,24}. A lise das hemácias na urina geralmente apresenta uma mistura de hematúria e hemoglobinúria, ao passo que não serão encontradas hemácias nos casos de hemólise intravascular^{6,14,25}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados das provas de hemoglobina e aquelas onde informa-se a presença de hemácias na tira reativa utilizada, tanto nas amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 91% e 81% nos resultados dos E.A.S. de referência e as

amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. Nas urinas envelhecidas, refrigeradas ou não, pode ocorrer que as hemácias sejam hemolisadas e deixem a hemoglobina livre no líquido, simulando verdadeira hemoglobinúria. Quando a densidade é elevada, capaz de provocar a crenação das células e pH urinário inferior a 5, poderá haver inibição da hemólise na tira reativa, obtendo-se assim resultados falso-negativos.

Os processos metabólicos de produção de corpos cetônicos desenvolvem-se no fígado. Nele, os ácidos graxos são convertidos em corpos cetônicos, os quais circulam no sangue e são utilizados pela maioria dos tecidos periféricos como fonte de energia. O termo "cetona" engloba 3 produtos intermediários do metabolismo das gorduras: acetona, ácido acetoacético e ácido beta-hidroxibutírico^{2,24,39,44}. Normalmente, não aparecem quantidades mensuráveis de cetonas na urina, pois toda a gordura metabolizada é completamente degradada e convertida em CO₂ e água. Contudo, quando o uso de carboidratos como principal fonte de energia fica comprometido e os estoques de gorduras do organismo precisam ser metabolizados para suprimento de energia, pode-se detectar cetonas na urina^{12,20}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da prova de cetonas tanto das amostras com conservante químico nas amostras deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 93% e 85% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. Em amostras mal conservadas observam-se valores falsamente baixos, devido à volatilização da acetona e à degradação do ácido acetoacético por bactérias.

Em circunstâncias normais, quase toda a glicose filtrada pelos glomérulos é reabsorvida no túbulo contorcido proximal; por isso, a urina contém quantidades mínimas de glicose. Se os níveis sanguíneos de glicose se elevam demais, como ocorre no diabetes mellitus, os túbulos deixam de transportá-la e ela aparece na urina^{7,14,23}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da prova de glicose tanto das amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 94% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração. Geralmente ocorrem falsas reações positivas se os recipientes foram contaminados por peróxidos ou por detergentes oxidantes fortes. As reações falso-negativas são devido, principalmente, à degradação progressiva da glicose pelas bactérias na amostra de urina não conservada. Densidade superior a 1,020 combinada com pH elevado também pode reduzir a sensibilidade do teste quando as concentrações de glicose são baixas, podendo ocorrer naquelas amostras deixadas em temperatura ambiente sem conservante por mais de 2 horas^{13,27,36}.

Diferentes tipos de proteínas podem ser encontradas na urina. As mais comuns são a albumina e as globulinas séricas. A conceituação clínica da proteinúria liga-se, habitualmente, à presença de soro-albumina e soro-globulina. Essas são as proteínas oriundas do plasma sanguíneo e que constituem as proteínas urinárias propriamente ditas. A urina normal contém quantidade muito pequena de proteí-

nas. A presença de proteinúria muitas vezes é indicativa de doenças renais incipientes^{3,25,29,32}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da prova de proteínas tanto das amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 93% e 73% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. A principal fonte de erro no uso de tiras reativas ocorre quando a urina é deixada muito tempo sem conservantes, ocorrendo alcalinização da mesma, anulando o sistema de tamponamento, produzindo elevação do pH e uma mudança na cor que não tem relação com a concentração de proteínas. A contaminação do frasco de coleta com compostos quaternários de amônio (detergentes) também pode provocar reações falso-positivas^{4,13,28,36}.

Os resultados encontrados na qualificação e quantificação dos elementos celulares e outros na sedimentoscopia também foram importantes para a comparação com dados de literatura. Como as hemácias não podem entrar no filtrado dos néfrons íntegros, achados de mais de 1 hemácia ocasional é considerado anormal. A existência de hemácias na urina tem relação com lesões na membrana glomerular ou nos vasos do sistema urogenital^{19,15}. As hemácias que chegam à urina, seja através de filtração glomerular ou do epitélio tabular, sofrem os efeitos desfavoráveis da osmolaridade e do pH urinário^{7,18,25}. No presente estudo houve concordância de 99% dos resultados da análise de hemácias íntegras no sedimento urinário tanto das amostras com conservante químico nas amostras deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 86% e 82% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. Amostras não preservadas e aquelas conservadas sob refrigeração por mais de 15-20 horas podem apresentar alterações morfológicas marcantes nestas células, que se apresentam microscopicamente sob as formas mais diversas (crenadas, edemaciadas, formas "fantasmas", etc). Geralmente são encontrados menos de 5 leucócitos por campo em aumento de 40x na urina normal. O número elevado de leucócitos indica a presença de infecção ou inflamação no sistema urogenital. Entre as causas frequentes de piúria estão as infecções bacterianas tais como pielonefrite, cistite, prostatite e uretrite. Entretanto, o achado de leucócitos polimorfonucleares na urina, em número acima do normal, pode não significar sempre a existência de processo infeccioso. Piúrias inflamatórias (assépticas) são observadas em alguns casos de litíase renal, no seguimento terapêutico das cistites e das pielonefrites e no pós-operatório das prostatectomias^{2,22,37,41}. Leucorritúria não deve ser interpretado isoladamente, mas em conjunção aos outros achados do exame sumário de urina. A existência de, por exemplo, piúria sem bacteriúria, persistente, sobretudo quando aliada às reduções de pH urinário e de densidade urinária, levantam a suspeita de tuberculose renal^{9,17,40}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da análise de leucócitos no sedimento urinário tanto das amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 87% e 85% nos

resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. Fator importante para estes achados discrepantes é a lise dos leucócitos em amostras não conservadas ou sob refrigeração em urinas alcalinas.

Na urina encontram-se 3 tipos de células epiteliais, que são classificadas de acordo com seu local de origem no sistema urogenital. As mais frequentes e menos significativas são as células pavimentosas. Provêm do revestimento da vagina e das porções inferiores da uretra masculina e feminina, podem ser encontradas em grande número nas amostras de urina de mulheres, colhidas sem usar a técnica do jato intermediário e contaminação da urina passando pelos grandes lábios vaginais^{10,25,31}. As células do epitélio de transição originam-se do revestimento da pelve renal, da bexiga e da porção superior da uretra. Raramente têm significado clínico, a menos que sua quantidade seja grande e sua forma anômala. As mais importantes são as dos túbulos renais porque, quando sua quantidade é grande, há indício de necrose tubular. Sua presença traduz a existência de doenças causadoras de lesão tabular, entre as quais pielonefrite, reações tóxicas, infecções virais, rejeição de transplante e efeitos secundários da glomerulonefrite^{7,15,34,43}.

No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da análise de células epiteliais no sedimento urinário tanto das amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 94% e 84% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. O fato da diminuição das células epiteliais nas amostras sem conservantes refrigeradas por 24 horas pode ter sido provocada pela baixa temperatura e na precipitação de cristais levando à lise celular, uma vez que nestas amostras em geral foram encontradas células "fantasmas", as quais refletem exatamente esta situação.

Os cilindros são os únicos elementos exclusivamente renais encontrados no sedimento urinário. Formam-se principalmente no interior da luz do túbulo contorcido distal e do ducto coletor. O principal componente dos cilindros é a glicoproteína de Tamm-Horsfall, excretada pelas células dos túbulos renais^{17,25,28}. Encontrada na urina normal e na anormal, não é detectável pelos métodos de tira reativa; portanto, não é responsável pelo elevado nível de proteínas urinárias frequentemente relacionado com presença de cilindros^{4,19,36,40}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da análise de cilindros no sedimento urinário tanto das amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas quanto naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve uma concordância de 93% e 86% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. Este fato ratifica os dados de literatura que consideram que as urinas deixadas em repouso, em temperatura ambiente por mais de 2 a 3 horas podem tornar-se alcalinas e provocar a dissolução de cilindros. A grande presença de cristais precipitados pela refrigeração também possui importância na degradação dos cilindros, uma vez que a liberação de íons H⁺ e o atrito físico são fatores que podem levar à esta degeneração^{3,26,36,44}.

A urina contém cristais e depósitos amorfos inorgânicos,

que representam produtos finais metabólicos (carbonatos, uratos, amônia, etc.) ou produtos de excessos alimentares (cálcio, fosfato, ácidos aminados)^{4,13,18}. Essas substâncias se precipitam e se combinam, formando os cristais característicos que, quando em grande quantidade, interferem com o exame microscópico do sedimento urinário ou com sua análise química. A urina normal recém-eliminada pode conter cristais formados nos túbulos ou, com menos frequência, na bexiga^{9,11,25,27}. A grande concentração de solutos geralmente é responsável por essa precipitação "in vivo" encontrada, na maioria das vezes, na urina concentrada. A cristúria pode ser totalmente assintomática ou associar-se às formações de cálculos do sistema urinário, originando manifestações clínicas compatíveis com alterações do fluxograma da urina. Cristais ou depósitos amorfo no sedimento urinário podem existir em conjunção com litíase renal ou isoladamente^{17,21,4,9}.

Os cristais observados com maior frequência em urinas ácidas são os cristais de ácido úrico e oxalato de cálcio. Outros são os de sulfato de cálcio, de cistina, de tirosina, de sulfa e os uratos amorfo^{3,27,13,4}. A maioria dos cristais observados na urina alcalina é formada por fosfatos, como o fosfato triplo, o fosfato amorfo e o fosfato de cálcio. Os cristais de fosfato triplo encontram-se, em geral, associados às infecções urinárias por *Proteus*, pois estes têm a capacidade de transformar a uréia em amônia e CO₂ em curto espaço de tempo e com grande ação enzimática^{5,18,19,21}. No presente estudo houve concordância de 88% dos resultados da análise de cristais no sedimento urinário de todas as amostras com conservante químico em comparação com o E.A.S. de referência-A (provavelmente devido somente à precipitação de uratos amorfo pela diminuição do pH), ao passo que houve uma concordância de 100% e 84% nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente e após 24 horas de refrigeração, respectivamente. Segundo dados de literatura, a maior parte da formação de cristais ocorre em amostras que foram deixadas em temperatura ambiente ou que foram refrigeradas. Os cristais são extremamente abundantes em amostras refrigeradas e muitas vezes causam problemas porque mascaram outros componentes de maior significado clínico. No presente estudo, foram encontrados cristais de cistina somente nos E.A.S. de referência e naqueles provenientes de amostras com conservante químico, ratificando desta forma os dados de literatura que a cistina deve ser investigada na urina fresca, já que os cristais são rapidamente destruídos por bactérias. Não houve detecção de cristais de colesterol nas amostras com conservante químico, ao passo que 1,33% das amostras sem conservante químico após 3 horas deixadas em temperatura ambiente e 5,33% das amostras refrigeradas após 24 horas apresentaram cristais de colesterol no exame microscópico. Isso reforça a posição da maioria dos dados de literatura de que é raro encontrar cristais de colesterol, a menos que as amostras tenham sido refrigeradas, fazendo com que os lipídeos assumam forma de gotículas de gordura. Cristais do antibiótico ampicilina também não foram encontrados nas amostras de urina com conservante químico, sendo encontrados em 1,33% e 6,67% nas amostras sem conservante químico refrigeradas por 24 horas, também ratificando os dados de literatura de que os cristais de ampicilina aparecem como agulhas que formam feixes após a refrigeração da urina. Normalmente a urina não contém bactérias e outros microrganismos clinicamente importantes e detectáveis através do exame de urina^{2,41}. Microrganismos de importância em

amostras clínicas de urina são principalmente as bactérias, as leveduras e parasitas como o *Trichomonas vaginalis*. Se as amostras não forem coletadas de forma asséptica, pode ocorrer contaminação bacteriana sem significado clínico^{1,19,27}. No presente estudo houve concordância de 100% dos resultados da análise de bactérias, dos resultados da análise de leveduras e dos resultados da análise de *T.vaginalis* no sedimento urinário analisado microscopicamente, nas amostras com conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas e naquelas analisadas após 24 horas em comparação com os E.A.S. de referência, ao passo que houve, em geral, baixa concordância nos resultados dos E.A.S. de referência e as amostras de urina sem conservante químico deixadas em temperatura ambiente por 3 horas (concordância de 86% para a contagem de bactérias, 99% para a presença/ausência de leveduras e para a presença/ausência de *T.vaginalis*) e após 24 horas de refrigeração (concordância de 79% para a contagem de bactérias, 99% para a presença/ausência de leveduras e 95% para a presença/ausência de *T.vaginalis*). As amostras que ficam à temperatura ambiente por mais de 2 horas em geral têm seu número de bactérias aumentado, sendo que estas representam apenas a multiplicação dos microrganismos contaminantes, ao passo que os verdadeiros patógenos, se ali existirem e em número considerável para se tratar de uma infecção urinária verdadeira, normalmente têm seu crescimento inibido pela rápida multiplicação dos contaminantes. A refrigeração favorece a inativação dos flagelos de *T.vaginalis*, fazendo com que estes parasitas percam sua motilidade característica quando vistos ao microscópio, fato este que também pôde ser observado em 75% das amostras sem conservante químico; entretanto, tal fato não ocorreu em qualquer das amostras com conservante químico. Amostras de urina deixadas por mais de 2 horas em temperatura ambiente podem se tornar alcalinas, favorecendo a lise das leveduras, impedindo seu crescimento na urocultura, provavelmente residindo aí a baixa concordância entre os E.A.S. de referência e aqueles de amostras sem conservante químico, com e sem refrigeração, fato não observado nas amostras com conservante químico.

CONCLUSÃO

O sistema de conservação química para amostras de urina desenvolvido em nosso laboratório evidenciou ser um sistema mais fácil de se utilizar e mais eficaz que a refrigeração para a manutenção das contagens microbianas e dos parâmetros químicos e microscópicos, além de extremamente mais econômico que os similares que existem no mercado (que possuem em sua composição ácido bórico + formato de sódio). O sistema conservante proposto neste estudo se apresentou como bacteriostático e fungistático para quase todos os patógenos urinários comuns, eliminando de forma acentuada os resultados falso-positivos obtidos à partir de amostras não preservadas quando estas não são cultivadas após 2 horas. Não houve evidência de que o sistema apresentasse toxicidade para os patógenos urinários encontrados comumente em infecções urinárias. O sistema também foi eficaz na preservação de glicose, bilirrubina, cilindros, leucócitos e hemácias. Em resumo, o sistema avaliado é uma alternativa eficaz e conveniente à refrigeração das amostras e é particularmente útil naqueles casos onde a refrigeração ou o cultivo imediato da amostra não possam ser realizados.

REFERÊNCIAS

- 1.ALLEN, T.A.; JONES, R.L.; PURVANCE, J. Microbiologic evaluation of canine urine: direct microscopic examination and preservation of specimen quality for culture. *J Am Vet Med Assoc* 190(10):1289-91, 1987.
- 2.BARON, E.J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th Ed. St.Louis: Mosby-Year Book, 1994.
- 3.BERETON, D.M.; SONTOP, M.E.; FRASER, C.G. Timing of urinalysis reactions when reagent strips are used. *Clin Chem* 24(10):1420-1421, 1978.
- 4.BRODIE, J.; PORTER, I.A. Boric-acid preservation of urine samples. *Lancet* 1(7690):133, 1971.
- 5.DORN, G.L. Microbial stabilization of antibiotic-containing urine samples by using the Flora-Stat urine transport system. *J Clin Microbiol* 29(10):2169-74, 1991.
- 6.DZIERZANOWSKA, D.; DZIEMIAN, L.; LINDA, H. Use of boric acid as a stabilizing agent in the urinary bacterial count. *Pol Tyg Lek* 31(7):277-8, 1976.
- 7.ERIKSSON, I.; LINDMAN, R.; THORE M. Microbiological evaluation of a commercial transport system for urine samples. *Scand J Clin Lab Invest* 62(5):325-35, 2002.
- 8.FAYINKA, O.A. Boric acid - a useful preservative for urine samples. *Afr J Med Sci* 2(4):377-85, 1981.
- 9.GILLESPIE, T.; FEWSTER, J.; MASTERTON, R.G. The effect of specimen processing delay on borate urine preservation. *J Clin Pathol* 52(2):95-8, 1999.
- 10.GOODMAN, L.J.; KAPLAN, R.L.; BARRETT, J.E.; HARRIS, A.A. A urine preservative system to maintain bacterial counts. A laboratory and clinical evaluation. *Clin Pediatr* 24(7):383-6, 1985.
- 11.HIPP, S.S.; ROCKWOOD, L.D.; GAAFAR, H.A.; HAN, Y. Evaluation of preservation methods and solid media suitable for recovery of *Ureaplasma urealyticum* from transported urine specimens. *J Clin Microbiol* 13(1):135-8, 1981.
- 12.HUGHES, C.; HACKER, J.; ROBERTS, A. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 39:546-751, 1983.
- 13.ISENBERG, H. D. (ed.). *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington: ASM Press, 1995.
- 14.JEWKES, F.E.; McMASTER, D.J.; HOUSTON, I.B.; POSTLETHWAITE, R.J. Home collection of urine specimens--boric acid bottles or Dipslides? *Arch Dis Child* 65(3):286-9, 1990.
- 15.KAYE, D. Antibacterial activity of human urine. *J Clin Invest* 47:2374-2390, 1968.
- 16.KOMAROFF, A.L. Urinalysis and urine culture in women with dysuria. *Ann Intern Med* 104:212-218, 1986.
- 17.KONEMAN, E.W. et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th Ed. Philadelphia: Lippincott, William & Wilkins, 1997.
- 18.KUNIN, C.M.; DeGROOT, J.E. Self-screening for significant bacteriuria. *JAMA* 231(13):1349-1353, 1975.
- 19.LAUER, B.A.; RELLER, L.B.; MIRRETT, S. Evaluation of preservative fluid for urine collected for culture. *J Clin Microbiol* 10(1):42-5, 1979.
- 20.LOMBERG, H.; CEDERGREN, B.; LEFFLER, H. Influence of blood group on the availability of receptors for attachment of uropathogenic *E. coli*. *Infect Immun* 51:919-926, 1986.
- 21.LUM, K.T.; MEERS, P.D. Boric acid converts urine into an effective bacteriostatic transport medium. *J Infect* 18(1):51-8, 1989.
- 22.MacFADDIN, J.D. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*, vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985.
- 23.MACKEY, J.P.; SANDYS, G.H. Diagnosis of urinary tract infections. *Br Med J* 1:1173, 1966.
- 24.MACKEY, J.P.; SANDYS, G.H. Laboratory diagnosis of infections of the urinary tract in general practice by means of a dip-inoculum transport medium. *Br Med J* 2:1286, 1965.
- 25.MAHON, C.R. & MANUSELIS Jr., G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1995.
- 26.MEERS, P.D.; CHOW, C.K. Bacteriostatic and bactericidal actions of boric acid against bacteria and fungi commonly found in urine. *J Clin Pathol* 43(6):484-7, 1990.
- 27.MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Ed. Washington: ASM Press, 1999.
- 28.NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Approved standard. Wayne: NCCLS, 2004.
- 29.NICAR, M.J.; HSU, M.C.; JOHNSON, T.; PAK, C.Y. The preservation of urine samples for determination of renal stone risk factors. *Lab Med* 18(6):382-4, 1987.
- 30.PAPPAS, P.G. Laboratory in the diagnosis and management of urinary tract infections. *Med Clin North Am* 75:313-325, 1991.
- 31.PATTON, J.P.; NASH, D.B.; ABRUTYN, E. Urinary tract infection: Economic considerations. *Med Clin North Am* 75:495-513, 1991.
- 32.PERRIN, J.; NICOLET, J. Influence of the transport on the outcome of the bacteriological analysis of dog urine comparison of three transport tubes. *Zentralbl Veterinarmed* 39(9):662-7, 1999.
- 33.PILONETTO, M.; PILONETTO, D.V. *Manual de Procedimentos Laboratoriais em Microbiologia*. Curitiba: Ed Microscience, 1998.
- 34.RIDDHIMAT, R.; TANTINITI, P.; NILAKUL, C. Boric acid in preservation of urine. *J Med Assoc Thai* 68(9):473-9, 1985.
- 35.SCHEER, W.D. The detection of leucocyte esterase activity in urine with a new reagent strip. *Am J Clin Pathol* 87(1):86-93, 1987.
- 36.SILVA, C.H.P.M. *Bacteriologia, um texto ilustrado*. Rio de Janeiro: Ed.Eventos, 1999.
- 37.SOBEL, J.D.; KAYE, D. Urinary tract infections. In MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th Ed. New York: Churchill Livingstone, 1995.
- 38.STINGHEN, A.E.M.; ALBINI, C.A.; SOUZA, H.A.P.H.M. *Coloração de Gram: como fazer, interpretar e padronizar*. Curitiba: Ed.Microscience, 2002.
- 39.STRASINGER, S.K. *Urinalysis and Body Fluids*. 3rd. Ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2000.
- 40.WACHTEL, D.; KNAUER, H.; METZEL, D.; BERARD, D. Possibilities of chemical germ-conservation and its meaning for the bacteriological urine diagnosis. *Schweiz Med Wochenschr* 105(7):204-8, 1975.
- 41.WACHTEL, D.; WOHLRABE, P. Demonstration of bacteriostatic substances in boric acid preserved urine specimens. *Z Gesamte Inn Med* 15;33(16):567-8, 1978.
- 42.WATSON, P.G.; DUERDEN, B.I. Laboratory assessment of physical and chemical methods of preserving urine specimens. *J Clin Pathol* 30(6):532-6, 1977.
- 43.WISE, K.A.; SAGERT, L.A.; GIMMENS, G.L. Urine leucocyte esterase and nitrite tests as an aid to predict urine culture results. *Lab Med* 15(3):186-187, 1984.
- 44.WRIGHT, D.N.; BOSHARD, R.; AHLIN, P.; MATSEN, J.M. Effect of urine preservation on urine screening and organism identification. *Arch Pathol Lab Med* 109(9):819-22, 1985.

Endereço para Correspondência:
Rua Lúcio Bacelar, 16/803
Vila Velha - ES CEP. 29101-030

PÉ DIABÉTICO: Epidemiologia da Resistência a Antimicrobianos de 61 cepas de *Staphylococcus aureus* Isoladas de 141 Pacientes Ambulatoriais

DIABETIC FOOT: Epidemiologia of the Resistance Isolated aureus the 61 Antimicrobials of cepas of *Staphylococcus* of 141 Ambulatoriais Patients

R. Motta Neto^{1*}; C.B.M. Carvalho¹; A.M. Dias¹; M.M. Oliveira² & LMC Câmara¹

RESUMO - Foram atendidos no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do Estado do Ceará, 141 pacientes diabéticos apresentando úlceras infectadas no período de 01/03/2001 a 30/11/2002 e submetidos a um estudo microbiológico no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. *Staphylococcus aureus* foi isolado de (43, 2%) dos pacientes. Das cepas de *Staphylococcus aureus* 07 (11,5%) apresentaram resistência à oxacilina (cepas ORSA). Todos os pacientes infectados por cepas ORSA relataram internação e/ou uso de antimicrobianos nos meses anteriores a coleta. Por ser o Diabetes Mellitus tipo 2 uma doença endêmica e o pé diabético sua complicação mais freqüente faz-se necessário que se crie nos centros de diabetes uma rotina para identificação dos agentes etiológicos causadores destas infecções.

PALAVRAS-CHAVE- Pé diabético. Microbiologia

SUMMARY - 141 diabetic patients with infected ulcers admitted at Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do Estado do Ceará, from 01/03/2001 to 30/11/2002, were submitted to Microbiologic study performed at Laboratório de microbiologia do Departamento de Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. *Staphylococcus aureus* was found in 43,2% of the patients. Among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated, 7 (11,5%) showed resistance to oxacilin (ORSA strains). All the patients infected with ORSA strains reported, hospital admittance and/ or antimicrobial use.

Because of the endemic behavior of diabetes mellitus and the high frequency of infected feet ulcers, it is necessary the establishment of routines in order to diagnose their etiologic agent.

KEYWORDS - Diabets, feet ulcer, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é o mais importante patógeno relacionado com infecções hospitalares, sendo considerado como o principal causador de infecções adquiridas na comunidade. Estes estão presentes na microbiota residente de 10 a 20% da população, tendo como sítios de colonização mais comuns as fossas nasais, axila e períneo[8].

Infecções comunitárias causadas por *Staphylococcus aureus* são bastante comuns. Pacientes com Diabetes Mellitus, doença dermatológica crônica, e usuários de drogas intravenosas, compõem o grupo de risco para infecções comunitárias causadas por estes agentes.[8] São também os estafilococos bactérias resistentes a antibióticos isoladas tanto no hospital como nas comunidades.[18]

Dada a importância dos antibióticos e a situação atual de multiresistência que ameaça sua utilização e todos os seus benefícios; faz-se notar a necessidade de se estudar a resistência. No Brasil, poucos trabalhos sobre epidemiologia da resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas de úlceras infectadas em pacientes diabéticos com infecção comunitária têm sido realizados. Como o diagnóstico bacteriológico raramente é realizado, o que se observa na prática clínica é que os pacientes são tratados com diversos antimicrobianos, aumentando assim os custos do tratamento e o tempo de internação.

A prevalência de diabetes no Brasil, na população urbana de 30 a 69 anos é de 7,6% e, em Fortaleza é de 6,5%. [10]

Entre as complicações crônicas do Diabetes Mellitus os problemas com os pés representam uma das mais importantes. A ulceração nos pés causa considerável morbidade entre os diabéticos e a amputação dos pés ou pernas é a consequência mais temida. A ulceração em pé diabético é a causa mais comum de amputações não traumáticas de membros inferiores em países industrializados.[2] A ulceração ocorre em 15% dos diabéticos e é responsável por 6 a 20% das hospitalizações. Nos hospitais universitários brasileiros, 51% dos pacientes internados nas enfermarias dos serviços de endocrinologia são por lesões graves nos pés.[14] No Rio de Janeiro no período 1990-1996, a incidência de amputação relacionadas ao diabetes foi de 180/100.000, representando um risco de amputação 100 vezes maior que em não diabéticos.[16] Em Fortaleza, no período de 1994/96, 63% das amputações registradas, ocorreram em diabéticos.[3]

OBJETIVOS

Traçar o perfil de isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de úlceras infectadas em pacientes diabéticos ambulatoriais, bem como, determinar sua sensibilidade a diferentes agentes antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

• Amostras Bacterianas

Recebido em 06/11/2003

Aprovado em 19/02/2004

*Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina; ²Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão

No período compreendido entre março de 2001 a novembro de 2002, espécimes clínicos provenientes de pacientes do Ambulatório de Pé Diabético, no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão (CIDH), em Fortaleza-Ce, foram enviados ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

•Coleta e Transporte

As lesões foram submetidas a limpeza com solução de cloreto de sódio (soro fisiológico), esta administrada em forma de jatos diretamente sobre a lesão e posterior limpeza com tampão de gaze estéril, preparando assim, o sitio para o debridamento quando necessário. Para o debridamento foi utilizado uma lâmina de bisturi descartável e estéril com intuito de retirar todo o tecido necrosado (quando presente) ou tecido morto que envolvia a lesão. Após esta etapa, submeteu-se a lesão a uma nova lavagem com solução de cloreto de sódio estéril (soro fisiológico), possibilitando assim, a coleta do espécime, presente na base da lesão para posterior análise microbiológica.

Após os procedimentos citados acima, o espécime clínico foi coletado com auxílio de um "swab", estéril e descartável. Este foi saturado com o material coletado e, imediatamente após a coleta, foi acondicionado em meio para transporte *Stuart*. O tempo decorrido entre a coleta e sementeira não excedeu a duas horas.

•Isolamento e Identificação de Cepas de *S. aureus*

O processamento dos espécimes clínicos foi realizado na seqüência descrita abaixo, utilizando-se procedimentos e meio de cultura recomendados por *Koneman et al.* (1997) e *Murray et al* (1999):[9,11]

- 1.Esfregaço do espécime clínico em lâmina corado pelo método de Gram Kopeloff-Beerman;
- 2.Semeadura do espécime clínico em placas de petri contendo o meio ágar sangue (BHI Agar, OXOID suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro) e meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion broth, DIFCO);
- 3.Incubação de placas e caldos inoculados em atmosfera convencional a 35°C por 24 /48h;
- 4.Análise do crescimento bacteriano , esfregaço de colônia suspeita em lâmina e posterior coloração pelo método de Gram Kopeloff-Beerman;
- 5.Realização das seguintes provas bioquímicas: teste da catalase, teste da coagulase (em lâmina e em tubo), tolerância a 7,5% de sal e fermentação do manitol .

•Antibiograma

Para cada espécime clínico identificado, foi realizado um antibiograma baseado na técnica de difusão em ágar como recomendado pelo manual NCCLS.[12] Foram testados os seguintes antimicrobianos: penicilina, cefalotina, oxacilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, clindamicina, sulfametoxazol + trimetoprim, vancomicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina e tetraciclina (OXOID).

Para verificar uma possível resistência de uma cepa isolada de *Staphylococcus aureus* frente à oxacilina, o NCCLS (2000) recomenda a triagem pelo método de difusão em ágar e o teste confirmatório por diluição em ágar. Na técnica de difusão em ágar deve ser utilizado disco de oxacilina de 11g e a incubação da placa deve ser de 24hs (e não de 16 a 18hs) se o resultado da leitura apresentar um halo de inibição indicando resistência, o teste confirmatório deve ser realizado.

Método de detecção e confirmação de cepas resistentes à oxacilina

Utilizar o ágar Müeller Hinton com NaCl a 4% mais 61g/ml

de oxacilina. Preparar o inóculo pelo método direto, ajustado na escala 0,5 Mc Farland (PROBAC). Introduzir um Swab estéril no inóculo, retirar o excesso contra a parede do tubo e semear com movimento circular em uma pequena área da placa (aproximadamente 2,5cm). Deixar secar, incubar 24 horas na estufa a 35°C. A presença de crescimento nesse meio indica a presença de gene mec A e portanto, resistência à oxacilina.[12]

RESULTADOS

Neste trabalho, 141 pacientes diagnosticados como diabéticos e que apresentavam úlceras infectadas nos pés foram estudados. Destes, 77 pertenciam ao sexo masculino e 64 ao sexo feminino sendo a faixa etária compreendida entre 50 a 70 anos a mais freqüente (61%). As lesões apresentadas foram classificadas quanto ao tipo de grau apresentado. Foi observado que 66,7% dos pacientes apresentavam lesões superficiais ou profundas sem comprometimento ósseo e sem abscesso. 35,5% dos pacientes relataram uso de antimicrobianos no dia da coleta ou no período de até 30 dias que antecederam a coleta.

Dos cocos gram positivos isolados neste estudo a espécie de maior freqüência de isolamento foi o *Staphylococcus aureus* com 61 cepas (20,4%) do total.

Analizando o seu perfil de resistência frente a diferentes agentes antimicrobianos, constatamos que 53 cepas foram resistentes às penicilinas (86,9%), 28 cepas resistentes às tetraciclina (45,9%), 26 cepas resistentes à eritromicina (42,6%), 13 cepas resistentes à rifampicina (21,3%), 12 cepas resistentes ao cloranfenicol (19,7%), 10 cepas resistentes ao sulfametoxazol + trimetoprim (16,4%), 7 cepas resistentes à oxacilina (11,5%), 6 cepas resistentes à cefalotina (9,8%), 5 cepas resistentes à amoxicilina + ác. clavulânico (8,2%) e nenhuma das 61 cepas isoladas apresentou resistência à vancomicina (0,0%) (Gráfico 1 e 2)

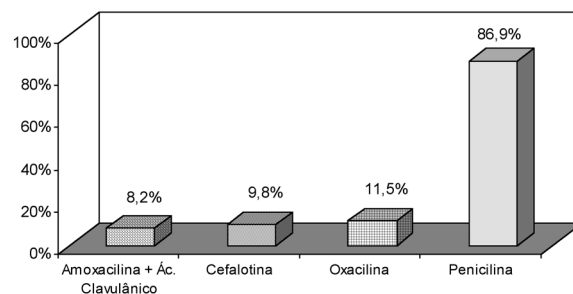


GRÁFICO 1: Percentual de resistência a antimicrobianos de 61 Cepas de *Staphylococcus aureus*.

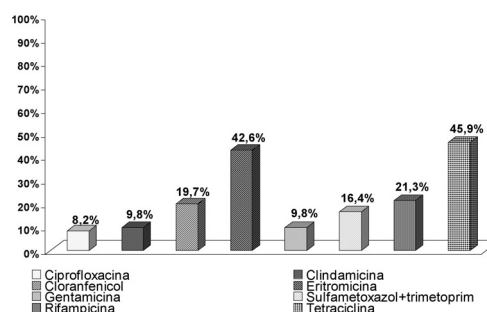


GRÁFICO 2: Percentual de resistência a antimicrobianos de 61 Cepas de *Staphylococcus aureus*.

DISCUSSÃO

O pé diabético constitui uma complicação multifacetada do Diabetes Mellitus. Nos pacientes ambulatoriais o *Staphylococcus aureus* é a bactéria mais freqüentemente isolada das úlceras infectadas. Neste estudo em 43,3% dos pacientes foram isolados *S. aureus* e cepas resistentes à oxacilina em 11,5% dos casos. Ao analisarmos estes pacientes, constatamos que todos haviam passado por internações uma ou mais vezes nos últimos 6 meses e alguns estavam fazendo uso de antimicrobianos no momento da coleta do exame.

O *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina é um problema crônico presente em hospitais da América Latina. Dados do programa SENTRY revelam que 30% à 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de hospitais apresentam resistência à oxacilina. [5,15]

A primeira cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) foi isolada em 1960, logo após a introdução da metilicina na terapêutica. Naquela data o número de isolados MRSA na comunidade era em torno de 0,1%, mas desde então tem-se disseminado em todo o mundo. Estas cepas são mais freqüentemente isoladas em hospitais. Estudos recentes têm demonstrado que os níveis de resistência de estafilococos, enterococos e pseudomonas são mais elevados em microrganismos oriundos de pacientes nas UTIs, menores em pacientes provenientes de outras alas do hospital e menores ainda em pacientes ambulatoriais [1].

Até o final da década de 70 havia pouca evidência da disseminação de cepas MRSA na comunidade. Entretanto, a partir da década de 80, vários relatos de infecção por MRSA em pacientes que não haviam sido internados nem tido contato com pessoal que trabalha em hospital foram publicados. Tem sido demonstrado que o estado de portador de MRSA persiste por anos em alguns pacientes, garantindo assim a disseminação dessas cepas, uma vez que estes pacientes voltam para a comunidade. Assim, parecem existir evidências de disseminação de MRSA na comunidade e fora dos grupos de risco, onde constatamos que mais estudos são necessários para determinar o estado de disseminação dessas cepas na comunidade. [7,18]

No Brasil, os estafilococos no meio hospitalar vem mostrando elevado índice de resistência à metilicina (portanto, também à oxacilina e cefalosporinas) repetindo-se o observado em outros países. Relatos de hospitais em diferentes regiões brasileiras encontram 30% a 100% das cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina. Esta situação da resistência à oxacilina varia com a região e, mesmo, com o hospital analisado, devendo ser avaliada localmente. [13,17] Goldstein *et al* [4]., em trabalho publicado em 1996, constataram que 20% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de úlceras de pé diabético em pacientes ambulatoriais, apresentavam resistência à oxacilina. [5] O autor chama a atenção para a disseminação, naquele país, de cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina tanto no ambiente hospitalar como na comunidade.

No presente estudo os resultados encontrados foram diferentes dos obtidos por Goldstein *et al*. O número de cepas resistentes à oxacilina foi pequeno e todas foram adquiridas no ambiente hospitalar. Dada a cultura de auto-medicação talvez fosse esperado um achado diferente. Entretanto os pacientes que são atendidos nos centros de referência em diabetes são de baixa renda e geralmente apresentam lesões iniciais de leve a moderada gravidade. O uso de antimicrobianos não é freqüentemente relatado. Nesse estudo dos 114 pacientes estudados apenas 35,5%

relataram o uso de antimicrobianos no período da coleta ou em até 30 dias antes da coleta. Sendo que a maioria destes pacientes tinham história de internações anteriores.

Hart & Kartuki [6] (1998), em estudo sobre a resistência a antimicrobianos em países em desenvolvimento relatam os altos percentuais de isolamentos resistentes a antimicrobianos nestes países e alertam para a ausência ou carência de laboratórios de microbiologia nesses países a fim de que o tratamento seja baseado no isolamento do agente e no traçado do seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Tratamentos empíricos dificultam a implantação de estratégias de tratamento, visto que a resistência varia de região para região, o que leva nesses países a um tratamento inadequado dos pacientes, com conseqüente aumento dos custos, morbidade e mortalidade.

Na ausência de laboratório de microbiologia no centro estudado a escolha do antimicrobiano no tratamento de pacientes diabéticos com úlceras infectadas é realizado de forma empírica. A necessidade de um diagnóstico etiológico para um tratamento e acompanhamento adequado desses pacientes, fez-se notar visto também que a maioria depende dos medicamentos fornecidos pelo centro para realização do seu tratamento. Por este motivo, faz-se necessário que cada centro ou região tenham seus próprios dados sobre os microrganismos prevalentes nesses processos infecciosos para que uma terapia mais adequada possa ser aplicada. Relatos de crescente resistência bacteriana a antimicrobianos tem contribuído para sedimentar a necessidade de que estudos de sensibilidade à antimicrobianos devam ser realizados localmente e com periodicidade.

AGRADECIMENTOS

- A todos os funcionários do Ambulatório de Pé Diabético do Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão (CIDH), pela ajuda e apoio.
- A Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Archibald, P.L.; Phillips, L.; Monnet, D.; Mc. Gowan, J. E.; Tenover, F.; Gaynes, R. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients. In the United States: in creasing importance of the intensive care unit. Clin . Infect. Dis., v. 24, n. 2, p. 211-215, 1997.
2. Armstrong DG, Lavery LA, Harkless LB. Who is at risk for diabetic foot ulceration? Clin Podiatr Med Surg, v.15,n.1,p.11-14, 1998.
3. Forti, AC.; Spichler, ERS.; Spichler, D.; Franco, JL.; Oliveira, MM.; Paz, S.V.R.; Santos, CM.; Bezerra, M.J.P.; Rebello, M.M.C.B. Amputações de MMII em Fortaleza-Ce,1994-1996. Arquivos Bras de Endocrinologia e Metabologia, v.43, n. 5, p. S299,1999.
4. Goldenstein, E.J.; Citron, D.M.; Nesbit, C.A.. Diabetic foot infections: bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. Diabetes Care, v. 10, p. 638-641, 1996.
5. Guzman-Blanco, M.; Casellas, J.M. and Sader, HS.Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latina America: the giant is awakening. Infect Dis Clin North Amer, v. 14, p.67-81, 2000.
6. Hart, C.A.1998.Antimicrobial resistance in developing countries. BMJ, v. 317,p.647-50.
7. Hiramatsu, K.; Aritaka, N.; Hanaki, H.; Kawasaki, S.; Hosada, Y.; Hori, S.; Fukushima, Y.; Kobayashi, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet, v. 350:1688-71, 1997.
8. Kauffman, C.A.; Bradley, S.F. Epidemiology of community-acquired infection. In: The staphylococci in human disease. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 309-330.
9. Koneman EW.; Allen SD.; Janda WM.; Schrecken SPC.; Winn Jr WC. Color

10. Liga de diabetes/ Ministério da Saúde. Epidemiologia do Diabetes mellitus <http://morfo.fmrp.usp.br/diabetes/textos/diaminis.html>
11. Murray P.R.; Barron E.J.; Pfaller M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. Manual of clinic microbiology. 7th ed. Washington, DC, 1999.
12. National Committee For Clinical Laboratory Standards. (NCCLS) for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard - M2A7. 7th ed. 2000.
13. Otilia Santos, HLR.; Patrícia Pinheiro, YM.; Miguel, R.; Cyranka, Y. Perfil de sensibilidade do *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* no Hospital Municipal Souza Aguiar, 1º semestre de 1998. Rev Soc Bras Med Trop, v.32, p.27-35.1999.
14. Pedrosa HC. Pé diabético: aspectos fisiopatológicos, tratamento e prevenção. Rev Bras Neurol Psiquiatr, v.1, p.131-135, 1997
15. Pfaller, M.A.; Jones, RN.; Doern, G.V.; Sader, HS.; Kugler, K.C.; Beach, ML. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in

16. Spichler, E.R.S.; Spichler, D.; Martins, C.SF, et al Diabetic lower extremities Amputation- Rio de Janeiro, BR. Diabetologia, v. 41, p. 90-96, 1998.
17. Tavares, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Rev Bras Med Trop, v.33, n.3, p.-35,2000.
18. Tenover, F.C. A melhor época, a pior época. A evolução do problema da resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos. Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas. Relatório especial Hosp. Pract p. 8-13, 2000

Oito de Setembro 1444/ Apto 264-G .Varjota. Fortaleza –CE, CEP: 60175-210,
e-mail: rmotta_net@hotmail.com: Fone:(0 xx 85) 267 2876. 9987 1354



SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Efeito do Benzonidazol em Fígados de Ratos Perfundidos

Benzonidazol Effects in Perfused Rat Liver

Áurea Regina Telles Pupulin; Andrey Paludetto; Sandra Vieira da Silva & Ana Maria K. Bracht

RESUMO - O benzonidazol é hoje a única droga disponível para o tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil, sendo utilizado sob estrita supervisão médica, já que é utilizado por longo tempo e provoca efeitos colaterais relativamente graves. Por outro lado, a droga ideal para o tratamento etiológico da doença de Chagas ainda não existe. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do benzonidazol em fígados de rato perfundidos. Foi empregado o sistema de perfusão de fígado isolado de rato, com um meio de perfusão livre de hemoglobina, conforme originalmente concebido por Scholz & Buecher (1965) e descrito por Kelmer-Bracht *et al.* (1984). Foram realizadas duas séries de experimentos: na primeira série, avaliou-se a neoglicogênese a partir de alanina em fígados de ratos em jejum e, na segunda, avaliou-se a glicogenólise e a glicólise em ratos alimentados. Observou-se uma discreta diminuição da concentração de glicose e um leve aumento no consumo de oxigênio nos fígados de ratos em jejum. Nos fígados de ratos alimentados observou-se um aumento na produção de lactato em cerca de 30%, redução na produção de piruvato em torno de 70% e da liberação de glicose em cerca de 16%. O consumo de oxigênio teve uma ativação de 5%. O benzonidazol causou um discreto efeito, diminuindo a produção de glicose pelo fígado. A ativação da respiração e a alteração da razão redox citoplasmática (indicado pelo aumento da razão lactato/piruvato), podem ser decorrentes da metabolização do fármaco pelo sistema monooxigenase.

PALAVRAS CHAVE- Benzonidazol, Fígado, Perfusão.

SUMMARY - The benzonidazol is the only available drug in Brazil to the etiologic treatment of Chagas disease, it is used with strict medical supervision, once it is to be used for long periods and cause serious collateral effect. On the other hand, the ideal drug to the etiologic treatment to Chagas disease still does not exist. The aim of this work was to verify the benzonidazol effects in perfused rat liver. It was used the perfusion system of isolated rat liver, with a perfusion place without hemoglobines, as originally conceived by Scholz and Buecher (1965) and described by Kelmer-Bracht *et al.* (1984). Two series of experiments had been carried through: in the first one, the neoglucogenesis was evaluated from alanine in liver of not fed rats, and in the second one, the glucogenolysis and the glycolysis in fed rats. A short reduction of the glucose concentration was observed and a light increase in the consumption of oxygen in the liver ones of the not fed rats. In the liver of fed rats, an increase of lactate production in about 30%, a decrease of piruvate production in about 70% and of the glucose release in about 16% were observed. The oxygen consumption had an activation of 5%. Benzonidazol caused a discrete effect, decreasing the liver glucose production. The breath activation and the alteration of the cytoplasmatic redox ratio (indicated by the increase of the ratio lactate/piruvate), can be decurrent of the metabolization of the medicine by the monooxygenasis.

KEYWORDS - benzonidazol, liver, perfusion

INTRODUÇÃO

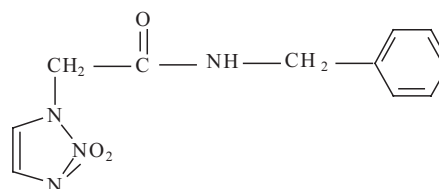
A doença de Chagas descrita em 1909 por Carlos Chagas continua sendo um sério problema de saúde pública. A Organização Pan-Americana de Saúde estima que entre 18 a 20 milhões de pessoas estão infectadas no continente americano e 40 milhões de pessoas estão sob risco de adquirir a doença (Morel, 2000; WHO, 2002; Vinhaes & Schofield, 2003).

A doença de Chagas humana apresenta uma fase aguda que dura em média 2 meses, durante a qual o parasita é encontrado com certa facilidade, seguida de uma fase crônica, na qual o parasitismo é escasso e que pode durar por toda a vida do indivíduo.

O benzonidazol (Bz) e o Nifurtimox (Nfx) são as drogas disponíveis para o tratamento específico da doença de Chagas. São indicadas para o tratamento da fase aguda e sob estrita supervisão médica e acompanhamento prolongado para pacientes na forma indeterminada da fase crônica da doença.

A droga ideal para o tratamento da doença de Chagas ain-

da não existe. A experiência acumulada com tratamento específico da forma aguda mostrou que a quimioterapia geralmente evita a letalidade e em certa porcentagem é capaz de curar (Cançado, 1991). É de grande interesse, portanto, se obter o máximo de informações sobre o modo e o mecanismo dos agentes quimioterápicos utilizados. O benzonidazol é um derivado nitroimidazólico (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) como mostra a estrutura abaixo:



A ação tripanomicida do benzonidazol manifesta-se tanto na fase aguda quanto na fase crônica da tripanossomíase de Chagas. É possível que seu efeito tripanomicida não dependa da produção de radicais livres e nem da redução do grupo nitro.

O benzonidazol inibe a respiração do *Trypanosoma cruzi* e

Recebido em 08/12/2004
Aprovado em 23/12/2004
Universidade Estadual de Maringá - PR

não leva a produção de radicais livres em concentração capazes de inibir o crescimento do parasito (Do Campo & Moreno, 1983). Por outro lado, o benzonidazol afeta a síntese de proteínas e RNA em formas de cultura de *Trypanosoma cruzi* (Polak & Richle, 1978).

O benzonidazol é insolúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Após administração por via oral, distribui-se pelos tecidos e atravessa a barreira hematoencefálica. Sofre metabolização hepática e seus metabólitos são eliminados principalmente na urina. Casos de insuficiência hepática e renal podem relativamente contra-indicar o uso do fármaco. Durante o tratamento com benzonidazol (30 a 60 dias consecutivos), podem surgir reações cutâneas e gastrintestinais. Com doses excessivas podem ocorrer parestesias ou sintomas de polineurites periféricas e febre. A ocorrência desses sintomas leva a suspensão do tratamento (Cançado, 2000). A polineuropatia aparece até uma semana depois de terminado um tratamento bem tolerado. Temos razão para acreditar que este é um efeito cumulativo.

Ainda é possível prever de sua estrutura química, pelo grupo nitro ligado ao imidazol, que o benzonidazol provoca com frequência depressão da medula óssea; há neutropenia com hemácias e plaquetas inalteradas. O aparecimento da agranulocitose é imprevisível, o que impõe cautela no uso do medicamento.

Apesar de apresentar vários efeitos colaterais graves, e o tempo de tratamento relativamente prolongado, ainda hoje pouco se conhece sobre o mecanismo de ação da droga, seus efeitos sobre a célula hospedeira, inclusive toxicidade. Deste modo é de interesse o estudo sobre o efeito do benzonidazol em relação ao metabolismo hepático de mamífero.

O método da perfusão do fígado isolado de ratos é uma técnica na qual os vasos aferentes (veia porta e artéria hepática) e o vaso eferente (veia hepática) do órgão são canulados, de tal maneira que o experimentador pode controlar a qualidade do líquido arterial e coletar, para posterior análise, o líquido venoso. Podem ser utilizadas bombas para impulsionar o líquido de perfusão através do órgão ou a força da gravidade. A microcirculação e as relações intercelulares são, em geral, pouco alteradas. Foram realizadas duas séries de experimentos: na primeira série, avaliou-se a neoglicogênese a partir de alanina em fígados de ratos em jejum; e na segunda, avaliou-se a glicogenólise e a glicólise em ratos alimentados.

No fígado em perfusão, além das vias metabólicas já citadas acima, podem ser analisadas várias outras, como, por exemplo: o consumo de oxigênio, a cetogênese, a captação de ácidos graxos, a frutólise, o metabolismo do glicerol, a biotransformação de drogas e assim por diante (Kelmer-Bracht & Andrade, 1984).

MATERIAL E MÉTODOS

Extração e análise do benzonidazol

O método utilizado para isolar o benzonidazol do medicamento comercial RochaganR foi a extração a frio utilizando etanol.

Perfusão de fígado isolado de rato

1. O sistema de perfusão

Neste trabalho, foi empregado o sistema de perfusão de fígado isolado de rato, com um meio de perfusão livre de hemoglobina, conforme originalmente concebido por Scholz & Buecher (1965) e descrito por Kelmer-Bracht *et al.* (1984).

2. Líquido de perfusão

O líquido de perfusão padrão é o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (Krebs & Henseleit, 1932) com pH 7,4, quando saturado com a mistura de oxigênio: dióxido de carbono (95:5%). O líquido contém também albumina bovina 25 mg%. A composição salina do tampão é a seguinte: NaCl 115Mm; NaHCO₃ 25 Mm; KCl 5,8 Mm; Na₂ SO₄ 1,2 Mm; MgCl₂ 1,18 mM; NaH₂PO₄ 1,2Mm e CaCl₂ 1,3 Mm.

Substratos, drogas e hormônios podem ser dissolvidos no líquido de perfusão nas concentrações desejadas. Na primeira série de experimentos deste trabalho foram dissolvidos, L-alanina na concentração de 2,5mM e o benzonidazol 0,1mM.

3. Técnica de perfusão de fígado isolado de rato

Para remoção cirúrgica do fígado, o rato é previamente anestesiado com Thionembutal. O abdômen é aberto, o tecido conjuntivo que cerca o fígado é seccionado. O esôfago é separado do estômago. A veia esplênica fechada e a veia porta canulada sob fluxo. Isto leva ao completo dessangramento do fígado. Após fechamento e seccionamento distal da veia cava inferior, o tórax é aberto, tendo-se cortado o diafragma e as costelas para exposição completa do coração. A veia hepática é canulada através da veia cava superior, e o fígado removido e colocado na câmara do fígado. O fluxo através do órgão é ajustado para valores que permitam oxigenação adequada (entre 4 e 5 ml por minuto, por grama de fígado), o que pode ser avaliado a partir da concentração venosa de oxigênio (nunca inferior a 0,2 Mm).

O sistema de perfusão é formado por duas bombas peristálticas, um oxigenador de membrana e pela câmara do fígado. A este sistema estão ainda acoplados um microeletrodo de platina com polarógrafo, um registrador potenciométrico, um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido, um cilindro contendo a mistura carbogênica (O₂: CO₂/ 95:5) e uma bomba de infusão. As partes essenciais deste sistema foram construídas nas oficinas da Universidade Estadual de Maringá (Kelmer-Bracht *et al.*, 1984). Na primeira série de experimentos utilizou-se rato em jejum, para avaliar-se a gluconeogenese. Iniciou-se o experimento perfundindo-se apenas o tampão de Krebs/Henseleit-bicarbonato, e foram coletadas alíquotas do perfusado efluente a cada dois minutos. Ao final de 10 minutos, contados a partir do momento em que o consumo de oxigênio estiver estabilizado, perfundiu-se o tampão contendo L-alanina até o tempo de 30 minutos do início do experimento, quando, então, iniciou-se a perfusão da solução de Bz (benzonidazol+tampão+alanina) por um período de 20 minutos, após o qual, retornou-se para o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo alanina.

Na segunda série de experimentos, utilizou-se rato alimentado, para avaliar-se a glicólise e glicogenólise. Nestes experimentos foi dissolvido no líquido de perfusão (tampão Krebs/Henseleit bicarbonato) apenas o benzonidazol 0,1 mM, e seguiu-se os mesmos procedimentos descritos acima para coleta de amostras do perfusado.

4. Dosagens bioquímicas

A quantificação de lactato, piruvato ou glucose foi feita por métodos enzimáticos com medidas espectrofotométricas. A dosagem de lactato foi feita pelo método de Gutmann & Wahlefeld, 1974. A dosagem de piruvato segundo Czok & Lamprecht, 1974 e a glucose foi dosada pelo método da glucose-oxidase empregando-se kit de dosagem enzimático-colorimétrico da CELM.

5. Oxigênio

A concentração de oxigênio no perfusado venoso foi medida polarograficamente, através de um eletrodo de prata/cloreto. As variações na concentração venosa do oxigênio foram registradas e foram deduzidas da concentração arterial que foi mantida constante (860 μM) pelo oxigenador. A velocidade de respiração foi expressa em μmoles de oxigênio consumidos por minuto, por grama de fígado, e foi calculada pela seguinte equação:

Consumo de oxigênio=

$$\frac{\text{Fluxo}(\text{concentração arterial} - \text{concentração venosa})}{\text{Peso do fígado em (g)}}$$

Cálculo do fluxo metabólico

Os fluxos metabólicos são expressos em μmol por minuto por grama de fígado ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). A fórmula geral para o cálculo nas dosagens espectrofotométricas é:

Fluxo metabólico = fator x absorbância

O fator para dosagem enzimática da glicose é :

$$\text{Fator} = \frac{\text{fluxo (ml / min)} \times \text{concentração do padrão}}{\text{peso do fígado (g)} \times \text{absorbância do padrão}}$$

Métodos numéricos

Os resultados dos experimentos de perfusão são a média de pelo menos três experimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando fígados de ratos mantidos em jejum, por pelo menos 24 horas, são perfundidos, estes órgãos mantêm a capacidade gluconeogênica, resultada da adaptação nutricional imposta aos animais (Ross *et al.*, 1967). Assim, quando precursores gluconeogênicos são infundidos, a liberação de glicose pelo fígado representa a atividade gluconeogênica, visto que os níveis de glicogênio destes animais é baixo.

Nos experimentos realizados, foram utilizados fígados de ratos em jejum, por um período de 24h e como substrato gluconeogênico a alanina 2,5 mM. Conforme mostra o gráfico 1, no início do experimento (primeiros 10 minutos), a produção de glicose pelo fígado foi praticamente nula pois ainda não havia sido infundido substrato para a sua síntese. O consumo de oxigênio permaneceu estável, pois o fígado estava consumindo O_2 , porque estava oxidando ac. graxos endógenos, produzindo NADH e FADH₂ que são equivalentes redutores, doadores de e^- para o O_2 e produzindo ATP na mitocôndria. Após este período inicial, foi então perfundida a alanina, a qual aumentou a concentração de glicose, pois o fígado começa a realizar a gluconeogênese. Simultaneamente ocorreu a ativação do consumo de oxigênio, porque houve produção de ATP pelo fígado para fornecer energia a gluconeogênese.

Quando se começou a perfundir o benzonidazol (30 minutos após o início do experimento), junto com a alanina, observou-se uma discreta diminuição da concentração de glicose e um leve aumento no consumo de oxigênio e, logo após sua retirada os valores voltaram aos níveis normais, como quando estava perfundindo somente a alanina.

Na segunda série de experimentos foram utilizados ratos alimentados. Os fígados possuíam uma fonte de energia endógena, o glicogênio. Avaliou-se então a glicólise e a glicogenólise através da liberação de glicose, de lactato e piruvato e o consumo de oxigênio.

A glicose é liberada pela fosforólise do glicogênio, as unidades de glicose dos ramos externos da molécula do glicogê-

nio ganham entrada na via glicolítica através da ação sequencial de duas enzimas: a fosforilase do glicogênio e a fosfoglicomutase. Lactato e piruvato são liberados em sua maior parte porque a velocidade de sua produção é superior à capacidade das células de oxidá-los na cadeia respiratória.

Após 10 minutos do início do experimento, quando se começou a infundir o benzonidazol 0,1 mM, observou-se um aumento na produção de lactato em cerca de 30% e houve também redução na produção de piruvato em torno de 70% e da liberação de glicose em cerca de 16%. No consumo de oxigênio houve uma leve ativação da respiração (5%). Quando o Bz foi retirado após passados 30 min do início do experimento, os valores voltaram próximos aos níveis basais de quando não havia infundido a droga (gráfico 2).

O efeito do benzonidazol observado sobre a produção de glicose e a respiração, em animais alimentados e em jejum, pode ser proveniente da sua metabolização pelo sistema monooxigenase, o qual emprega um tipo de heme-proteína chamada citocromo P-450. O citocromo P-450 catalisa as reações de hidroxilação nas quais um substrato orgânico RH é hidroxilado para R-OH às custas de um átomo de oxigênio do O_2 ; o outro átomo de oxigênio é reduzido até H_2O pelos equivalentes redutores fornecidos pelo NADH ou NADPH e, é esse fornecimento de equivalentes redutores que pode estar alterando a produção de lactato e piruvato pelo fígado, pois, na reação de síntese desses compostos, há a utilização de NAD⁺/NADH respectivamente. Em resumo, o citocromo P-450 realiza, entre outras funções, a hidroxilação de compostos estranhos ao organismo, transformando-os em substâncias mais solúveis em água, o que permite sua eliminação na urina. Este fato seria compatível com os valores de glicose e consumo de oxigênio, observados após a retirada da droga do meio de perfusão, o que permite ao fígado retornar ao seu funcionamento anterior.

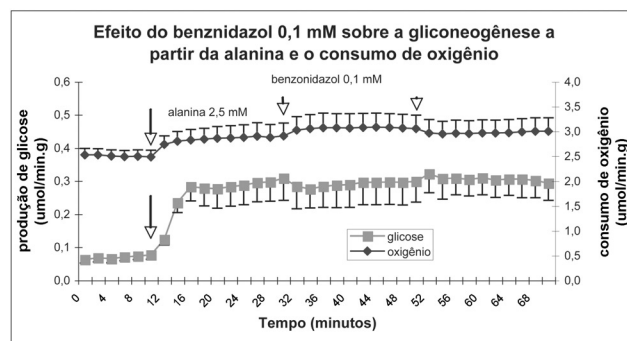


GRÁFICO 1

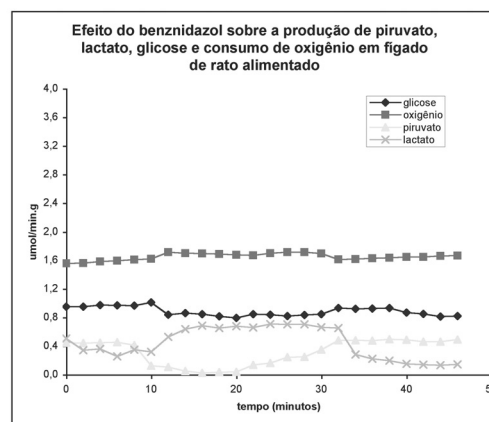


GRÁFICO 2

CONCLUSÕES

O benzonidazol causou um discreto efeito, diminuindo a produção de glicose pelo fígado, como mostra os dados obtidos. A ativação da respiração e a alteração da razão redox citoplasmática (indicado pelo aumento da razão lactato/piruvato), podem ser decorrentes da metabolização do fármaco pelo sistema monooxigenase.

REFERÊNCIAS

- CANÇADO J.R. (2000) Tratamento Etiológico da Doença de Chagas pelo Benzonidazol. Em: BRENER Z., ZILTON A.A. & BARRAL-NETO M. (eds) Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. 2ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 389-405.
- CANÇADO, J.R. Eficácia da Terapêutica do Benzonidazol na doença de Chagas aguda humana. Ver. Soc. Bras. Med. Trop., 24(supl.I):20-21, 1991.
- CZUK, R. ; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D- glycerate 2-phosphate. In: BERGMEYER, H.V. Methods of Enzymatic Analysis, 2. New York, Academic Press, 1974, p.1446-1448.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. In.: Oxygen radicals in chemistry and biology, BORNS, W. et. alii, Berlin, 1983. Pp 4
- GUTMANN, I. & WAHLEFELD, W. L(+) Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD+ In: BERGMEYER, H. V. methods of Enzymatic Analysis, 2 Academic Press, New York, 1974 p. 1464-1466.
- KELMER – BRACHT, AM. ; ISHII, E.L. ; ANDRADE, P.V.M. & BRACHT, A. Construção

- on of a liver perfusion apparatus for studies on metabolic regulation and mechanisms of drug action. Arq. Biol. Tecnol., 27(4): 419-438, 1984
- KREBS, H.A. & HENSELEIT, H. Untersuchungen über die Harnstoffbildung in Tierkörper. Z. Physiol. Chem., 210: 33, 1932
- MOREL, CM. Reaching Maturity-25 years of the TDR. Parasitol. Today 16, 522-525, 2000.
- POLAK, A. & RICHELE, R. Mode of action of the 2- Nitromidasole derivative benzonidazole. Ann. Trop. Med. Parasitol., 72(1), 45-54, 1978.
- PRATA, A., MACEDO, V. , PORTO, G., SANTOS, I., CERISOLA, J.A. & SILVA . Tratamento da doença de Chagas pelo Nifurtimox (Bay- 2502). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 9.297 – 304, 1975.
- ROSS, B.D.; FREEDLAND, R.A. & KREBS, H. A. Carbohydrate metabolism in the perfused rat liver, Bioch. J., 105: 869-875, 1967
- SCHOLZ, R. & BUECHER, T. Hemoglobin free perfusion of rat liver. In: CHANCE, B.; ESTABROOK, R.W. & WILLIAMS, J.R. Control of energy metabolism. New York, Academic Press, 1965, p.393-414
- VINHAES, MC & SCHOFIELD, C.J. Tripanosomiasis control: surmounting diminishing returns. Trends. Parasitol., 19, 112-113, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas Disease. Technical Reports Serie, 905, 1-109, 2002.

Endereço para Correspondência:
Dra. Aurea Regina T. Pupulin
Av. Colombo, 5790
CEP. 87020-900 Maringá - PR



XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas VI Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

04 a 08 de junho de 2006

Local:
Estação Embratel Convention Center - Curitiba - PR

Promoção e Realização

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Bases Moleculares da Resistência do *Mycobacterium Tuberculosis* As Drogas Usadas no Tratamento da Tuberculose* - Revisão

Molecular Bases of the Resistance Of *Mycobacterium Tuberculosis* to the Drugs Used in the Treatment Against Tuberculosis

Francisco Afrânio Cunha¹ & Cristiane Cunha Frota²

RESUMO - Uma revisão sobre diferentes estratégias moleculares empregadas pelas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, as quais conferem resistência as principais drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. São analisadas as resistências a rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol e a multiresistência a drogas.

PALAVRAS-CHAVE - *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculose multidroga-resistente. *rpoB*. *katG*. *pncA*. *embB*.

SUMMARY - A review on different molecular strategies used by strains of *Mycobacterium tuberculosis*, which confers resistance to the main drugs used in the treatment of the tuberculosis. It is discussed the resistance to rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, ethambutol and the multidrug-resistant tuberculosis.

KEYWORDS - *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis multidrug-resistant. *rpoB*. *katG*. *pncA*. *embB*.

INTRODUÇÃO

A doença tuberculose, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis*, é uma infecção crônica que tem afligido a humanidade há cinco milênios. Esta doença permanece como um sério problema de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo e cerca de 8 a 10 milhões de casos novos acontecem a cada ano, com dois milhões de mortes⁴⁸.

Nos últimos anos o número de casos de tuberculose recrudescceu em todo mundo, sendo uma das razões o advento da pandemia de AIDS e mais recentemente o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à drogas. O surgimento de cepas resistentes é preocupante, pois existem poucas drogas efetivas contra a tuberculose, o que tornaria a doença sem tratamento. Devido a esta razão é imprescindível o conhecimento das diferentes estratégias moleculares desenvolvidas pelo *M. tuberculosis* que lhe conferem resistência às drogas utilizadas, bem como, o desenvolvimento de técnicas diagnósticas que possam detectar essas resistências⁶.

Cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina e à isoniazida têm surgido tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A magnitude do problema é refletida na estimativa do número de casos novos, que estarão em torno de 12 milhões no ano de 2005 no mundo. Cerca de 80% dos casos novos ocorrem em apenas 22 países, com mais da metade dos casos ocorrendo em cinco países asiáticos²⁸.

O tratamento quimioterápico (seis meses), constitui-se como o mais eficaz no combate à tuberculose, podendo curar até 85% dos casos. Os principais fármacos empregados no tratamento de curta duração são constituídos de: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol⁴⁸. O paciente com tuberculose recebe por dois meses as três drogas, que diminuam as chances de aparecimento de cepas resistentes

e nos quatro meses seguintes o paciente recebe somente rifampicina e isoniazida. O tratamento de curta duração é efetivo para a maioria dos casos, mas exige adesão do paciente e do médico, com a prescrição adequada dos fármacos e acompanhamento do paciente. Se a resistência à rifampicina tornar-se disseminada, ameaçará o sucesso do moderno tratamento de curta duração da tuberculose³⁴. No caso de tratamento para casos de cepas resistentes às drogas é estimado que o custo do tratamento seja 50 vezes mais elevado do que o esquema para cepas sensíveis¹².

O considerável progresso no entendimento do mecanismo de ação das drogas e das bases moleculares de resistência a esses compostos tem permitido avaliar a resistência em cepas de *M. tuberculosis* com rapidez e segurança²⁶.

BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DO *Mycobacterium tuberculosis* À RIFAMPICINA

A rifampicina (RIF) é um fármaco lipofílico altamente ativo contra micobactérias, se difunde rapidamente através do envelope hidrofóbico das micobactérias, a qual foi introduzida para o uso na terapia contra tuberculose no início de 1970 e é atualmente o mais importante componente do esquema terapêutico contra a tuberculose. A resistência à RIF ocorre com uma frequência de 10⁻⁸ e geralmente funciona como um marcador para resistência à outras drogas do esquema de tratamento da tuberculose^{6,15}.

Com base em detalhados estudos conduzidos em *Escherichia coli* o mecanismo molecular de ação da RIF foi elucidado e envolve a inibição da atividade da enzima RNA polimerase DNA dependente, codificada pelo gene *rpoB*. Em *E. coli*, esta enzima é um complexo oligomérico composto de quatro subunidades diferentes (α , β , β' e σ , codificadas pelos genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* e *rpo1*, respectivamente). A RIF liga-se a subunidade β da RNA polimerase inibindo a transcrição do DNA em RNAm, deste modo interferindo

Recebido em 08/12/2004

Aprovado em 11/01/2005

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Laboratório de Pesquisa em Micobactérias
*Farmacêutico-Bioquímico, Mestrando em Microbiologia Médica do Departamento de Medicina e Patologia Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (DPML/FM/UFC).

² Professora Adjunta de Microbiologia do DPML/FM/UFC. =

com a transcrição e alongação da cadeia de RNAm^{8,36}. Estudos genéticos realizados no início dos anos 80 mostraram que *E. coli* pode apresentar mutações e deleções no gene *rpoB*. Esses estudos genéticos foram a base para o estudo das mutações que podem ocorrer no *M. tuberculosis* e conferir resistência a RIF⁴⁶.

Telenti⁴⁶ *et al* (1993), clonaram e seqüenciaram uma região cognata do gene do *M. tuberculosis* usando uma seqüência disponível de gene *rpoB* do *M. leprae*. Os dados foram usados para produzir primers para amplificação e seqüenciamento de um fragmento de 411 pb do gene *rpoB* de 66 cepas RIF-resistentes e 56 cepas RIF- sensíveis isoladas de pacientes de vários continentes. Um total de 15 mutações distintas envolvendo oito aminoácidos em uma região contendo 23 aminoácidos no total (69 pb) foram identificadas em 64 das 66 cepas RIF-resistentes mas, também, em 9 das 56 cepas RIF-sensíveis. Mutações específicas nos códons 526 e 531 foram encontradas em 80% dos casos resistentes. Vários estudos evidenciam que mutações no gene *rpoB* do *M. tuberculosis* confere resistência à RIF. A Tabela 1 mostra o resultado de vários estudos realizados em que mutações nos códons 516, 526 e 531 do gene *rpoB* estão implicadas na resistência à RIF.

Cerca de 95% das mutações ocorre nos códons 516, 526 e 531, o que possibilitou o desenvolvimento de testes diagnósticos para detectar a resistência à RIF (Figura 1). Essas mesmas mutações, quando acontecem em *E. coli*, ocorre o aumento do tempo de divisão e defeitos na terminação de proteínas, fenômeno não observado em cepas de *M. tuberculosis* devido a um longo tempo de geração⁶.

Segundo Rossetti *et al* (2002) foram realizados vários estudos para caracterizar as linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à RIF. Uma compilação de dados disponíveis indicou que 96% das cepas de *M. tuberculosis* resistente à RIF, isoladas de pacientes não relacionadas epidemiologicamente, apresentaram 35 mutações diferentes localizadas em uma região central de 81 bp no gene *rpoB*. A mutação mais comum está localizada no códon 531, Ser531Leu, TCG-TTG³⁹, sendo a ribosilação um dos mecanismos utilizados para inativar a RIF e conferir resistência ao *M. tuberculosis*⁹.

TABELA 1

Análise comparativa das mutações mais freqüentes no gene *rpoB* que confere resistência ao *M. tuberculosis* à rifampicina

Origem das amostras	Número de cepas analisadas	% Freqüência dos principais códons envolvidos		
		516	526	531
América do Norte ²⁵	121	5	43	31
América do Norte ⁸	51	6	43	33
Austrália ⁴⁹	33	10	32	52
Brasil ⁴⁷	82	9	23	55
China ²³	193	8	17	45
Espanha ¹⁴	50	14	22	48
Estudo Mundial ⁴⁶	65	9	28	52
Estudo Mundial ⁴²	193	8	21	45
Grécia ³¹	17	12	18	53
Hungria ⁵	29	38	7	31
Índia 1 ¹⁷	12	0	33	42
Índia 2 ²⁸	44	4	19	53
Itália ³⁸	37	8	35	59
Japão ³⁷	20	10	35	35
Oriente Médio ¹	29	7	48	35
Países Asiáticos 1 ³⁹	66	17	8	52
Países Asiáticos 2 ²²	90	14	17	53
Peru ¹³	19	5	26	98
Rússia 1 ³⁰	22	18	23	50
Rússia 2 ³²	130	5	15	66

516	
Leu Ser Gln Phe Met Asp Glu Asn Asn Pro Leu Ser Gly Leu Thr	
511-CTG-AGC-CAA-TTC-ATG-GAC-CAG-AAC-AAC-CCG-CTG-TCG-GGG-TTG-ACC-	
	Tyr
	TAC
	Val
	GTC
526	531
His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu	
CAC-AAG-CGC-CGA-CTG-TCG-GCG-CTG-533	
Asp	Leu
GAC	TTG
Tyr	
TAC	
Leu	
CTC	
Arg	
CGC	

FIGURA 1: As substituições de nucleotídeos e aminoácidos mais comuns no gene *rpoB* e na proteína RpoB (Adaptado de Telenti *et al*, 1993)

BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DO *M. tuberculosis* A ISONIAZIDA

Isoniazida (INH) é a hidrazida do ácido nicotínico, a qual foi sintetizada em 1912 por cientistas Tchecos, mas sua atividade antituberculostática só foi evidenciada em 1951. A INH precisa ser transformada dentro da célula em ácido nicotínico, pelo sistema catalase-peroxidase, para que possa apresentar atividade contra o bacilo da tuberculose. Esta droga possui atividade contra as espécies do complexo *M. tuberculosis*, no entanto, mostra pouca atividade contra micobactérias não tuberculosas²⁹.

A INH é o agente sintético mais poderoso contra o complexo *M. tuberculosis*. A concentração inibitória mínima da INH é muito baixo e pode variar de 0,02 a 0,05 µg/mL. A sua elevada potência pode ser justificada pela droga possuir vários alvos dentro da célula micobacteriana. Longas cadeias insaturadas de ácidos graxos, os quais contribuem para a impermeabilidade do envelope celular, estão presentes essencialmente nas micobactérias, sendo por isso escolhidos como alvo para drogas no combate à tuberculose. O efeito da INH resulta de uma reação peroxidativa que é catalisada pela enzima catalase-peroxidase codificada pelo gene *katG*. Esta enzima consiste de duas subunidades idênticas de 80 kDa e protege o *M. tuberculosis* da lesão nociva causada pelo peróxido de hidrogênio gerado durante o metabolismo oxidativo. A enzima também funciona como acceptor de elétrons de outras moléculas orgânicas^{36,40}.

A atividade da peroxidase parece ser necessária para ativar a isoniazida em uma substância tóxica para bactéria, mas a natureza da atividade deste novo agente formado ainda permanece parcialmente desconhecida. Estudos recentes com isoniazida e o sistema catalase-peroxidase purificada de *M. tuberculosis* resultou na produção de ácido iso-nicotínico, piridina 4-carboxialdeído, e vários radicais acila, perácidos e aldeídos capazes de reagirem com grupos nucleofílicos presentes em proteínas²⁴. A atividade da *katG* parece ser uma chave na ativação da isoniazida com a formação de vários compostos tóxicos, afetando diferentes alvos intracelulares, resultando em um efeito pleiotrófico²¹.

Um dos derivados da INH é o ácido nicotínico, que funciona como um antimetabólito análogo da nicotinamida adenina de nucleotídeo (NAD), que interfere em uma série de reações bioquímicas importantes no metabolismo do *M. tuberculosis*. Os radicais livres e os radicais alquil podem contribuir para a toxicidade da INH²⁴.

O mecanismo de ação da INH tem sido alvo de muitas pesquisas, e talvez esteja relacionado a inibição de síntese de proteínas e ácidos nucleicos, sendo o mecanismo mais provável talvez seja a inibição da síntese de ácidos micólicos

(principal ácido graxo presente na parede celular de micobactérias). Uma outra hipótese é que a isoniazida possui uma estrutura muito parecida com a nicotinamida, que é um importante cofator de muitas enzimas da célula bacteriana e, deste modo, interromperia a síntese de importantes compostos dentro da célula²⁰.

Logo após a introdução da INH como tratamento monoterápico da tuberculose foram isoladas cepas resistentes de pacientes e foi observado que cepas altamente resistentes tinham menor atividade da enzima catalase. Em 1992, a relação entre resistência a INH e baixa atividade desta enzima foi explicado, com a identificação do gene *katG*, o qual codifica a enzima catalase do *M. tuberculosis*, que é indispensável para a susceptibilidade a esta droga²¹.

A resistência a INH pode ser predita como resultado de mutações que diminuam o nível de expressão do gene e reduz a atividade da peroxidase ou a peroxidação do produto⁶. Em algumas cepas altamente resistentes à isoniazida, há a deleção do gene *katG* do cromossomo, todavia, a maioria das cepas mostra uma mutação pontual no gene que altera a atividade da proteína *katG*. A mutação pode estar localizada na região N-terminal ou C-terminal da proteína. A enzima catalase, para tornar-se ativada, necessita ligar-se a um cofator metálico, que geralmente é o zinco ou ferro. Portanto, mutações que alterem a região N-terminal contribuem para que a ligação estabelecida seja ineficaz e com isso a atividade da enzima fica prejudicada, alterando a sensibilidade à isoniazida. A mais freqüente substituição encontrada foi no códon 463 (Arg463Leu)³⁶, as mais freqüentes substituições são encontrados nos códons 315 (Ser-Thr)^{10,45} e 463 (Arg-Leu)³⁶, no entanto, diferentes mutações também são relatadas em outras áreas geográficas²⁹.

Cerca de 20% das cepas resistentes a INH não mostram alteração no gene *katG* e, portanto, outros mecanismos devem ser estudados para avaliar a resistência destas cepas. Os genes *ahpC* (alkyl hidroperóxido redutase) e *kasA* (β -ketoacyl ACP synthase) também estão relacionados a resistência a esta droga⁴⁵.

Uma relação entre resistência à INH, síntese de ácidos micólicos e concentração de NAD foi descrita em 1994 com a identificação de um dos alvos da isoniazida, a proteína *InhA*, codificada pelo gene *inhA*. A *InhA* é uma proteína transportadora de grupos enoil-acil-redutase (ACP) que é importante na síntese dos ácidos micólicos. Os derivados tóxicos da isoniazida interferem com a atividade da ACP e com a síntese de ácidos micólicos. Uma expressão exagerada do gene *inhA*, assim como uma mutação em regiões promotoras no gene *inhA*, gera cepas com resistência à isoniazida e à etionamida, visto que estas apresentam estruturas químicas semelhantes. Além de mutações nas regiões promotoras do gene *inhA*, alguns isolados clínicos tiveram mutações identificadas na estrutura do gene resultando em um aumento da constante de dissociação do complexo *InhA*-NADH, desta forma, resultando em uma diminuição parcial da síntese de ácido micólico^{19,20}.

Existem muitos pontos inexplicados em relação a ação da INH no *M. tuberculosis* e existem ainda cepas resistentes nas quais nenhum desses genes citados acima estão envolvidos. No entanto, cerca de 80% da resistência a isoniazida encontrada em isolados clínicos são atribuídos ao gene *katG*²⁰.

BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DO *M. tuberculosis* A PIRAZINAMIDA

A atividade antituberculosa da pirazinamida (PZA) foi descoberta em 1952 e atualmente é a terceira droga mais im-

portante no combate à tuberculose. O efeito da PZA se dá usualmente contra uma população bacilar que habita locais de pH baixo, possivelmente em sítios granulomatosos inflamados e dentro dos fagossomos dos macrófagos infectados. A PZA somente é ativa em meio ácido e precisa ser transformada em ácido pirazanoico (POA) pela enzima pirazinamidase (Pzase). O POA tem a habilidade de acidificar o ambiente onde o bacilo vive levando a lise do *M. tuberculosis*⁴. A PZA é um análogo estrutural da nicotinamida e tem sido usado no esquema primário de tratamento da tuberculose, juntamente com INH e RIF. A adição desse fármaco no esquema de tratamento combinado com rifampicina e isoniazida fez com que este fosse reduzido de nove para seis meses⁴³. A diminuição da atividade da Pzase, codificada pelo gene *pncA*, está relacionada com resistência a PZA. No *M. bovis* que é naturalmente resistente a PZA, existe mutação no códon C169G do gene *pncA*, que torna o *M. bovis* naturalmente resistente a esta droga. De modo similar, a mutação no gene *pncA* é o mais importante mecanismo de resistência do *M. tuberculosis* à PZA. A natureza das mutações no *pncA* incluem substituições de aminoácidos, inserções ou pequenas deleções de nucleotídeos, como também, mutações no promotor do gene⁴⁴.

A ausência de atividade de Pzase no *M. tuberculosis* com resistência à PZA tem sido demonstrada em mais de 70% dos isolados de *M. tuberculosis* PZA resistentes que apresentam mutações no gene *pncA*⁴³. Em adição, são encontradas mutações no gene *pncA* em 72 a 97% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes à PZA^{16,31}. Todavia, não existe ainda um mapeamento das diferentes mutações que ocorrem no gene *pncA* de cepas de *M. tuberculosis* em vários locais do mundo⁴.

Após a administração de uma dose de 1500 mg de PZA pode-se atingir elevadas concentrações da droga em fluidos humanos (431 +/- 220 μ g/mL), o que poderia acarretar em uma exposição do *M. tuberculosis* a variadas concentrações durante a infecção, facilitando a seleção de cepas resistentes⁴.

A PZA é bactericida para micobactérias latentes, reduz o tempo total de tratamento, matando os bacilos que permanecem em pH baixo e que normalmente não são afetadas por outras drogas antituberculosas. O teste de sensibilidade in vitro para a PZA é difícil de ser realizado, sendo os resultados não reprodutíveis e, além de que, nem todos os laboratórios realizam a técnica rotineiramente, portanto, se faz necessário desenvolver novas técnicas que possibilitem detectar a resistência desta droga.

As substituições nos aminoácidos ocorre preferencialmente na região 3 a 17, 61 a 76 e 132 a 142. Essas regiões representam cerca de 22% da proteína *PncA*. O alinhamento das seqüências de aminoácidos de várias espécies de microrganismos revela que estas três regiões contêm resíduos altamente conservados, o que confirma a idéia de que essas regiões podem ser estruturalmente e ou cataliticamente importantes para a atividade da enzima PZA. Uma das hipóteses para a baixa atividade observada em alguns mutantes deve-se à conformação inadequada da proteína ou à instabilidade da proteína Pzase²⁷.

BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DO *M. tuberculosis* AO ETAMBUTOL

O etambutol (EMB) foi primeiro proposto no início dos anos 60 e é amplamente utilizado no esquema primário de tratamento da tuberculose. O EMB interfere com a incorporação de ácidos micólicos da parede do *M. tuberculosis*^{18,37}. Esta droga inibe a transferência do arabinogalactano den-

tro da parede celular um processo que leva ao acúmulo de ácido micólicos e seus cognatos que são estéres de trealose. A identificação de β -D-arabinofuranosil-1-monophosfodecaprenol como o maior intermediário na biossíntese do arabinogalactano, e a rápida acumulação desses intermediários após a administração da droga, sugere que o EMB tenha como alvo a arabinosil transferase. Somente o isômero dextro da droga tem atividade biológica, portanto, outros análogos do EMB não apresentam boa atividade contra o bacilo¹⁸, o que consolida a idéia de que o EMB seja um análogo da arabinose⁴⁰. Também é documentado o sinergismo entre EMB e outras drogas, e presume-se que ocorra devido ao EMB favorecer o acesso de outra drogas ao interior das micobactérias¹¹.

Os efeitos do EMB são extremamente pleitróficos e foi proposto como alvo da ação do EMB a enzima arabinosil transferase. Existem três classes de arabinosil transferase: classe I, II e III. As classes I e II apresentam baixa afinidade com o EMB enquanto a classe III apresenta alta afinidade³³. O operon *emb* codifica vários homólogos da arabinosil transferase: *EmbA*, *EmbB* e *EmbC*. Mutações na *EmbB* pode ser identificada em 47 a 69% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes ao etambutol e estão associadas a altos níveis de resistência (MIC ≥ 20 μ g/mL), enquanto que na ausência de mutação o MIC permanece abaixo de 10 μ g/mL. O EMB se liga ao centro ativo da enzima e portanto, a produção excessiva da enzima *EmbB* resulta em resistência à droga^{3,40}. Foram encontradas mutações em múltiplos códons que resultaram em dois, três ou quatro aminoácidos diferentes na proteína *EmbB*, sendo esta proteína provavelmente de localização transmembrana, que tem atividade importante na síntese de ácidos micólicos do *M. tuberculosis*^{40,43}.

Na maioria dos casos, a resistência ao EMB também está associada com resistência a outras drogas antituberculosas. O locus *embB* está associado com o alvo da resistência ao EMB e substituições no códon 306 do gene *embB* no *M. tuberculosis* mostraram ser mais frequentes e mais preditivos para resistência ao EMB⁴⁴.

RESISTÊNCIA A OUTRAS DROGAS

No *M. tuberculosis* ocorre resistência cruzada entre amicacina e canamicina, mas não entre amicacina e estreptomicina. Estreptomicina constitui a droga mais antiga no combate à tuberculose, tendo sido estabelecida no tratamento em 1940. Os altos níveis de resistência estão associados com alterações no alvo ribossomal resultado de mutações no gene *rpsL*, que produz uma mutação Lis-43-Arg na proteína ribossomal S12 ou mutação na região 530 ou 915 do gene *rrs* da unidade 16S do rRNA. Em cepas de *M. tuberculosis* foi identificada uma mutação no gene *rrs* que determina resistência à canamicina. A frequência de mutações associadas à resistência estreptomicina é da ordem de 10^{-6} e à canamicina é da ordem de 10^{-8} . Essa diferença de magnitude sugere que a resistência à cada classe de aminoglicosídeo, resulta de uma simples mutação. A estreptomicina pertence à classe estreptidina e à canamicina pertence à deoxiestreptamina. O *M. tuberculosis* possui uma única cópia do gene *rrs* e, portanto, qualquer mutação pontual resulta em resistência a ambos amicacina e canamicina².

MULTIDROGA RESISTÊNCIA

Enzimas citocromo P450 geralmente são encontradas em células de mamíferos e raramente são encontradas em bactérias, o *M. tuberculosis* possui cerca de 20 dessas enzimas.

Essas enzimas poderiam ser usadas pelo bacilo da tuberculose na metabolização rápida das drogas e conseqüente desenvolvimento de multiresistência. Essas enzimas presentes no *M. tuberculosis* podem representar um alvo potencial para desenvolvimento de novas drogas^{7,35}.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência simultânea do *M. tuberculosis* à várias drogas é o resultado da acumulação de mutações independentes, alterando principalmente o alvo. A resistência à drogas por transposons e plasmídios não foram encontradas no complexo *M. tuberculosis*⁶.

O tempo necessário para o cultivo e o teste de sensibilidade tem sido avaliado entre 21 a 60 dias, dependendo do método usado. A aplicação de métodos moleculares para detecção de mutações genômicas indicativas da resistência à drogas tem sido capazes de encurtar o tempo de resposta ao paciente, contudo, essas técnicas não são empregadas de rotina pois requerem equipamento especializado e são de alto custo⁴².

REFERÊNCIAS

- Ahmad S, Mokaddas E, Fares E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44(3):245-52, 2002.
- Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A, Khetarpal M, Igno FR, Moghazeh SL, Manavathu EK, Lerner SA. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(5):1295-7, 1998.
- Alcaide F, Plyffer GE, Telenti A. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(10):2270-3, 1997.
- Bamaga M, Wright DJ, Zhang H. Selection of in vitro mutants of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents.* 20(4):275-81, 2002.
- Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, Szabo N, Puskas E, Kosztolanyi L, Farago E, Mester J, Parsons LM, Salfinger M. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol.* 39(10):3736-9, 2001.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekala F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393(6685):537-44, 1998.
- Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis*: drug-resistance mechanisms. *Trends Microbiol.* 2(10):411-5, 1994.
- Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol.* 35(5):1281-3, 1997.
- Dabbs ER, Yazawa K, Mikami Y, Miyaji M, Morisaki N, Iwasaki S, Furihata K. Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(4):1007-9, 1995.
- Dahle UR, Sandven P, Haldal E, Mannsaaker T, Caugant DA. Deciphering an outbreak of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 41(1):67-72, 2003.
- Deng L, Mikusova K, Robuck KG, Scherman M, Brennan PJ, McNeil MR. Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(3):694-701, 1995.
- Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis.* 185(8):1197-202, 2002.

13. Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, Soini H, Pan X, Valiente-Castillo O, Musser JM. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis.* 79(2):111-8, 1998.
14. Garcia L, Alonso-Sanz M, Rebollo MJ, Tercero JC, Chaves F. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 39(5):1813-8, 2001.
15. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(2):267-74, 2002.
16. Hannan MM, Desmond EP, Morlock GP, Mazurek GH, Crawford JT. Pyrazinamide-mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in the United States. *J Clin Microbiol.* 39(2):647-50, 2001.
17. Harris KA Jr, Mukundan U, Musser JM, Kreiswirth BN, Lalitha MK. Genetic diversity and evidence for acquired antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* at a large hospital in South India. *Int J Infect Dis.* 4(3):140-7, 2000.
18. Hausler H, Kawakami RP, Mlaker E, Severn WB, Stutz AE. Ethambutol analogues as potential antimycobacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 11(13):1679-81, 2001.
19. Heym B, Alzari PM, Honore N, Cole ST. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 15(2):235-45, 1995.
20. Heym B, Saint-Joanis B, Cole ST. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 79(4):267-71, 1999.
21. Heym B, Zhang Y, Poulet S, Young D, Cole ST. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 175(13):4255-9, 1993.
22. Hirano K, Abe C, Takahashi M. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol.* 37(8):2663-6, 1999.
23. Huang H, Jin Q, Ma Y, Chen X, Zhuang Y. Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in China. *Tuberculosis.* 82(2-3):79-83, 2002.
24. Johnsson, K, Schultz, PG. Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Am Chem Soc.* 116: 7425-7426, 1994.
25. Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, Musser JM. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol.* 32(4):1095-8, 1994.
26. Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis.* 80(1):47-56, 2000.
27. Lemaître N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *PncA*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7):1761-3, 1999.
28. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J Clin Microbiol.* 39(8):2987-90, 2001.
29. Marttila HJ, Marjamäki M, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasil'yef AV, Viljanen MK. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7):1764-6, 1999.
30. Marttila HJ, Soini H, Huovinen P, Viljanen MK. *katG* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(9):2187-9, 1996.
31. Matsiota-Bernard P, Vroni G, Marinis E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol.* 36(1):20-3, 1998.
32. Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, Sobolev A, Strizhkov B, Chernyh N, Skotnikova O, Irtuganova O, Moroz A, Litvinov V, Vladimirovskii M, Perelman M, Chernousova L, Erokhin V, Zasedatelev A, Mirzabekov A. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol.* 39(7):2531-40, 2001.
33. Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(11):2484-9, 1995.
34. Mitchinson, DA, Nunn, AJ. Influence of initial drug resistance of the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 133:423-430, 1988.
35. Munro AW, Lindsay JG. Bacterial cytochromes P-450. *Mol Microbiol.* 20(6):1115-25, 1996.
36. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev.* 8(4):496-514, 1995.
37. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(4):1053-6, 1996.
38. Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orru G, Thoresen OF, Ricci ML, Oggioni MR, Fattorini L, Orefici G. *rpoB* mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol.* 37(4):1197-9, 1999.
39. Qian L, Abe C, Lin TP, Yu MC, Cho SN, Wang S, Douglas JT. *rpoB* genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian countries. *J Clin Microbiol.* 40(3):1091-4, 2002.
40. Ramaswamy S, Musser JM. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis.* 79(2):111-8, 1998.
41. Rinder H, Mieskes KT, Tortoli E, Richter E, Casal M, Vaquero M, Cambau E, Feldmann K, Loscher T. Detection of *embB* codon 306 mutations in ethambutol resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples: a low-cost, rapid approach. *Mol Cell Probes.* 15(1):37-42, 2001.
42. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(10):2093-8, 1997.
43. Rossetti ML, Valim AR, Silva MS, Rodrigues VS. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev Saude Publica.* 36(4):525-32, 2002.
44. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(3):540-3, 1997.
45. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti ML. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 41(9):4471-4, 2003.
46. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 341(8846):647-50, 1993.
47. Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 38(8):3119-22, 2000.
48. WHO. World Health Organization. Report 2002: Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing. Geneva, Switzerland. 2002.
49. Yuen LK, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol.* 37(12):3844-50, 1999.

Endereço para Correspondência:

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota. Rua Monsenhor Furtado SN. Rodolfo Teófilo. CEP. 60.441.750. Fortaleza - Ceará. Tel: +55 0xx 85 288.8303. Fax: +55 0xx 85 214.2853. e-mail: ccfrota@fortalnet.com.br.

Incidência de Hipotireoidismo Auto-Imune em Pacientes Atendidos na Cidade de Três de Maio, RS

Incidence of hypothyroidism autoimmune in patients checked in Três de Maio City, RS

Tathiane Hofstetter¹ & Leticia Beatriz Matter²

RESUMO - A TH (TH) é uma doença auto-imune considerada como causa habitual do hipotireoidismo primário. No presente estudo avaliou-se, retrospectivamente, o perfil clínico dos pacientes da Clínica São Vicente de Paula, Três de Maio, RS, atendidos no período de março a dezembro de 2003. Foram analisados 60 casos com hipotireoidismo diagnosticado, entre 2 a 96 anos de idade, sendo 54 do sexo feminino e 6 do sexo masculino. Destes, 22 casos (36,7%) apresentaram anticorpos antitireoidianos, sendo 18 do sexo feminino e 4 do sexo masculino, numa proporção, aproximada, de 5:1, localizados na área rural (36,36%) e na área urbana (63,64%). A ocorrência de TH congênita foi positiva para 5 casos (22,72%). O bócio foi verificado em 2 casos, enquanto a hipersensibilidade a medicamentos esteve presente em 2 casos, também, entre os sintomas característicos da doença, foram relatados o retardo mental e a alopecia, em homem e mulher, respectivamente. O estudo demonstrou, também, a existência de 7 pacientes que tiveram algum tipo de exposição aos agentes tóxicos. Considerando os achados descritos no presente estudo, conclui-se que a incidência de casos com anticorpos antitireoidianos é significativa e que a história familiar de TH, e outros fenômenos relacionados a ativação do sistema imune, podem sugerir, respectivamente, um caráter genético à origem do problema e à propensão ao desenvolvimento da disfunção. Entretanto, a co-participação de fatores ambientais não pode ser excluída, merecendo estudos regionais, que levem em consideração as características culturais e sociais destas localidades.

PALAVRAS-CHAVE - TH, Hipotireoidismo, anticorpos antitireoidianos.

SUMMARY - The Hashimoto's thyroiditis (HT) is a autoimmune disease considered the main etiology of primary hypothyroidism. The present study evaluated retrospectively, in the period of March to December of 2003, the clinical profile of the patients at São Vicente de Paula Clinic, in Três de Maio, RS. Sixty patients with hypo-thyroidism were analyzed, 2 to 96 years old, being 54 female and 6 male. Of these, 22 cases (36,7%) presented thyroid antibodies, being 18 female and 4 male, in a proportion of 5:1, located in the agricultural area (36,36%) and in the urban area (63,64%). The occurrence of congenital Hashimoto's thyroiditis was positive for 5 cases (22,72%). The goiter was verified in 2 cases, while the hypersensitivity to medicines was present in 2 cases. Among the disorder symptoms, the mental retard and the baldness were observed, in man and woman, respectively. The study also demonstrated 7 patients with some historical exposition to toxic agents. Considering the study results one can conclude that the prevalence of cases with thyroid antibodies in thyroid disorders is significant and the family history and other phenomenon related with the immune system activation, can suggest, respectively, a genetic character linked to the disease etiology and the propensity to develop the dysfunction. However, the contribution of environmental factors cannot be excluded, suggesting regional studies, that take into account the cultural and social characteristics of these places.

KEYWORDS - Hashimoto's thyroiditis, hypothyroidism, thyroid antibodies.

INTRODUÇÃO

A glândula tireóide secreta dois hormônios, a tiroxina (T_4) e, em menores quantidades, a triiodotironina (T_3), os quais exercem profundo efeito sobre o metabolismo corporal^(1, 13). Esta é composta de grande número de folículos que contêm colóide, cujo principal componente é a tireoglobulina, que contém hormônios tireóideos como parte de sua molécula. Logo, a tireoglobulina é o sítio de armazenamento dos hormônios tireóideos^(13, 26).

O iodeto alimentar é essencial à síntese de hormônios tireóideos. É ativamente captado pelas células da tireóide e oxidado enzimaticamente pela peroxidase tireóidea, a qual, também, medeia a iodação de resíduos da tireoglobulina que resulta na formação da monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). A união de MIT ou DIT formará T_3 ou T_4 , que serão liberados. A secreção de T_3 e T_4 ocorre após digestão proteolítica da tireoglobulina^(1, 15). Para que seja formada a quantidade normal de tiroxina e triiodotironina, devem ser ingeridos cerca de 50 mg de iodo a cada ano, ou

seja, aproximadamente 1 mg por semana. Para se evitar a deficiência de iodo, o sal comum é iodetado com uma parte de iodeto de sódio para cada 100.000 partes de cloreto de sódio⁽¹³⁾.

A síntese de hormônio tireóideo é controlada pela secreção de hormônio hipotalâmico de liberação de tireotrofina (TRH) e do hormônio hipofisário de estimulação da tireóide (TSH) no processo de retroalimentação negativa. Baixos níveis de T_3 e T_4 estimulam a liberação de TRH e de TSH. O TSH estimula a tireóide a sintetizar T_3 e T_4 , quando níveis sobem o suficiente, a liberação de T_3 e T_4 é suprimida. Em indivíduos com supressão da síntese de T_3 e T_4 , TSH e TRH estão aumentados⁽²⁶⁾. Com o tempo, a capacidade da tireóide em responder ao TSH diminui e o paciente apresenta indícios progressivos do hipotireoidismo^(2, 20).

Os hormônios tireóideos exercem efeitos metabólicos em diversos tecidos corporais. Tais efeitos são exacerbados no hipertireoidismo e deficientes no hipotireoidismo^(1, 15). As disfunções tireoidianas caracterizam-se por alterações no funcionamento da tireóide e, como consequência, na produção

Recebido em 07/10/2004

Aprovado em 28/01/2005

¹Acadêmica do Curso de Farmácia Bioquímica Clínica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santo Ângelo, RS.

²Professora de Imunologia e Microbiologia do Curso de Farmácia Bioquímica Clínica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Av. Universidade das Missões 464, Cx. P. 203, Santo Ângelo, RS - CEP: 98802-470 E-mail:lmatter@urisan.tche.br. Responsável pela publicação.

de seus hormônios triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄). Por sua vez, a alteração na produção destes hormônios reflete no funcionamento de vários outros sistemas do organismo nos quais os hormônios apresentam efeitos.

Segundo PONTES *et al* (2002), normalmente a prevalência de disfunções tireoideanas é de 2 a 4% nos indivíduos com mais de 65 anos de idade e de 0,5 a 1% na população em geral. Vários fatores estão envolvidos na origem destas disfunções, entre os quais estão os mecanismos auto-imunes. A TH, também chamada tireoidite auto-imune, tireoidite linfocítica crônica, inflamação da tireóide, tireóide preguiçosa, é a forma mais comum de tireoidite^(28, 29). É um distúrbio no qual o próprio organismo produz anticorpos contra a glândula tireóide, o que leva a um processo inflamatório crônico e conseqüente destruição do tecido tireóideo, destacando-se como uma das mais importantes causas do Hipotireoidismo^(2, 5).

Neste tipo de disfunção fatores imunológicos são fornecidos por anticorpos anti-tireóideos circulantes, podendo estar associados com outras doenças auto-imunes^(5, 24). Estes anticorpos geralmente são auto-anticorpos anti-microsomal da célula folicular, anti-tireoglobulina, anti-peroxidase da tireóide e anti-antígeno de superfície da célula folicular^(1, 5, 16, 28). Desta forma, podem ser medidos no soro sanguíneo auto-anticorpos contra diversos componentes antigênicos na glândula tireóide, incluindo a tireoglobulina (TgAb), peroxidase tireóidea (TPOAb/anticorpos anticromossômicos) e o receptor de TSH. Um teste fortemente positivo para TAb ou TPOAb indica uma doença tireóidea auto-imune^(1, 16).

As manifestações de auto-imunidade na doença de Hashimoto refletem um defeito na vigilância imunológica, considerando como sendo uma deficiência geneticamente determinada de células supressoras T que permitem a persistência de um clone de células T dirigido contra antígenos da tireóide⁽²⁰⁾. Logo, tireoidite auto-imune é caracterizada pela resposta humoral e celular a antígenos tireóideos-específicos, levando a um processo inflamatório e causando a destruição do tecido tireóideo^(11, 12). Nos pacientes com hipotireoidismo auto-imune, além dos níveis baixos de T₃ e T₄ e dos níveis elevados de TSH, são clinicamente importantes para o diagnóstico a presença de auto anticorpos dirigidos contra a tireoglobulina e peroxidase tireóidea^(1, 16).

Desde a publicação de ROIT *et al* relatando a presença de anticorpos circulantes contra antígenos tireoidianos em pacientes com doenças auto-imunes da tireóide, muita atenção tem sido dada ao tema, em função de sua potencial importância diagnóstica. Tal observação adquire valor na medida em que auto-anticorpos contra antígenos tireoidianos podem ser encontrados em cerca de 2% da população feminina caucasiana, e sua detecção pode ser útil como marcador da presença de doença auto-imune tireoidiana, colaborando com o diagnóstico médico⁽¹⁷⁾.

Este tipo de disfunção leva ao surgimento de sintomas como a fadiga, movimentos lentos, intolerância ao frio, constipação, diminuição da memória e concentração mental e, algumas vezes, ganho de peso, o que diminui a qualidade de vida destes pacientes. No entanto, um dos maiores agravantes da TH é a destruição da tireóide e total perda da produção de hormônios, tornando-se, o paciente, dependente de fontes hormonais externas^(24, 26).

Sabe-se, que 10% da população normal apresenta anticorpos antitireoidianos, e estes indivíduos têm sido considerados portadores de uma tireoidite auto-imune assintomática⁽²⁵⁾.

A ausência completa da secreção tireóidea geralmente faz com que o metabolismo basal fique cerca de 40 a 50%

abaixo do normal, ao passo que excessos extremos de secreção tireóidea podem fazer com que o metabolismo basal fique de 60 a 100% acima do normal⁽²⁶⁾.

Quando manifestado durante o desenvolvimento e a infância, ele resulta em cretinismo, com seus retardos físico e mental, associados. Quando o hipotireoidismo surge pela primeira vez em crianças com mais idade ou em adultos, ele é denominado mixedema (acúmulo de mucopolissacarídeos hidrofílicos no tecido conjuntivo de todo corpo)⁽²⁶⁾.

O Hipotireoidismo é conhecido como causa de retardo de crescimento, hiperprolactemia e puberdade precoce, na maioria dos casos incompleta com alterações típicas de estimulação estrogênica, como desenvolvimento das mamas, alteração na secreção vaginal, e ausência de adrenarca que é revertida com o tratamento tireoidiano⁽²⁵⁾.

São escassos os estudos populacionais sobre este tipo de patologia na Região Sul, em especial, no interior do Rio Grande do Sul. Desta forma, pretende-se determinar a prevalência do hipotireoidismo por anticorpos anti-tireoidianos através de uma revisão retrospectiva dos pacientes atendidos em Três de Maio, buscando delinear o perfil clínico, associado aos anticorpos antitireoidianos destes pacientes com hipotireoidismo, bem como, investigar as possíveis causas da tireoidite auto-imune.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados, em estudo retrospectivo de março à dezembro de 2003, os pacientes portadores de hipotireoidismo, em seguimento, a partir do arquivo da Clínica São Vicente de Paula, Três de Maio, RS.

Foi delineado o perfil clínico dos pacientes através da análise dos níveis de TSH, T₄ total, T₄ livre e anticorpos antitireoperoxidase (ATPO) séricos, com levantamento dos sinais e sintomas e verificação do local de residência, se urbano ou rural.

Os critérios de diagnóstico da TH foram baseados na presença de anticorpos ATPO e, T₄ e TSH alterados. Considerando-se como hipotireoidianos auto-imunes àqueles que apresentaram o anti-TPO positivo, sendo títulos maiores que 1000. Os hipotireoidianos congênitos foram considerados os pacientes com história familiar.

RESULTADOS

No presente estudo foram analisados 60 casos clínicos de pacientes com hipotireoidismo provenientes de Três de Maio e localidade vizinhas. No que diz respeito aos pacientes residentes na cidade de Três de Maio, verificaram-se 22 casos com hipotireoidismo, ou seja, 0,09% em relação à população geral do município. Este resultado, quando comparado aos dados da literatura, pode ser considerado baixo, já que a média estimada é de aproximadamente 1% na população⁽²¹⁾. Esta constatação pode ser explicada pelo fato da Clínica atender apenas conveniados e particulares, o que pode não representar o percentual real.

Do total de casos, 54 (63,3%) são do sexo feminino e 6 (36,7%) do sexo masculino, conforme Figura 1, numa proporção de 9:1 para o sexo feminino.

Uma das causas habituais de hipotireoidismo primário é a auto-imunidade, denominada TH⁽⁸⁾. Entre os 60 pacientes, 22 apresentaram anticorpos anti-tireoperoxidase positivo (ATPO), ou seja, títulos acima de 1000, o que representa, aproximadamente 36,7% dos casos (Figura 2).

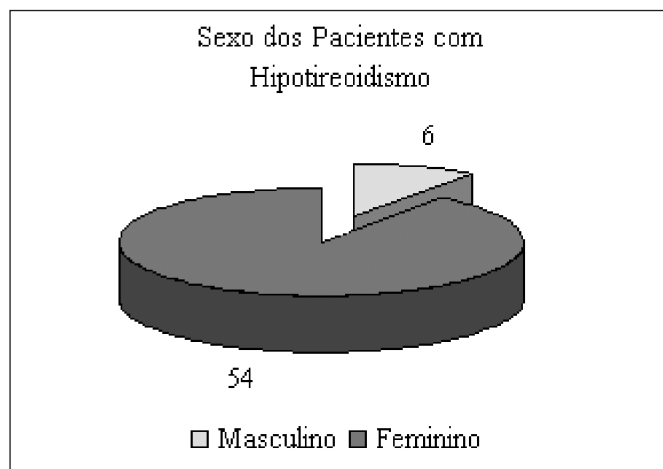


Figura 1

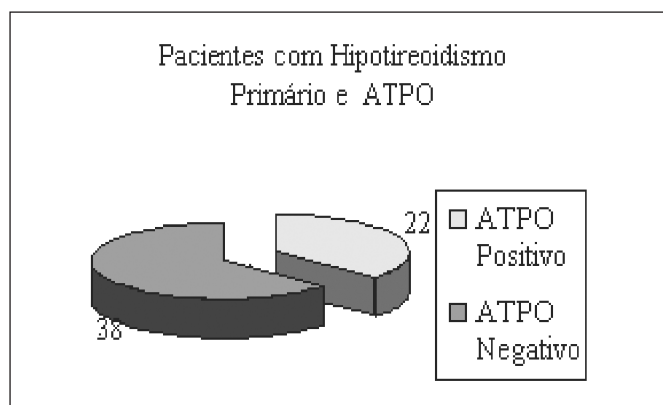


Figura 2

Com TH foram constatados 18 pacientes (81,81%) do sexo feminino e 4 (18,19%) do sexo masculino, numa proporção aproximada de 5:1, notando um predomínio do gênero feminino (ver Figura 3). Tais resultados concordam com as demais pesquisas realizadas no assunto^(7, 20, 26). Neste estudo, a faixa etária dos pacientes com hipotireoidismo primário varia entre 2 a 96 anos, abrangendo assim, 4 faixas etárias: infantil, adolescente, adulto e idoso. Segue-se o mesmo para os pacientes com hipotireoidismo auto-imune, onde há 1 paciente infantil, 5 adolescentes, 13 adultos e 3 idosos, o que corresponde, respectivamente, 4,54%, 22,72%, 59,1% e, 13,64% (Figura 4).

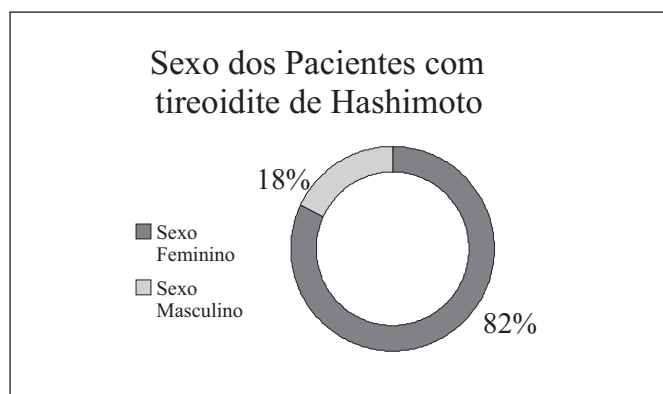


Figura 3

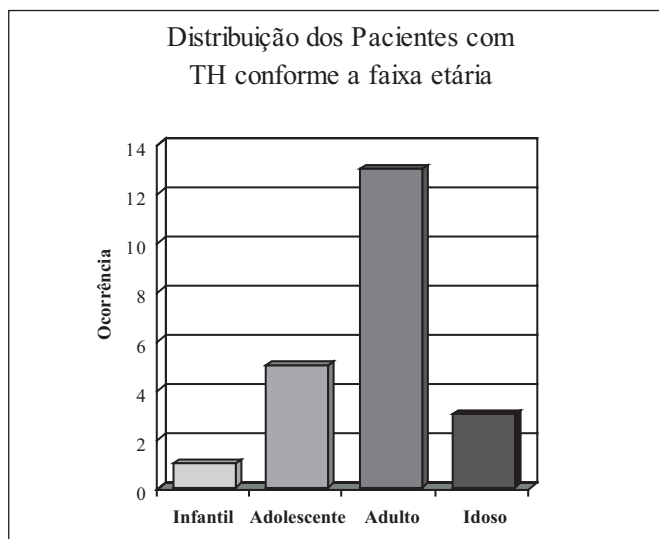


Figura 4

Observação: Idades consideradas em cada faixa etária: infantil (0 – 9 anos), adolescente (10 – 19 anos), adulto (20 – 59 anos) e idoso (60 anos acima).

Tabela 1
Distribuição dos pacientes com ATPO conforme a idade.

Idade	Sexo Feminino	Sexo Masculino
0 – 9 anos	01	00
10 – 19 anos	04	01
20 – 29 anos	03	01
30 – 39 anos	02	00
40 – 49 anos	04	01
50 – 59 anos	02	00
60 – 69 anos	02	01
TOTAL	18	04

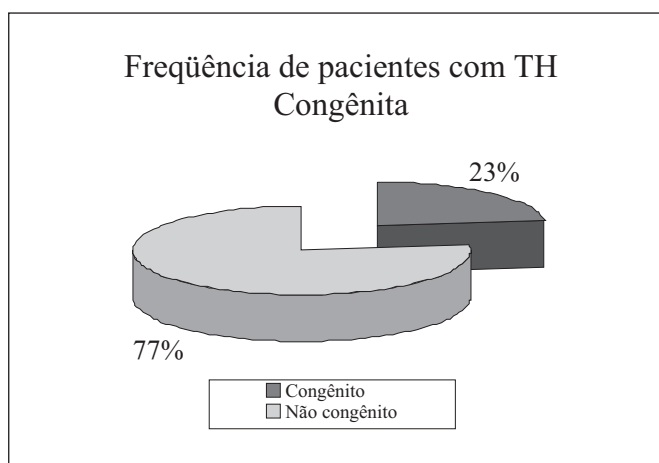


Figura 5

Tabela II
Relação dos pacientes e do tipo de agente tóxico. Otóxico

Caso	Sexo	Agente exposto
A	Masculino	Iodo radioativo
B	Masculino	Tintas e solventes
C	Feminino	Agrotóxico
D	Masculino	Agrotóxico
E	Feminino	Agrotóxico
F	Feminino	Tintas e solventes
G	Feminino	Agrotóxico

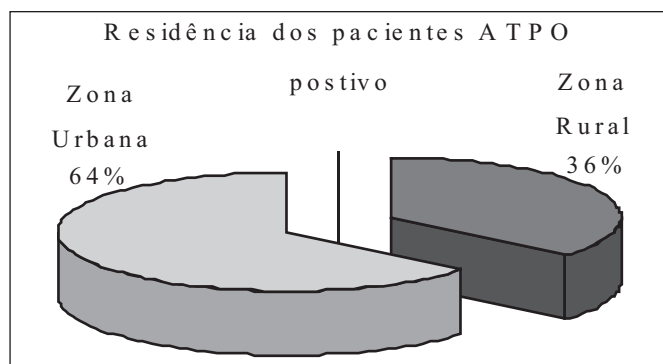


Figura 6

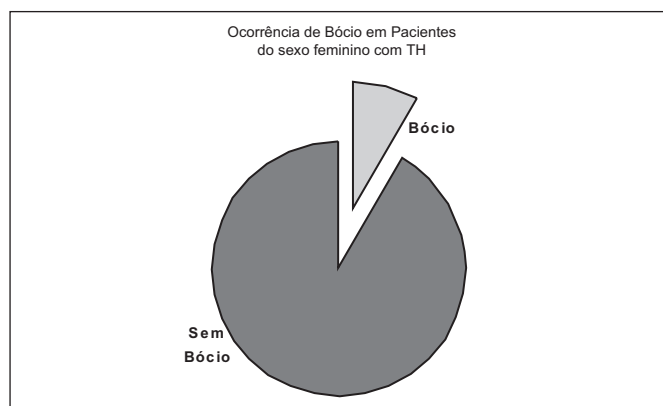


Figura 7

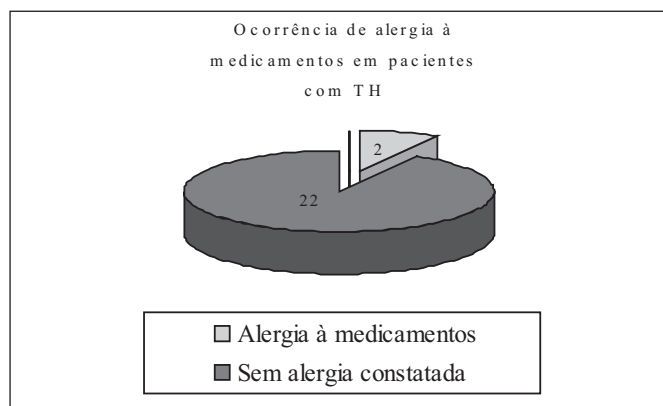


Figura 8

Tabela III
Sinais e Sintomas do Hipotireoidismo.

Sinais e Sintomas
CRIANÇAS
Incapacidade do aprendizado
Retardo Mental
Baixa estatura
Idade óssea atrasada
Puberdade Tardia
ADULTOS
Fadiga
Pele seca, áspera, fria
Intolerância ao frio
Cabelos crespos e finos
Fraqueza
Rouquidão
Letargia
Unhas esbranquiçadas
Ganho ponderal
Edema periorbitário, periférico
Constipação
Reflexos Retardados
Mialgias
Tempo de reação retardado
Artralgias
Cor alaranjada da pele
Irregularidades menstruais
Bradicardia
Queda de cabelos
Derrames pleurais, pericárdicos

Fonte: ANDREOLI (1997).

DISCUSSÃO

Estudos mostram que a prevalência de (TH) na população em geral está na ordem de 0,5 a 1,2% (2). Ela é a causa mais comum de hipotireoidismo nos Estados Unidos, onde a incidência é aproximadamente 3-5 casos por 1000 indivíduos/ano⁽⁷⁾. Apesar da literatura afirmar ser a tireoidite a principal causa de hipotireoidismo isto não foi evidenciado em nossos estudos, visto que 38 pacientes, ou seja, 63,3% apresentaram ATPO negativo. Este percentual de hipotireoidismo foi diagnosticado pela alteração dos hormônios T4 livre e TSH e não pela presença de ATPO (Figura 2). O predomínio da doença no sexo feminino (Figura 3) também foi constatado em outros trabalhos. Segundo ROOBINS (1996), a TH é uma doença predominantemente do sexo feminino, com uma proporção de 5:1. Já MAZZAFERRI (1988) cita como uma doença cerca de seis vezes mais comum em mulheres do que em homens. De acordo com a literatura, atualmente, é o distúrbio isolado da tireóide mais freqüentemente observado na infância e na adolescência e sua incidência aumenta com a idade (20, 26). Conforme ANTUNES E MATOS (1992), existe um pico de incidência da doença entre os 30 e 50 anos, o que confere com o estudo realizado (Figura 4 e Tabela 1).

Embora a TH exista sem restrição racial e étnica, ela ocorre mais comumente em famílias onde outro membro apresenta auto-imunidade à tireóide^(27,4). A demonstração de casos de TH em pacientes com grau de parentesco, segundo FERNANDES *et al* (2003), indica a existência de predisposição genética à doença. No entanto, nenhuma forma de herança genética ainda tem sido definida⁽²⁸⁾. Para MAZZAFERRI (1988), existe freqüentemente uma história familiar na doença de Hashimoto, podendo ocorrer anticorpos antitireoidianos circulantes em parentes sem doença tireoidiana declarada. Assim, uma pessoa com pelo menos um parente de primeiro ou segundo grau com TH deve ser submetido ao rastreamento da função tireoidiana e da presença de auto-anticorpos⁽²²⁾. De acordo com os estudos de LIMA *et al* (2002), a história familiar é positiva para a doença tireoidiana em 30-40% dos casos. No presente estudo, a história familiar foi positiva para 5 casos, ou seja, 22,72% (Figura 5), caracterizando-se como do tipo congênito.

A etiologia da TH parece envolver interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e endógenos⁽⁶⁾. Segundo LIMA *et al* (2002), o surgimento da TH pode estar associado a fatores ambientais ainda não muito esclarecidos mas implicados na patogênese das doenças da tireóide, tais como: agentes infecciosos, fatores dietéticos, poluentes e estresse. O estudo demonstrou que 31,81% dos pacientes tiveram algum tipo de contato ocupacional com agentes tóxicos, conforme mostra a Tabela 2. A prevalência de pacientes portadores de ATPO na zona rural perfaz um total de 8 pacientes, 36,36%, sendo desta forma maior na população urbana, com 14 pacientes, ou seja, 63,64% (Figura 6). Este valor é próximo ao encontrado por QUEIROZ *et al* (2002), que observou uma incidência de 38,6% na zona rural. Já PONTES *et al* (2002), estudando 210 pacientes com hipotireoidismo auto-imune verificou que 19,6% destes pertenciam à área rural.

A TH resulta da destruição da arquitetura tireóidea por infiltração linfocítica, resultando no hipotireoidismo⁽¹⁾. Existem tipicamente poucos sintomas, além do início gradativo do bócio indolor, que representam o aspecto clínico principal da doença, o qual inicialmente não é acompanhado por sintomas locais ou sistêmicos⁽²⁰⁾. Em geral, os pacientes experimentam um período variável mas prolongado de hipotireoidismo subclínico, e a doença progride com o passar do tempo⁽¹⁴⁾. No estudo realizado por BURMANN (2001), a maioria dos pacientes apresentou um aumento palpável da glândula, o qual possui uma consistência firme e pode regredir com o tempo. Em nosso estudo foram encontrados 2 casos de bócio e TH, exclusivamente em mulheres, com idade entre 10 a 29 anos, representando 11,11% dos pacientes do sexo feminino (Figura 7) e, 9,09% dos pacientes com tireoidite. Este resultado mostra um índice baixo entre o total de casos com TH, diferente do que a literatura tem demonstrado. Da mesma forma, pesquisas mostram que a ocorrência de bócio ocorre principalmente em mulheres adultas⁽²⁷⁾. De acordo com o trabalho de LIMA *et al* (2002), o bócio é predominantemente no sexo feminino e na faixa etária entre 30 e 60 anos.

Outras doenças auto-imunes tendem a ocorrer com uma freqüência maior do que a esperada em pacientes com TH^(20,26). Deve-se considerar cuidadosamente a possibilidade de que um paciente com TH tenha outras doenças auto-imunes associadas⁽¹⁾. Dentre os pacientes com a tireoidite, em nosso estudo, 2 apresentaram alergia à medicamentos, sulfas e vibramicina; ambos do sexo feminino, representan-

do 9,09% de modo geral e 11,11% das mulheres (Figura 8). A TH é caracterizada por uma redução generalizada na função metabólica o que freqüentemente se manifesta reduzindo a velocidade de atividade física e mental⁽¹⁹⁾. A apresentação clínica depende da idade dos pacientes, sexo e condição física, dependendo, também da idade de início e intensidade da deficiência tireoideana^(7,1). No presente estudo foi constatado um caso, do sexo masculino, com retardo mental, o qual apresentou hipotireoidismo congênito desde a infância. O retardo mental se deve ao fato da doença ter sido diagnosticada tardiamente. Devido aos efeitos de largo-espectro do hormônio da tireóide, o hipotireoidismo pode ter efeitos prejudiciais profundos em numerosos sistemas e órgãos^(7,10). Em crianças muito jovens, pode resultar em retardamento mental irreversível e crescimento físico reduzido e puberdade tardia^(19,1). Em relação aos sintomas típicos relacionados na Tabela 3, foi observado apenas uma paciente adolescente (4,54%) com alopecia, sendo os demais sintomas não mencionados. De acordo com BURMANN (2001), alguns pacientes apresentarão sintomas óbvios de hipotireoidismo e mudanças mínimas de níveis de hormônios tireóideos, já outros terão sintomas sutis apesar de notadamente a função da tireóide ser anormal.

Em geral, os pacientes apresentam ótimo prognóstico com terapia apropriada de reposição hormonal^(3,23,26). O hipotireoidismo e o bócio são indicações para terapia com levotiroxina, administrando-se doses adequadas deste fármaco para suprimir os níveis de TSH e diminuir o bócio⁽¹⁾. Conforme o estudo de BURMANN (2001), em aproximadamente 1-5% dos pacientes com tireoidite auto-imune a recuperação da função da tireóide acontece espontaneamente. Para BURMANN (2001), a substituição de hormônio da tireóide deveria ser iniciada cautelosamente, pois acredita-se que alguns pacientes possam ter um aumento abrupto dos níveis de hormônios tireóideos o que pode aumentar a demanda de oxigênio do miocárdio e resultar em um dano cardíaco. BRIX *et al* (2000) cita em seu trabalho que o tratamento com este fármaco em paciente com tireoidite auto-imune pode conduzir a uma redução significativa nas concentrações de anticorpos no soro. Nesta pesquisa, 100% dos pacientes com hipotireoidismo auto-imune foram ou estão sendo tratados com levotiroxina.

Considerando os achados descritos no presente estudo retrospectivo, conclui-se que, no município de Três de Maio e nas localidades vizinhas, a incidência de anticorpos antitireoidianos em disfunções tireoidianas é significativa, tanto na área rural como urbana. A TH mostrou-se presente em todas faixas etárias, porém, com maior ocorrência em adultos e com predomínio no sexo feminino. A história familiar de TH pode sugerir um caráter genético à origem do problema, enquanto a existência de outros fenômenos de ativação do sistema imune pode sugerir uma predisposição ao desenvolvimento da disfunção. Por outro lado, as participações de fatores ambientais não podem ser excluídas também, merecendo estudos mais aprofundados.

REFERÊNCIAS

1. ANDREOLI, Thomas E.; BENNETT, J. Claude; CARPENTER, Charles C.; PLUM, Fred Cecil. Medicina Interna Básica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA., 1998.
2. ANTUNES, Lucyr Jones; MATOS, Klimbe T.F. Imunologia Médica. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992.
3. BAIMA, R.C.S.; QUEIROZ, A. N. P.; CALDAS, D.; FARIAS, S.L.; FONTES, A

- . C. P.; LEAL, D.; MANDARINO, K.; FISCHER, C.; MORAES, F.; GRION, M. Associação entre falência ovariana precoce e tireoidite auto-imune. Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia (IEDE), Rio de Janeiro, 2000.
4. BASARIA, Shehzad; BRAGA, Milena. A Rare Form Of Hypothyroidism. Southern Medicinal Journal, 2000.
 5. BRASILEIRO, Geraldo. Patologia Geral. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA., 1998.
 6. BRIX, Thomas Heiberg; KIRSTEN, Ohm Kyvik; HEGEDIS, Laszlo. A Population – Based Study Of Chronic Autoimmune Hypothyroidism In Danish Twins. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 85, no.2, 536 – 539, 2000.
 7. BURMANN, Kenneth D. Clinical Management of Hypothyroidism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 87, no.2, 658 –672, 2001.
 8. CARDOSO, Gilberto Perez. Conduta atual frente às disfunções tireoideanas. Revista Medicina ocupacional, ano III, no.3 : 06-08, 2002.
 9. FERNANDES, Ana Paula M.; MACIEL, Lea Maria Z.; FOSS, Milton César; DONADI, Eduardo Antônio. Como Entender A Associação Entre O Sistema HIA E As Doenças Autoimunes Endócrinas. Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo, v.47, no.5, São Paulo, outubro 2003.
 10. FERNANDES, Jayme Tadeu; GELLER, Mauro. Funções Hormonal E Sensorial Do Sistema Imunológico. Jornal Brasileiro de Medicina, vol. 65, no. 4, 185 – 190, outubro 1993.
 11. FERREIRA, A Walter; ÁVILA, Sandra L. M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA., 2001.
 12. GOREZYNSKI, Reginald; STANLEY, Jacquelline. Imunologia Clínica. Rio de Janeiro: Reichann e Afonso, 2001.
 13. GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
 14. HANA, Al-Adrani; L., John Hoffer; J., Enrique Silva. Resting Energy Expenditure is Sensitive to Small Dose Changes in Patients on Chronic Thyroid Hormone Replacement. The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 82, no. 4, 1118 – 11125, 1997
 15. HENRY, John Bernard. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. Vol. 1. 19 ed. São Paulo: Manole Ltda, 1999.
 16. HOLBOROW, E.J. e REEVES, W.G. Immunology in Medicine: A comprehensive guide to clinical immunology. New York: Academic Press Inc. E Grune & Stratton Inc, 1997.
 17. KASAMATSU, Teresa S; MACIEL Rui M.B; VIEIRA, José Gilberto H. Desenvolvimento e Validação de Um Método Imunofluorométrico Para a Pesquisa de Anticorpos Antiperoxidase Tiroidiano no Soro. Vol. 46. nº 2. São Paulo: Arquivo Brasileiro Endocrinologia, Metabolismo, 2002.
 18. LIMA, Marcus A.; YAMADA, Adriano F.; NAVARRO, Fábio C.; RESENDE, Elisabete M.; FERREIRA, Beatriz P.; BORGES, Maria F. Punção Biópsia Aspirativa De Tireóide Em Região De Bócio Colóide. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo, vol. 46, no. 3, São Paulo, junho – 2002.
 19. MARWAKA, R. K; TANDON, Nikhil; KARAK, A.K; GUPTA, Nandita; VERMA, Kusum; KOCHUPILLAI, N. Hashimoto's Thyroiditis: Country ride Screening Of Goitrous Healthy Young Girls In Postiodization Phase In India. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 85, no. 10, 3798 – 3802, 2000
 20. MAZZAFERRI, Ernest. Endocrinologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA., 1988.
 21. OLIVEIRA, Miriam C. Oliveira; PEREIRA, Arthur A Filho; SCHUCH, Tiago; MENDONÇA, Wilma Lucy. Sinais e Sintomas Sugestivos de Depressão em Adultos com Hipotireoidismo Primário. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo, vol. 45, no. 6, dezembro 2001, 570 – 573.
 22. PONTES, Alana A.N.; ADAN, Luís F.; COSTA, Ana Débora M.; BENÍCIO, Ana Valéria L.; SILVA, Carla R.A.; MORAIS, Raquel M.; PEDROSA, Verônica C. Prevalência de Doenças da Tireóide em Uma Comunidade do Nordeste Brasileiro. Vol. 46. nº 5. São Paulo: Arquivo Brasileiro de Endocrinologia, Metabolismo, 2002.
 23. PINTO, Jorge Eduardo da Silva; VAISMANN, Mário. DROGAS ANTITIREOIDEANAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE GRAVES: ALTAS X BAIXAS DOSES. Jornal Brasileiro de Medicina, vol. 72, no. 1 e 2, janeiro/fevereiro 1997.
 24. PRADO, Felício Cintra; RAMOS, Jairo de Almeida; VALLE, José Ribeiro. Atualização terapêutica: Manual prático de diagnóstico e tratamento. 20 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.
 25. QUEIROZ, Janaína L; DRUMOND, Luciana S; CASTRO, Rodrigo. Puberdade Precoce Secundária a Hipotireoidismo Primário – Relato de Caso. Vol. 46. nº 2. São Paulo: Arquivo Brasileiro de Endocrinologia, Metabolismo, 2002.
 26. ROOBINS, Stanley L.; KUMAR, Vinay; COTRAN, Ramzi S., Patologia Estrutural e Funcional. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
 27. ROSCA, Adriana; DUMITRASÇU, Victor; GRECU, Daniela; ZOSIN, Ioana; DAVID, Mihaela. Clinical And Immunological Aspects In Hashimotos's Thyroiditis. The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry (eJIFCC), vol. 14, no. 13, 2002.
 28. SZELEGA, Daniela V. Marques; SETIAN, Nuvarte; PASSOS, Leonardo; LIMA, Thais M. Ribeiro; KUPERMAN, Hilton; MANNA, Thais Della; DAMIANI, Durval, DICTCHEKENIAN, Vaê. TH na Infância e na Adolescência: Estudo Retrospectivo de 43 casos - 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.com.br>>. Acesso em: 23 set. 2003.
 29. TERNEY, Lawrence Jr; MCPHEE, Stephen J; PAPADAKIS, Maxine A. Diagnóstico e Tratamento 2001: um livro médico LANGE. São Paulo: Atheneu, 2001.

XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas VI Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

04 a 08 de junho de 2006

Local:

Estação Embratel Convention Center - Curitiba - PR

Promoção e Realização

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Avaliação do Emprego de Teste Combinado Antígeno/Anticorpo na Identificação de Infecção Recente de Hiv-I/Ii em Doadores de Sangue*

Evaluation of a Combined Antigen/ Antibody Test for The Identification of Recent Hiv I/Ii Infection in Blood Donors*

Paulo Germano de Carvalho¹; Francisco Braga Andrade²; Aparecida Tiemi Nagao Dias³; Jorge Heukelbach⁴; Fernando César de Carvalho⁵ & José Ájax Nogueira Queiroz⁶

RESUMO - O objetivo do trabalho foi avaliar o uso de teste combinado na identificação de infecção recente de HIV-1/2 em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará. Um novo ensaio (VIDAS HIV DUO/BioMérieux), que detectava antígeno p24 e IgG anti-HIV-1/2 foi introduzido à rotina e realizado em 998 doadores. Doadores com resultados positivos ou inconclusivos foram convocados para nova coleta e testes de ELISA e *Western Blot* (HIV Blot 2.2/Murex) foram novamente realizados. Sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança e o coeficiente Kappa foram calculados. Dentre os 998 doadores, 937 foram negativos nos três ensaios de ELISA e 61 (6,1%) apresentaram resultados positivos ou inconclusivos em pelo menos um teste. Entre os 61 doadores, 11 confirmaram-se positivos e 50 negativos no *Western Blot*. Nenhum caso de soroconversão foi verificado. A sensibilidade do teste combinado foi de 100%. As especificidades encontradas para os ensaios foram 99,0% (Vironostika HIV Uni-form II plus O), 99,3% (VIDAS HIV DUO) e 99,7% (ICE HIV-1.0.2). O coeficiente Kappa entre os testes de rotina foi de 60,4%. As concordâncias entre o teste combinado e os testes ICE HIV-1.0.2 e Vironostika HIV Uni-form II plus O foram Kappa=68,30% e Kappa=54,10%, $p<0,0001$, respectivamente. Os resultados mostraram que o desempenho do teste combinado é comparável aos métodos existentes no mercado. Entretanto, novos estudos são necessários para que se confirme sua utilidade na detecção de infecção recente de HIV em serviços de bancos de sangue.

PALAVRAS-CHAVE - doador. HIV. Soroconversão.

SUMMARY - The objective of this study was to evaluate a combined antigen-antibody test for the identification of recent HIV I/ II infections in blood donors at the Center of Hematology and Hemotherapy of Ceará State (HEMOCE) from 2000 to 2003. In addition to routine testing, a new essay (VIDAS HIV DUO/ BioMérieux) detecting the antigen p24 and IgG anti-HIV I/ II was performed in 998 blood samples. Donors positive or inconclusive results were invited to provide a second sample, ELISA and Western Blot tests (HIV Blot 2.2/ Murex) were repeated. Sensitivity, specificity, likelihood ratios, and the Kappa coefficients were calculated. Of the 998 blood donors, 937 had negative results for HIV in all three ELISA tests, and 61 (6,1%) had at least one positive or inconclusive result. Of these 61, 11 were confirmed to be positive by Western Blot. There was no case of seroconversion. The sensibility of the combined test was 100%. The specificities of the tests were 99,0% (Vironostika HIV Uni-form II plus O), 99,3% (VIDAS HIV DUO) and 99,7% (ICE HIV-1.0.2). The Kappa coefficient between the routine tests was 60,4%. The agreement between the combined VIDAS HIV DUO test and the ICE HIV-1.2.0 and Vironostika HIV Uni-form II plus O tests were Kappa=68,3% and Kappa=54,1%; $p<0,0001$, respectively. This study shows that the performance of the combined VIDAS HIV DUO test is similar to commercially available routine tests. Further studies are needed to confirm the usefulness of the combined test for detecting recent HIV infection in sera of blood donors.

KEYWORDS - donor. HIV. Seroconversion.

INTRODUÇÃO

Os modos de transmissão do HIV, hoje conhecidos por uma grande maioria da população, continuam os mesmos daqueles inicialmente observados no início da pandemia. No entanto, o número de pessoas portadoras do vírus continua aumentando a cada ano. Segundo estimativas da OMS, até 2003, 34,6 milhões a 42,3 milhões de pessoas foram consideradas portadoras de HIV/AIDS em todo mundo e mais de 20 milhões morreram devido à doença. Na América Latina houve 70.000 mortes associadas ao vírus, tendo ocorrido 120.000 a 180.000 novos casos em 2003, somando-se 1,9 milhões de pessoas portadoras da doença. Atualmente, o Brasil tem aproximadamente 680 mil portadores do vírus, incluindo pessoas que já desenvolveram AIDS. A incidência da AIDS por 100.000 habitantes é de aproximadamente 5,4 no Nordeste do país, sendo que o

Ceará responde por 1,6% desse percentual. A média anual de casos de AIDS nos últimos cinco anos foi de 526. Em Fortaleza, somam-se 2856 pacientes. (BRASIL, 2004; CA-SOS, 2004; DADOS, 2004a; DADOS, 2004b; ONUSIDA, 2003; STEINBROOK, 2004).

O sangue pela sua característica de produto biológico, mesmo se corretamente preparado e indicado, quando transfundido, carrega intrinsecamente vários riscos, incluindo a de transmitir o vírus da imunodeficiência adquirida. Em 1982, foi evidenciada a primeira descrição de uma doença semelhante à AIDS em hemofílicos e receptores de hemoderivados. Através desses relatos, levantou-se a suspeita de transmissão sanguínea do agente etiológico da AIDS tendo-se iniciado esforços para excluir das doações de sangue indivíduos com sintomas ou que apresentavam fatores de risco associados à doença. Assim, a partir das evidências epidemiológicas, mesmo antes da identificação

Recebido em 01/10/2004

Aprovado em 12/07/2005

*Trabalho realizado no centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará.

¹Mestrando em Patologia tropical, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará; ²Médico do Laboratório de Sorologia do HEMOCE; ³Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Ceará; ⁴Professor do Departamento de Saúde Comunitária da Universidade Federal do Ceará; ⁵Acadêmico do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Fortaleza; ⁶Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

do vírus, já se tornara contundente essa forma de transmissão (COVAS, 1998).

A detecção da infecção do HIV através dos testes imunológicos tem superado dificuldades principalmente atribuídas a grande variabilidade genética dos diferentes tipos (HIV-1 e HIV-2) e subtipos virais. Embora os dados relacionados à sua distribuição sejam ainda limitados, consequências imediatas dessa diversidade podem ser previstas, como por exemplo, as possíveis diferenças na patogênese e taxa de transmissão nos vários subtipos, a incapacidade de detectar todos os subtipos diferentes utilizando as ferramentas moleculares atuais e as distintas sensibilidades encontradas pelos diferentes ensaios para pesquisa de anticorpo dependente dos subtipos. (BARIN *et al.*, 1997; SIMONETTI, 2001). De qualquer modo, técnicas imunológicas de maior acurácia capazes de detectar mais precocemente a infecção pelo HIV tem sido desenvolvidas e introduzidas em rotina de laboratórios, desde a comercialização de testes de ELISA para pesquisa de anti-HIV em 1985 (FERNANDES, 2001; ONUSIDA, 2003).

Os primeiros testes para HIV usavam antígenos procedentes de células lisadas sensibilizando a fase sólida dos ensaios e anticorpos antiimunoglobulina humana policlonais conjugado a uma enzima. No entanto, anticorpos dirigidos contra esses antígenos causavam frequentemente reatividade não específica. A utilização de antígenos preparados por técnicas de DNA recombinante procurou assegurar uma melhor especificidade aos ensaios, contudo a sensibilidade se manteve similar aos testes de 1ª geração. Atualmente, os ensaios de 3ª geração detectam simultaneamente ambos os retrovírus (HIV-1 e HIV-2) e usam na fase sólida antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos; estes, podem ser conjugados e são utilizados para a detecção enzimática de anticorpos específicos para HIV (BRUST *et al.*, 2000; L.Y. *et al.*, 2001).

De fato, a detecção de anticorpos anti-HIV através dos testes de 3ª geração é improvável durante o período da janela imunológica e depende de uma série de fatores, tais como a via de infecção, a quantidade do inóculo, o tipo de vírus considerado e a resposta imunológica do hospedeiro. Anticorpos podem ser detectáveis em 1 a 2 semanas após a infecção. Entretanto, esse não é o caso para a maior parte das circunstâncias. De uma maneira geral, são detectáveis entre 30 a 90 dias após o evento que levou ao contágio, em aproximadamente 95% dos indivíduos (GRANATO, 2001). Dessa forma, o diagnóstico durante a janela imunológica tem sido feito através de estudo de antígenos virais, principalmente o p24. Nas primeiras semanas após a infecção, o antígeno p24 está presente no soro, antes da detecção dos anticorpos, embora a duração da antigenemia possa ser muito breve, em torno de 22 dias (JANSSEN, 1998; WEBER *et al.*, 1998). Para tanto, foram desenvolvidos testes usando anticorpo anti-p24 (policlonal e monoclonal) na fase sólida como anticorpos de captura e anticorpo específico conjugado com enzima (CONSTANTINE *et al.*, 2003; JANSSEN *et al.*, 1998).

Muitos estudos demonstraram que a detecção do antígeno p24 tem resultado na redução da janela imunológica (WEBER *et al.*, 1998). Em trabalho elaborado por Fransen *et al.* (1997), o teste demonstrou uma elevada sensibilidade e especificidade (acima de 99%) em doadores de sangue. Entretanto, pesquisas feitas por Sarkodie *et al.* (2001) demonstraram resultados comparáveis aos testes de 3ª geração que pesquisavam somente anticorpos. No Brasil, estudos feitos por Wendel *et al.* (2002) também apresentaram baixo rendimento após a utilização da pesquisa do antígeno p24 na triagem de doadores de sangue. Dessa forma, o uso

do teste para pesquisa do antígeno p24 é recomendado juntamente com outros ensaios atualmente disponíveis e que pesquisam anticorpos anti-HIV em rotina laboratorial (PARK; KIM, M; KIM, H., 2001).

Recentemente, para aumentar a eficácia dos métodos convencionais, ensaios de 4ª geração que permitem a detecção simultânea de anticorpos e antígeno (HIVAgp24), foram desenvolvidos e introduzidos na triagem sorológica para diagnóstico precoce da infecção. Teoricamente, estes ensaios combinados oferecem maior sensibilidade e encurtamento da janela imunológica para detecção do HIV (LY, LAPERCHE E COUROUCE, 2001). Na fase inicial, altos níveis de replicação viral estão ocorrendo e o antígeno p24 pode ser detectado. Posteriormente, durante a fase latente, os anticorpos podem ser evidenciados mas somente 10-20% de indivíduos infectados teriam antígeno em quantidade detectável, embora a antigenemia apareça em mais de 70% dos pacientes com AIDS (MARTINEZ *et al.*, 1999). Embora a detecção do antígeno dependa principalmente do momento da realização do teste durante a infecção viral, os ensaios combinados têm o forte propósito de reduzir a janela imunológica, justifica Yerly, Simon e Perrin (1999) e Weber (2003). Trabalhos realizados por Fransen *et al.*, (1997) e Brust *et al.* (2000) verificaram elevadas sensibilidades e especificidades superiores a 99,5% em doadores de sangue. Resultados similares foram achados por Park; Kim, M; Kim, H. (2001). Laperche, Maniez-Montreuil e Courouce (2000) usando 58 painéis comerciais demonstraram uma melhor sensibilidade com o uso de testes combinados em relação aos testes de 3ª geração, mesmo quando o rendimento em termos de redução de janela imunológica tinha sido moderado. No entanto, outros pesquisadores não encontraram resultados favoráveis aos testes combinados. Em um estudo feito por Weber *et al.* (2002) utilizando 16 painéis de soroconversão, 15 culturas de células infectadas com diferentes subtipos e 257 amostras com potencial reação cruzada verificou-se, elevada sensibilidade para os testes combinados, mas especificidade equivalente aos testes de 3ª geração. Martinez *et al.* (1999) e Ly, Laperche e Courouce (2001) encontraram sensibilidade equivalente, contudo especificidade inferior aos ensaios de 3ª geração. Do mesmo modo que ocorre nos ensaios de 3ª geração, o uso de teste combinado pode conduzir a um potencial risco de reatividade não específica (WEBER *et al.*, 1998). Hayashi *et al.* (1999) em seu estudo, usando painéis e amostras de mulheres grávidas e pacientes com hepatite, somaram 30 casos de reações falso-positivas. Weber *et al.* (1998, 1999) encontraram 08 casos de falsas reações em indivíduos acometidos por herpes e mononucleose infecciosa. Reatividade cruzada foi também demonstrada em amostras de pessoas infectadas com hepatite C. Segundo Weber *et al.* (2002) a taxa estimada foi de 0.3 a 0.8% versus 0.2% para outros ensaios. Djossou *et al.* (1999) determinando o custo-benefício do emprego do teste combinado em um centro de hematologia na França, não justificou a sua utilização após a verificação do incremento de falsos resultados. Entretanto, segundo Park, Kim, M. e Kim, H. (2001) e Meier *et al.* (2001), em bancos de sangue, onde a prevalência de infecção de HIV é baixa, a presença de falsas reações ocorre nos ensaios de 3ª e 4ª geração e não interferem no desempenho do teste combinado.

O Objetivo principal desse trabalho foi avaliar o emprego do teste combinado antígeno/anticorpo na identificação de infecção recente de HIV-I/II em doadores de sangue do HEMOCE e correlacionar os métodos convencionais de tri-

agem (ELISA) e o teste combinado VIDAS HIV DUO.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2003. A instituição pertence à Secretaria de Saúde do Estado.

A inclusão de indivíduos na população de doadores depende de aprovação clínica e sorológica. Se aprovado clinicamente, a doação é realizada devendo uma amostra de sangue ser investigada nos testes de triagem sorológica.

A rotina estabelecida em bancos de sangue exige a realização de provas imunológicas (VDRL, HBsAg, anti-HBc, anti-HCV, anti-HTLV, anti-HIV e anti-T.cruzi) em amostra de soro sanguíneo do doador. A pesquisa do anti-HIV é realizada através de dois testes imunoenzimáticos do tipo ELISA com princípios metodológicos distintos (Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon e ICE HIV-1.0.2/Murex).

Nesse trabalho, incluiu-se algumas modificações ao fluxograma (Portaria nº 488, de 17 jun. 1998) utilizado no HEMOCE. Um novo teste que detectava simultaneamente antígeno p24 e IgG (imunoglobulina G) anti-HIV-1 e anti-HIV-2 por tecnologia automatizada, foi introduzido na rotina e realizado em 998 indivíduos. Amostras cujos resultados foram positivos/inconclusivos, sejam nos testes convencionais ou no teste em estudo (VIDAS HIV DUO/BioMérieux), foram submetidos a provas de *Western Blot* (HIV Blot 2.2/Murex). Os doadores eram então solicitados para nova coleta de sangue e novas provas de ELISA eram realizadas. Quando necessário, testes de *Western Blot* foram novamente utilizados para confirmação dos resultados.

Para análise dos ensaios foram considerados os parâmetros sorológicos de sensibilidade e especificidade diagnóstica, bem como a razão de verossimilhança e o teste de coeficiente Kappa calculado pelo programa estatístico "stata versão 7". Para o cálculo, foram considerados como doentes os indivíduos que apresentavam resultados positivos em pelo menos 2 testes imunoenzimáticos de ELISA e confirmados por *Western Blot* (interpretado de acordo com o Centro Nacional de Transfusão Sanguínea e critérios previstos). Foram considerados não doentes os indivíduos negativos ou inconclusivos para os dois ELISA e confirmados negativos por *Western Blot*.

RESULTADOS

Dentre os indivíduos aceitos para a doação foram selecionados 998 doadores para a realização do estudo. Dentre estes, verificou-se que 937 foram negativos e 61 (6,1%) apresentaram testes positivos ou inconclusivos em pelo menos uma reação sorológica de rotina.

Dentre os 61 doadores, cujos resultados foram positivos ou inconclusivos na prova sorológica, 11 apresentaram amostras reagentes pelo DUO e pelas provas de ELISA, tendo sido confirmados positivos pelo teste de *Western Blot*. Entre as 50 amostras restantes, 41 apresentaram DUO negativo e testes de ELISA inconclusivos, e foram confirmados negativos pelo *Western Blot*. As 9 amostras restantes que obtiveram resultados DUO positivo e testes de ELISA negativos foram também confirmadas negativas no teste de *Western Blot*.

Dos 61 doadores que apresentaram inicialmente testes positivos ou inconclusivos na prova sorológica, 49 retornaram para realizar repetição dos testes. Dentre os doadores que foram positivos nos testes de ELISA, no DUO e no *Western Blot*, 7 retornaram e foram também positivos para o ELISA

e *Western Blot*. Dos que foram DUO positivo e ELISA (-/-), 6 retornaram e foram negativos para o ELISA. Entre os que apresentaram DUO negativo e ELISA inconclusivos, 35 retornaram e foram negativos no *Western Blot* (figura 1).

Dos 998 doadores, 21 foram positivos no teste Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon, 18 no teste VIDAS HIV DUO e 14 no teste ICE HIV-1.0.2/Murex. Dentre estes, 11 foram positivos nos três testes e confirmados positivos no *Western Blot*, nenhum foi positivo em dois testes, 10 foram positivos apenas no teste Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon, 7 no teste VIDAS HIV DUO e 3 no teste ICE HIV-1.0.2/Murex, tendo sido confirmados negativos no *Western Blot*. Entre os 998 indivíduos 30 foram indeterminados. A soroprevalência de HIV determinada no estudo foi 1,1%. Nenhum caso de soroconversão foi verificado. Doadores que apresentaram amostras inicialmente negativas nos exames de rotina sorológica (ELISA), permaneceram negativos em novas doações.

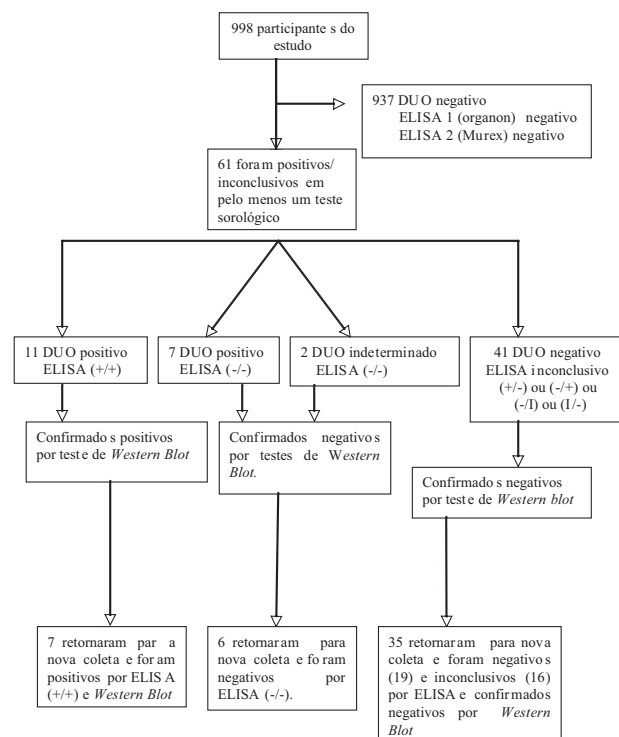


FIGURA 1: Algoritmo da análise sorológica para HIV na população de doadores em estudo.

Análise dos dados sorológicos

A sensibilidade e especificidade encontrada para o VIDAS HIV DUO foi de 100% e 99,3%, respectivamente (tabela 1).

TABELA 1
Resultado da análise sorológica em 998 amostras de doadores pelo teste VIDAS HIV DUO na ausência ou presença de doença.

Teste (DUO)	HIV positivo		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	11	7	18
Negativo	0	980	980
Total	11	987	998

As especificidades encontradas nos testes estão apresentadas na tabela 2. O teste VIDAS HIV DUO/BioMérieux

apresentou especificidade comparável às provas de triagem. Além disso, o intervalo de confiança mostra a semelhança existente entre os três ensaios.

Tabela II

Especificidade diagnóstica apresentada nos três testes enzimáticos e seus respectivos intervalos de confiança.

Teste	Especificidade	Intervalo de confiança
ICE HIV-1.0.2/Murex	99,7	(99,0-99,9)
VIDAS HIV DUO/Biomerieux	99,3	(98,5-99,7)
Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon	90,0	(99,0-99,6)

A Razão de verossimilhança (RV) foi calculada para o teste VIDAS HIV DUO. Essa relação não depende da prevalência da doença e é a razão entre a probabilidade de um determinado resultado do teste VIDAS HIV DUO em indivíduos soropositivo e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos HIV negativos.

A RV calculada para o teste positivo foi de 142, 86. Isso significa que a chance do teste positivo ser verdadeiro é 143 vezes maior do que ser falso, ou seja, expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes. Como a sensibilidade encontrada foi de 100%, o RV para o teste negativo foi zero, indicando que a chance de um teste negativo ser falso é nula.

O coeficiente de Kappa foi utilizado para verificar a concordância entre dois testes diagnósticos. Esse índice leva em consideração a proporção total de concordâncias observadas e a proporção de concordâncias que seriam esperadas por pura casualidade. O coeficiente Kappa achado entre os dois testes convencionais foi de 60,4% ($p < 0,0001$). A concordância entre o teste VIDAS HIV DUO/Biomerieux e o teste ICE HIV-1.0.2/Murex demonstrou-se maior do que a encontrada entre VIDAS HIV DUO/Biomerieux e o teste Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon (Kappa=68,30% versus Kappa=54,10%, $p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

Casos de infecção de HIV têm sido encontrados em todo mundo. O diagnóstico da infecção desses vírus tem sido feito quando o ELISA ocorre duplamente positivo e é confirmado mediante um ensaio mais específico, como o *Western Blot*. Atualmente, o risco de transmissão de HIV por hemocomponentes é mínimo, embora possa ocorrer. Dessa forma, a segurança do sangue testado tem justificado a utilização de ensaios de maior acurácia em triagem sorológicas permitindo identificar precocemente a infecção. Testes de 4ª geração com capacidade de detectar simultaneamente antígeno e anticorpo representam uma alternativa e podem ser empregados para melhorar a sensibilidade na detecção do HIV (BRUST *et al.* 2000; QUESADA, 2003; WEBER *et al.*, 2002).

Neste trabalho, dentre os 946 doadores incluídos na pesquisa, cujos resultados foram negativos para o ELISA na primeira doação, 542 retornaram para novas doações e continuaram negativos. Não houve casos de pacientes doentes com resultado de teste negativo, repercutindo numa elevada sensibilidade diagnóstica e valor preditivo negativo para os ensaios imunoenzimáticos (100%). Dados similares foram encontrados por Alamawi *et al.* (2003). Capra *et al.* (2001) avaliando o impacto da adoção do teste combinado em triagem de doadores do Hospital São Lucas-RS,

tampouco registraram caso de conversão sorológica em 10.000 doações. Segundo eles, a utilidade do teste deve ser avaliada de acordo com a incidência de sorologia positiva local. Schreiber *et al.* (2002) prevêem um baixo rendimento do teste para a pesquisa do antígeno p24. Eles acreditam que indivíduos com recente prática de comportamento de risco, ou mesmo, com sintomatologia associada à infecção aguda do HIV poderiam retardar a volta ao banco de sangue, quando os anticorpos já deveriam ser detectáveis por testes de terceira geração. Diferentemente Courouce (1999), Yerly, Simon e Perrin (1999) e Laperche, Maniez-Montreuil e Courouce (2000) justificaram a redução da janela imune e a importância do teste na avaliação de infecção recente.

A especificidade diagnóstica encontrada para os testes imunoenzimáticos foram 99,0% (Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon), 99,3% (VIDAS HIV DUO/Biomerieux), 99,7% (ICE HIV-1.0.2/Murex). Fransen *et al.* (1997), Brust *et al.* (2000) e Park; Kim, M; Kim, H. (2001) também verificaram especificidades superiores a 99% após o uso de ensaio combinado em doadores de sangue. Estes resultados demonstraram que o desempenho do teste combinado é pelo menos igual ou superior aos métodos existentes no mercado. Além disso, a concordância entre os testes VIDAS HIV DUO/Biomerieux e ICE HIV-1.0.2/Murex (Kappa=68,30%, $p < 0,0001$) demonstrou ser melhor do que entre VIDAS HIV DUO/Biomerieux e Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon (Kappa=54,10%, $p < 0,0001$) e a encontrada entre os dois testes convencionais de ELISA (60,4%, $p < 0,0001$). No entanto, novos estudos em doadores são necessários numa amostragem maior para que se confirme a utilidade do teste combinado na evidência de infecção recente de HIV em serviços de bancos de sangue.

Embora o novo ensaio represente um maior progresso em comparação com os testes anteriores, a ocorrência de provas falso positivas podem ser esperadas. Em nossa pesquisa este percentual estimado para o VIDAS HIV DUO foi de 0,7%, índice semelhante aos citados por Weber *et al.* (2002) e superior aos achados por Meier *et al.* (2001). Muitos estudos têm criticado o uso de teste combinado devido o aumento de reações falso positivas, quando otimistas, julgam apenas equivalentes aos testes de 3ª geração. De qualquer modo, em população de doadores onde são realizados ensaios extremamente sensíveis, é inevitável o grande número de testes indeterminados e também falso positivos, sejam nos ensaios de 3ª ou de 4ª geração.

De forma geral, as técnicas empregadas apresentaram alta sensibilidade e especificidade, porém, em população de doadores de sangue, o valor preditivo positivo foi baixo para os testes enzimáticos e decorre da baixa prevalência (1,1%) da doença. Candidatos que procuram o hemocentro para fazer doações, são indivíduos teoricamente sadios, o que diminui a chance da presença da doença quando o resultado do teste é positivo. Segundo Martinez *et al.* (1999) o teste combinado antígeno/anticorpo é mais bem empregado para fins diagnóstico, onde a conduta do indivíduo ou a sintomatologia presente estão relacionadas a suspeita clínica do médico. É indicado para pacientes com história sugestiva de fatores de risco, em pessoas que se contaminaram acidentalmente, em amostras de indivíduos que apresentaram testes inconclusivos e em amostras de doadores anônimos de órgãos. Nessa população ocorre uma maior prevalência da doença e um maior valor preditivo positivo pode ser esperado. Por outro lado, estudos feitos por Park; Kim, M; Kim, H. (2001), revelaram que a sensibi-

lidade e especificidade apresentada pelo teste combinado mantêm-se estável mesmo em populações de baixo risco, e é comparável aos achados na literatura. No entanto, o aperfeiçoamento da especificidade do teste pode ser importante para minimizar a restestagem desnecessária.

De qualquer modo, mesmo com a utilização de testes imunológicos de 4ª geração que de certo modo propõem a redução da janela imunológica, o risco das transfusões de sangue realizadas no Brasil continua vulneráveis aos vírus da AIDS. A proposta de implantação de tecnologia de detecção de ácidos nucleicos, motivada pela necessidade de se evitar o risco transfusional de doações soronegativas em populações de baixo risco, tem sido apresentada com a finalidade de detectar ácidos nucleicos virais em unidades com viremia e sem anticorpos, ou ainda não detectáveis, isto é, com elevada sensibilidade e especificidade. Por outro lado, testes de biologia molecular têm seu uso restrito a centros especializados e segundo o FDA não são indicados para diagnóstico de infecção primária (ANGULO, 2004; GRANATO, 2001; VULNERABILIDADE..., 2004).

Dessa forma, testes de 4ª geração com capacidade de detectar antígeno e anticorpo são uma alternativa e podem ser empregados em rotina sorológica. No entanto, a segurança transfusional, não depende apenas de elementos de caráter imunológico. Outros fatores como a educação, e a seleção cuidadosa de doadores por meio de entrevista e outros métodos com orientação e supervisão médica podem ser decisivos na garantia de qualidade do sangue a ser transfundido (ANGULO, 2004; BRUST *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS

- ALAMAWI, S.; ABUTALED, A.; QASEM, L.; MASOUD, S.; MEMISH, Z.; AL KHAIRY KHEIR, O.; BERNVIL, S.; HAJEER, A.H. HIV-1 p24 antigen testing in blood banks: results from Saudi Arabia. *Br. J. Biomed. Sci.*, v. 60, n. 2, p. 102-104, 2003.
- ANGULO, L. I. Detecção de agentes infecciosos pela tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos. Hemocentro de Ribeirão Preto. Disponível em: <<http://www.pegasus.fmrp.usp.br/educação/doeninfectrans/testamplicidos.pdf.resultadoadicional>> Acesso em: 20 ago. 2004.
- BARIN, F.; COUROUCE, A. M.; PILLONEL, J.; BUZELAY, L. Increasing diversity of HIV-1 serotypes in french blood donors over a 10-year period (1985-1995) Retrovirus Study Group of the French Society of Blood Transfusion. *AIDS*, v. 11, n. 12, p. 1503-1508, 1997.
- BRASIL. Portaria nº 262/GM, em 05 de fevereiro de 2002. Torna obrigatório, no âmbito da Hemorrede Nacional a inclusão nos serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, e privados, os testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos – NAT, para HIV e HCV, em todas as amostras de sangue de doadores. Fev 2002. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002/Gm/GM-262.htm>>. Acesso em: 31 ago 2004.
- BRUST, S.; DUTTMANN, H.; FELDNER, J.; GURTNER, L.; THORSTENSSON, R.; SIMON, F. Shortening of the diagnostic window with a new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening test. *J. Virol. Methods*, v. 90, n. 2, p. 153-165, 2000.
- CAPRA, M.E.Z.; FASSINA, K.; BENDER, A.L.; MELO, K.F.; LARANGEIRA, M.L.; WINCKLER, M.A. Triagem para HIV em doadores de sangue com teste combinado (anticorpos + antigenemia p240 no hospital São Lucas da PUC-RS. In: ESCOLA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA. Atualização em hemoterapia. São Paulo, 2001, p. 536 (Série de Monografias, v. 8, supl. Abst.)
- CASOS de aids e taxas de incidência (por 1000000 hab.), segundo ano de diagnóstico e local de residência, Brasil 1987. Disponível em: <http://www.Aids.gov.br/final/dados/dados_coletiva/tabela.htm>. Acesso em: 20 maio 2004.
- CONSTANTINE, N. T.; SILL, A. M.; JACK, N.; KRISTEN, K.; EDWARDS, J.; CAFARELLA, T.; SMITH, H.; BARTHOLOMEW, C.; CLEGHORN, F. R.; BLATT-

- NER, W.A. Improved classification of recent HIV-1 infection by employing a two-stage sensitive/less-sensitive test strategy. *J. Acquir. Immune Defic. Sindr.*, v. 32, p. 94-103, 2003.
- COUROUCE, A. M. Sensitivity of screening kits for anti-HIV antibodies. 1999 update. Retrovirus Working Group of the French Society for Blood Transfusion. *Transf. Clin. Biol.*, v. 6, n. 6, p. 381-394, 1999.
- COVAS, D. T. Risco de transmissão do HIV-1 pelas transfusões de sangue. *Série de Monografias da Escola Brasileira de Hematologia*, v. 5, p. 100-106., 1998.
- DADOS e pesquisas em DST e Aids: dados de Aids. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/final/dados/aids.htm>> Acesso em: 20 maio 2004a.
- DADOS e pesquisas em DST e Aids: dados de HIV. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/final/dados/hiv.htm>> Acesso em: 20 maio 2004b.
- DJOSSOU, F.; SALMI, L. R.; LAWSON-AYAYI, S.; HUET, C.; PEREZ, P.; MATHOULIN-PELISSIER, S.; SALAMON, R. Cost-benefit analysis of screening strategies by human immunodeficiency virus in French blood donors. *Transf. Clin. Biol.*, v. 6, n. 3, p. 180-188, 1999.
- FERNANDES, M. F. A. Hemovigilância: análises das informações disponíveis para a sua implantação, de acordo com a (re)investigação de casos de AIDS associados à transfusão. 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- FRANSEN, K.; MERTENS, G.; STYNEN, D.; GORIS, A.; NYS, P.; NKENGASONG, J.; HEYNDRICKX, L.; JANSSENS, W.; GROEN, V. D. G. Evaluation of a newly developed HIV antigen test. *J. Med. Virol.*, v. 53, n. 1, p. 31-35, 1997.
- GRANATO, C. Interpretação das técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-HIV. São Paulo, abril 2001. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/mednews/0401/curso_hiv.htm>. Acesso em: 15 dez. 2001.
- JANSSEN, R. S.; SATTEN, G. A.; STRAMER, S. L.; RAWAL, B. D.; O'BRIEN, T. R.; WEIBLEN, B. J.; HECHT, F. M.; JACK, N.; CLEGHORN, F. R.; KAHN, J. O.; CHESNEY, M. A.; BUSCH, M. P. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA*, v. 280, n. 1, p. 42-48, 1998.
- LAPERCHÉ, S.; MANIEZ-MONTREUIL, M.; COUROUCÉ, A. M. Les tests de dépistage combiné de l'antigène p24 et des anticorps anti-VIH dans l'infection précoce à VIH-I. *Transf. Clin. Biol.*, v. 7, suppl. 1, p. 18-24, 2000.
- VULNERABILIDADE nos bancos de sangue brasileiros persiste. Folha de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 17 abril 2004. Disponível em: <<http://www.agenciaaids.com.br/noticias-resultado.asp?Codigo+756>>. Acesso em: 20 ago 2004.
- LY, T. D.; LAPERCHÉ, S.; COUROUCE, A. M. Early Detection of human immunodeficiency virus infection using third- and fourth-generation screening assays. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 20, p. 104-110, 2001.
- LY, T. D.; MARTIN, L.; DAGHFAL, D.; SANDRIDGE, A.; WEST, D.; BRISTOW, R.; CHALOUAS, L.; QIU, X.; LOU, S. C.; HUNT, J. C.; SCHOCHETMAN, G.; DEVARE, S. G. Seven human immunodeficiency virus antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 9, p. 3122-3128, 2001.
- MARTINEZ-MARTINEZ, P.; MARTIN, B. E.; DE BENITO, J.; LANDINEZ, R. New lineal immunoenzymatic assay for simultaneous detection of p24 antigen and HIV antibodies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 18, n. 8, p. 591-594, 1999.
- MEIER, T.; KNOLL, E.; HENKES, M.; ENDERS, G.; BRAUN, R. Evidence for a diagnostic window in fourth generation assays for HIV. *J. Clin. Virol.*, v. 23, p. 113-116, 2001.
- ONUSIDA. Organización Mundial de la Salud. Situación de la epidemia de SIDA: 2003. Ginebra, 2003.
- PARK, K. I.; KIM, J. M.; KIM, H. S. Evaluation of a simultaneous HIV antigen and antibody detection test in Korean population. *Yonsei Med. J.*, v. 42, n. 2, p. 185-193, 2001.
- QUESADA, M. D.; MATAS, L.; ALMEDA, J.; CASABONA, J. Diagnóstico postesposicional precoz de la infección por VIH. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 21, n. 6, p. 320-323, 2003.
- SARKODIE, F.; ADARKWA, M.; ADU-SARKODIE, Y.; CANDOTTI, D.; ACHEAMPONG, J. W.; ALLAIN, J. P. Scree Methods, v. 78, p. 61-70, 1999.

WENDEL, S.; FACHINI, R. M.; LEVI, J. E.; GHANAME, J. N.; MENDONÇA, M. C.; ALMEIDA NETO, C.; BRAGA, M. C.; DI PIETRO, A. E. A single window-period donation detected by human immunodeficiency virus p24 antigen after 5 years of routine screening in a group of Brazilian blood banks. *Vox Sang.*, v. 83, n. 4, p. 309-312, 2002.

YERLY, S.; SIMON, F.; PERRIN, L. Early diagnosis of primary HIV infections: using a combined screening test (p24 antigen and anti-HIV antibodies).

Schweiz. Med. Wochenschr., v. 129, n. 8, p. 319-322, 1999.

Endereço para correspondência:
Paulo Germano de Carvalho
Rua Pedro Machado Nº 921 bloco A apto 304
Bairro Damas. Fortaleza. Ceará. CEP 60416430
e-mail: paulogermano@hemoce.ce.gov.br

Título de Especialista em Análises Clínicas

O que é e como obtê-lo?

O TEAC – Título de Especialista em Análises Clínicas, é um documento outorgado pela SBAC – Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, no qual somente os profissionais que exercem as Análises Clínicas, e que sejam legalmente habilitados para assumirem a responsabilidade técnica por Laboratórios Clínicos, de acordo com a legislação federal vigente no país, é que podem prestar o Concurso para obter o Certificado do Título de Especialista em Análises Clínicas.

Para se inscrever no concurso do TEAC, os candidatos deverão solicitar o regulamento e ficha de inscrição à SBAC Nacional ou nas Regionais/Delegacias, por fax, telefone, e-mail, carta ou pessoalmente.

Condições para inscrição no Concurso do TEAC:

1. Os candidatos habilitados a prestarem o Concurso são: Farmacêutico-bioquímico, Médico e Biomédico.
2. Ser sócio da SBAC efetivo e estar em dia com os seus deveres estatutários.
3. Preencher ficha de inscrição, colocando quais as matérias de peso 03 e 02.
3.1 O candidato obrigatoriamente terá que escolher as matérias de peso 03 e 02, a peso 03 deverá ser a matéria de maior conhecimento do candidato, e peso 02 a Segunda matéria de maior conhecimento do candidato, as outras matérias contarão como peso 01.
4. Pagar taxa de inscrição do concurso.
5. Para os inscritos no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, haverá desconto de 50% na taxa de inscrição do Concurso do TEAC.
6. Após estes procedimentos, o candidato tem direito de receber o Programa do Concurso (impresso ou em disquete).

As Disciplinas:

- 1 – De acordo com o Programa o Candidato é avaliado pela Banca Examinadora do Concurso, no qual terá que ser aprovado nas seguintes Especialidades das Análises Clínicas:
 - Bioquímica Clínica;
 - Hematologia Clínica;
 - Imunologia Clínica;
 - Microbiologia Clínica;
 - Parasitologia Clínica.
- 2 – O conteúdo programático do Controle da Qualidade e da Segurança, é aplicado a essas disciplinas.
- 3 – Excepcionalmente o candidato também poderá ter como opção a matéria de Citologia Esfoliativa, sendo obrigatoriamente a primeira opção. Neste caso, o candidato também terá que se inscrever no Concurso para obtenção do TECC – Título de Especialista em Citologia Clínica, pela SBCC – Sociedade Brasileira de Citologia Clínica, sendo aprovado receberá o certificado pela SBCC.
- 4 – Tendo sido aprovado no Concurso para obtenção do TECC, e no Concurso para obtenção do TEAC, o Certificado do Título de Especialista em Análises Clínicas, terá o apostilamento em Citologia Esfoliativa no verso do Certificado.

5 – Não tendo sido aprovado no Concurso para obtenção do TECC, e sendo aprovado no Concurso do TEAC, o candidato terá o Certificado do Título de Especialista em Análises Clínicas, sem o apostilamento em Citologia Esfoliativa.

6 – Os portadores do Título de Especialista em Análises Clínicas, que se submeterem à prova para obtenção do TECC, pela SBCC e forem aprovados, terão seus Títulos apostilados no verso a especialidade de Citologia Esfoliativa.

As Provas:

O Concurso do TEAC é composto das Provas Escritas, Práticas de Conhecimento (dissertativa, Oral e Slide) e de Títulos (exercício profissional e atualização de conhecimentos).

Obs: a avaliação em Citologia pela SBCC, será Prova Escrita, Prática e Avaliação curricular.

Avaliação da Prova de Títulos a Outorga do TEAC:

Os Candidatos aprovados, terão que enviar num prazo máximo de 2 anos (de acordo com o Regulamento do TEAC), Currículo Vitae e cópia de documentação comprobatória de exercício profissional e atualização de conhecimentos.

Validade do TEAC:

O TEAC é um documento que tem validade de 05 (cinco) anos, de acordo com o seu Regulamento. Sendo assim, após 5 (cinco) anos da data de outorga ou da data da última renovação do Título de Especialista o profissional terá que comprovar que continua exercendo a profissão e que se atualizou nos últimos cinco anos, enviando os documentos que somem 2.000 pontos de acordo com o Capítulo III – Da Avaliação, Artigo 8º, do Regulamento do TEAC.

O Portador do TEAC que, na renovação não atingir o valor de pontos determinado no Regulamento, poderá submeter-se as Provas de Conhecimentos, que serão avaliadas, de acordo com o item 1 do Artigo 8º.

Próximo Concurso do TEAC e TECC:

Os próximos Concurso para Outorga do Título de Especialista em Análises Clínicas e Concurso para outorga do Título de Especialista em Citologia Clínica será realizado durante o 32º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 5º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, nos dias 21 e 22 de maio de 2005, em Goiânia – GO.

Para os inscritos no 32º congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 5º congresso Brasileiro de Citologia Clínica, haverá um desconto de 50% nas inscrições.

Caso ainda não esteja inscrito no congresso, o interessado deverá fazê-lo até 30 dias antes do início do evento.

Informações gerais:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC
Tel/fax (0xx21) 2264-4449 e 2204-0245 ou e-mail: teac@sbac.org.br

Sociedade Brasileira de Citologia Clínica - SBCC
Tel/fax (0xx62) 229-0468 e 223-5661 ou e-mail: sbacgo@terra.com.br

Comparação de Dois Métodos de PCR para Detecção da Mutação de Leiden no Fator V

Comparison of two PCR methods for the detection of the factor V Leiden mutation

Fabian Friedrich; Paulo Osório; Sidney Orelli Braga; Maurício P. Andrade; Marco Antônio Largura & Alvaro Largura.

RESUMO - Um importante fator de predisposição genética para trombose venosa em humanos é uma mutação de G->A no nucleotídeo 1691 do gene que codifica o fator V da coagulação, conhecida como a mutação de Leiden. Técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem demonstrado ser de grande importância na detecção dessa mutação. O objetivo do presente estudo é comparar os resultados de dois diferentes métodos, baseadas na técnica de PCR, na detecção da mutação de Leiden no gene do fator V. O primeiro método foi realizado usando o kit comercial AMS50 (Clonit), enquanto o segundo, um método publicado por Hezard *et al.*, 1997. Ambos os métodos detectam o alelo selvagem e o alelo mutado, e permitem classificar o genótipo como sendo homozigoto selvagem, heterozigoto ou homozigoto mutado. A análise do DNA extraído do sangue total de 38 indivíduos usando esses dois métodos de PCR forneceu os mesmos resultados, e permitiu identificar 32 indivíduos homozigotos selvagens e 6 indivíduos heterozigotos para a mutação de Leiden. Esses resultados confirmam a importância desses dois métodos, baseados na PCR, na detecção dessa mutação em rotina clínica laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE - Fator V, PCR, mutação, trombose venosa.

SUMMARY - An important genetic predisposition factor for venous thrombosis in humans is a G->A mutation at nucleotide 1691 of the gene that codes for factor V of coagulation, known as the Leiden mutation. Molecular biology techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) have shown an important role in the detection of this mutation. The objective of this study is to compare the results of two different methods, based on the polymerase chain reaction technique, for the detection of the Leiden mutation in the gene of factor V. The first method was performed using the AMS50 commercial kit (Clonit), while the second, a method published by Hezard *et al.*, 1997. Both methods detect the wild-allele and the mutated-allele, and permit to classify the genotype as wild homozygous, heterozygous and mutated homozygous. The analysis of DNA extracted from blood of 38 individuals using these two PCR methods showed the same results and allowed the identification of 32 wild homozygous and 6 heterozygous individuals for the Leiden mutation. These results confirm the importance of these two PCR methods in the detection of this mutation in clinical laboratorial routine.

KEYWORDS - Factor V, PCR, mutation, venous thrombosis.

INTRODUÇÃO

A trombose venosa é uma doença multifatorial com forte componente genético. Uma mutação de G->A no nucleotídeo 1691 do exon 10 do gene que codifica o fator V da coagulação é um importante fator de predisposição à trombose venosa em humanos^{2,3}. Essa mutação é conhecida como a mutação de Leiden do fator V. A frequência dessa mutação têm sido estimada entre 20 e 50% em pacientes tromboembólicos e de 5% na população controle saudável³. Os indivíduos heterozigotos para essa mutação possuem um risco aumentado de 5 a 10 vezes de desenvolver trombose venosa em comparação com homozigotos selvagens². Em indivíduos homozigotos para essa mutação, o aumento em risco é de 50 a 100 vezes de desenvolver trombose venosa.

Atualmente a mutação de G->A no nucleotídeo 1691 do gene para o fator V pode ser detectada através de técnicas de biologia molecular tal como a reação em cadeia da polimerase (PCR)^{1,3,4,5,7,8}. Após extração do DNA humano presente no sangue total, a técnica de PCR pode ser utilizada na detecção dessa mutação, e na detecção do alelo selvagem (1691G) e do alelo mutado (1691A) em

testes de rotina clínica laboratorial, permitindo classificar o genótipo do paciente como homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado. Um homozigoto selvagem possui duas cópias do alelo selvagem (1691G/1691G), um heterozigoto possui uma cópia do alelo selvagem e uma cópia do alelo mutado (1691G/1691A), e um homozigoto mutado possui duas cópias do alelo com mutação (1691A/1691A). Dentre os diversos métodos de PCR utilizados na detecção do alelo selvagem e mutado, e na classificação do paciente como homozigoto selvagem, heterozigoto ou homozigoto mutado, encontramos o kit comercial AMS50 (Clonit S.r.l) e uma técnica publicada por Hezard *et al.* (1997)³.

O objetivo do presente estudo é comparar os resultados de dois diferentes métodos, baseados na técnica de PCR, na detecção da mutação de Leiden no gene do fator V em DNA extraído de sangue humano. Os dois métodos usados na detecção dessa mutação foram realizados usando o kit comercial AMS50 (Clonit) e uma técnica publicada por Hezard *et al.* (1997)³, que detectam o alelo selvagem e o alelo mutado, e permitem classificar o genótipo como sendo homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado.

Recebido em 06/04/2005

Aprovado em 12/07/2005

Unidade de Biologia Molecular, Laboratório Álvaro, Cascavel, Paraná

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras clínicas

No presente estudo, foram coletadas amostras de sangue total de 38 indivíduos, com consentimento informado. O sangue foi coletado utilizando o anticoagulante EDTA e preservado a 4°C por vários dias ou congelado até o momento da extração do DNA.

Extração do DNA e análise por PCR

Após a extração e purificação do DNA de sangue total de 38 indivíduos, com dois diferentes kits de extração, dois métodos baseados na técnica de PCR foram testados com o objetivo de detectar uma mutação de G->A no nucleotídeo 1691 (mutação de Leiden) no gene que codifica o fator V, e comparar os resultados. O primeiro método usado na detecção dessa mutação foi realizado usando o kit comercial AMS50 (*Clonit S.r.l.*), enquanto o segundo foi um método publicado por Hezard *et al.* (1997)³. Ambos os métodos permitem detectar o alelo selvagem (1691G) e o alelo mutado (1691A), e classificar o genótipo como homozigoto selvagem, heterozigoto ou homozigoto mutado. Para extração do DNA utilizado na PCR com o kit AMS50 foram utilizados reagentes fornecidos no kit. Na extração do DNA utilizado na PCR pelo método de Hezard *et al.* (1997) foi usado o kit *UltraClean™ BloodSpin* (Mo Bio Laboratories, Inc.). O DNA foi extraído de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes dos kits. O método de PCR, usando o kit AMS50 foi realizado seguindo as instruções do fabricante, enquanto o segundo método de PCR foi realizado de acordo com metodologia publicada por Hezard *et al.* (1997)³.

RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas amostras de DNA genômico do sangue total, coletadas de 38 indivíduos, por dois métodos baseados na PCR, com o objetivo de detectar a mutação de Leiden (1691G->A) e comparar os resultados (tabelas 1) dos dois métodos. A extração de DNA do sangue e a PCR usando o kit AMS50, na análise do genótipo dos 38 indivíduos, permitiu identificar 32 homozigotos selvagens com alelos 1691G/1691G e seis heterozigotos com alelos 1691G/1691A. A extração do DNA de sangue usando o kit *UltraClean™ BloodSpin* e o método de PCR de Hezard *et al.* (1997), na análise do genótipo dos mesmos 38 indivíduos, também permitiu identificar 32 homozigotos selvagens com alelos 1691G/1691G e seis heterozigotos com alelos 1691G/1691A. A comparação dos resultados (tabela 1) mostrou que ambos os métodos de PCR forneceram os mesmos genótipos. Os mesmos 32 homozigotos selvagens e os mesmos seis heterozigotos foram identificados pelos dois métodos. Esses resultados mostram que os dois métodos de PCR testados detectaram eficientemente uma mutação no gene para o fator V, e ambos permitiram detectar o genótipo dos pacientes.

Tabela 1

Resultados da classificação do genótipo de 38 indivíduos por dois métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Os alelos selvagem (1691G) e/ou mutado (1691A) presentes no DNA dos indivíduos analisados são mostrados. O alelo mutado é mostrado em negrito.

Indivíduo	Alelos		Genótipo pelas duas técnicas
	Kit AMS50 (Clonit)	Técnica de Hezard <i>et al.</i> , 1997	
1	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
2	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
3	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
5	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
6	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
7	1691G/ 1691A	1691G/ 1691A	heterozigoto
8	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
9	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
10	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
11	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
12	1691G/ 1691A	1691G/ 1691A	heterozigoto
13	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
14	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
15	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
16	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
17	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
18	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
19	1691G/ 1691A	1691G/ 1691A	heterozigoto
20	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
21	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
22	1691G/ 1691A	1691G/ 1691A	heterozigoto
23	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
24	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
25	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
26	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
27	1691G/ 1691A	1691G/ 1691A	heterozigoto
28	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
29	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
30	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
31	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
32	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
33	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
34	1691G/ 1691A	1691G/ 1691A	heterozigoto
35	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
36	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
37	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem
38	1691G/1691G	1691G/1691G	homozigoto selvagem

DISCUSSÃO

Atualmente as técnicas de biologia molecular, como a PCR, têm uma importância crescente na detecção de mutações que podem estar associadas à predisposição genética a determinadas doenças. Entre as mutações detectadas pela técnica de PCR podemos citar a mutação de Leiden. Essa mutação ocorre no nucleotídeo 1691 (G->A) do gene que codifica o fator V da coagulação e resulta numa substituição de aminoácido (Arg->Gln) na posição 506 da molécula do fator V. A mutação de Leiden é o fator de risco genético mais comum para a trombose venosa em humanos^{2,3}. Estudos mostraram que a ocorrência dessa mutação em heterozigose (1691G/1691A) aumenta em aproximadamente 7 vezes o risco do desenvolvimento de trombose venosa quando comparado com pacientes geneticamente não afetados (1691G/1691G)⁶. A homozigose para a mutação de Leiden (1691A/1691A) no fator V confere um risco aumentado de 80 vezes para a trombose venosa. O alto risco de trombose venosa associado a mutação de Leiden (no nucleotídeo 1691) mostra a importância da detecção do alelo mutado (1691A) e de um diagnóstico capaz de diferenciar pacientes com genótipo homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado na população. Um diagnóstico do alelo mutado em heterozigose ou homozigose mostra uma

predisposição genética do paciente em desenvolver trombose venosa.

No presente estudo, foram comparados os resultados de dois métodos utilizados na detecção da mutação de Leiden, baseados na técnica de PCR. A análise de DNA extraído de sangue total de 38 indivíduos utilizando o kit AMS50 (Clonit) e um método publicado por Hezard *et al.* (1997)³ mostrou os mesmos resultados, confirmando a sensibilidade, especificidade e importância dos dois métodos de PCR na detecção da mutação de Leiden. Como essa mutação é o fator de risco genético mais comum para a trombose venosa, o presente estudo mostra a importância da detecção dessa mutação em heterozigose ou homozigose em adultos, adolescentes, crianças e bebês, os quais podem vir a desenvolver trombose venosa futuramente.

REFERÊNCIAS

1. Ameziane, N.; Lamotte, M.; Lamoril, J.; Lebre, D.; Deybach, J.C.; Kaiser, T.; Prost, D. Combined factor V Leiden (G1691A) and prothrombin (G20210A) genotyping by multiplex real-time polymerase chain reaction using fluorescent resonance energy transfer hybridization probes on the Rotor-Gene 2000. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14: 421-444, 2003.
2. Dahlback B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 74:

139-48, 1995.

3. Hezard, N.; Cornillet, P.; Droulle, C.; Gillot, L.; Potron, G.; Nguyen, P. Factor V Leiden: Detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position. *Thromb Res.* 88: 59-66, 1997.
4. Lutz, C.T.; Foster, P.A.; Noll, W.W.; Voelkerding, K.V.; Press, R.D.; McGlennen, R.C.; Kirschbaum, N.E. Multicenter evaluation of PCR methods for the detection of factor V Leiden (R506Q) genotypes. *Clin Chem.* 44: 1356-58, 1998.
5. Mitterer, M.; Lanthaler, A.J.; Mair, W.; Giacomuzzi, K.; Coser, P. Simultaneous detection of FV Q506 and prothrombin 20210 variation by allele-specific PCR. *Haematologica* 84: 204-207, 1999.
6. Rosendaal, F.R.; Koster, T.; Vandenbroucke, J.P.; Reitsma, P.H. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 85: 1504-1508, 1995.
7. van den Berg, F.A.J.T.M.; van Oeveren-Dybic, A.M.; Bon, M.A.M. Rapid single-tube genotyping of the factor V Leiden and Prothrombin mutations by real-time PCR using dual-color detection. *Clin Chem.* 46: 1191-95, 2000.
8. von Ahsen, N.; Schutz, E.; Armstrong, V.W.; Oellerich, M. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and Methylene-tetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* 45: 694-96, 1999.

Endereço e autor para correspondência:

Fabian Friedrich, MSc, PhD
Setor de Biologia Molecular
Laboratório Alvaro
Rua General Osório, 3212
Cep 85801-110 Cascavel – Paraná - Brasil
Tel.: (045) 220-8000
e-mail: fabian@alvaro.com.br



XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas VI Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

04 a 08 de junho de 2006

Local:
Estação Embratel Convention Center - Curitiba - PR

Promoção e Realização

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Identificação dos Atributos de Qualidade Mais Importantes na Percepção dos Usuários de um Laboratório Clínico

Identification of the most important quality attributes perceived by users of a clinical laboratory in Brazil

Tatsuya Sakuma¹; Adriane Faria de Queiroz²; Erci Tibana Sakuma³; Thais Harumi Sakuma⁴ & Tatiana Tiemi Sakuma⁴

RESUMO – No Brasil, os laboratórios clínicos vivenciam um cenário de muitas dificuldades financeiras, devido à má remuneração dos serviços laboratoriais pelos planos de saúde e à elevada carga tributária. Uma das estratégias para sobreviver nesse mercado altamente competitivo é implementar a melhoria contínua na qualidade de atendimento aos clientes. Isso constitui a ferramenta-chave para aumentar a satisfação e, conseqüentemente, a fidelidade desses clientes, o que está intimamente associado à lucratividade empresarial. Dos 16 atributos pesquisados em um laboratório clínico privado, de Campo Grande, MS, os quais se relacionavam com as cinco dimensões que determinam a qualidade em serviços, o atributo 'higiene e limpeza' recebeu a melhor avaliação por parte dos clientes, seguido dos atributos relacionados com as dimensões 'confiabilidade', 'segurança' e 'capacidade de resposta', sendo que 'higiene e limpeza' foi o único dentre estes a se relacionar com a dimensão 'tangibilidade'. O atributo que se refere ao atendimento especial a clientes com mais de 60 anos foi mais valorizado do que o de atendimento especial a crianças.

PALAVRAS-CHAVE – Qualidade, serviços, atributos, satisfação.

SUMMARY – In Brazil, clinical laboratories have been experiencing serious financial difficulties because laboratorial services are very lowly paid by health maintenance organizations and because the current tax burden is high. One of the strategies to survive in such a highly competitive market is to implement continuous improvements to the quality of customer service — a decisive tool for increasing the satisfaction of clients and therefore their fidelity, which is closely associated with corporate profitability. Sixteen attributes that relate to the five dimensions that determine service quality were investigated in a private clinical laboratory located in Campo Grande, MS. 'Hygiene and cleanliness' was the attribute most highly valued by clients, followed by the attributes relating to the dimensions 'reliability', 'confidence', and 'responsiveness'. Of these, 'hygiene and cleanliness' was the only one that relates to the dimension 'tangibility'. The attribute related to the provision of special care for elderly clients (over 60 years of age) ranked higher than its counterpart for children.

KEYWORDS – Quality, services, attributes, satisfaction.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os laboratórios clínicos brasileiros têm vivenciado um cenário de grandes dificuldades financeiras, tanto porque os planos de saúde remuneram mal os serviços laboratoriais quanto por causa da elevada carga tributária. A cada dia que passa, os estudos revelam que os clientes estão mais exigentes em todos os setores do mercado (Rojo, 1998) e com mais opções para suas necessidades. Para atender a essas necessidades e expectativas dos clientes do laboratório clínico, é de suma importância conhecer os atributos que poderão aumentar a satisfação desses consumidores, o que pode acrescentar benefícios à empresa, graças a uma manutensão mais duradoura da relação entre esta e o cliente.

Tal relação poderá aumentar a fidelidade dos clientes (Grönroos, 1993), que constitui a base para o sucesso de qualquer empreendimento. Segundo Hesskett, Sasser & Hart (1994), a fidelidade e satisfação dos clientes estão intimamente relacionadas com a lucratividade empresarial. A melhoria contínua na qualidade de atendimento será a ferramenta-chave para a conquista de vantagem competitiva que permitirá sobreviver por mais tempo nesse mercado de alta concorrência.

Segundo os resultados das pesquisas de Parasuraman, Zeithaml & Berry (1985), a qualidade percebida de um serviço pode ser avaliada em cinco dimensões: confiabilidade, ca-

pacidade de resposta, segurança, empatia e elementos tangíveis.

Confiabilidade. De todas as cinco dimensões, a confiabilidade é o indicador mais relevante na percepção da qualidade do serviço, pois está relacionada com a capacidade da empresa prestadora de serviços no cumprimento das promessas feitas. O profissional que promete demais corre o risco de perder a confiança dos clientes, uma vez que poderá não conseguir atender a todas as promessas feitas. Esse indicador também está intimamente ligado à qualidade dos procedimentos da empresa prestadora de serviços.

Capacidade de resposta. É a capacidade de atender aos clientes e prestar serviços com agilidade. O prestador de serviços deve estar sempre receptivo e disposto a ajudar a resolver as necessidades dos clientes. O profissional precisa estar atento às reclamações, aos problemas e às exigências dos clientes e buscar suprir essas demandas com a maior agilidade possível. A satisfação do cliente está relacionada com a compreensão de suas necessidades por parte da empresa e com a habilidade desta em responder a tais necessidades.

Segurança. A segurança refere-se ao conhecimento e cortesia dos empregados e à habilidade de transmitir confiança. Quanto mais confiável o serviço, mais seguro o cliente se sentirá — dada sua incerteza inicial ao fazer o contrato — sobre a qualidade do serviço a receber. Para inspirar segurança, é oportuna a utilização da imagem institucional, caso

Recebido em 19/10/2004
Aprovado em 12/07/2005

¹Professor Doutor do Estágio Supervisionado de Análises Clínicas da Faculdade Estácio de Sá; ²Professora do DEA da UFMS; ³Diretora do Laboratório Bioclinico Ltda, Campo Grande, MS; ⁴Alunas do curso de medicina da UFMS

a empresa seja bastante conhecida e conceituada. Além disso, podem ser expostos os certificados do sistema da qualidade da instituição (ISO 9001-2000, DICQ, PALC, CAP etc.), bem como os de treinamento do profissional da área técnica.

Empatia. É o tratamento oferecido de forma atenciosa e carinhosa por parte da equipe, para que o atendimento seja mais personalizado e o relacionamento o mais agradável possível. Para suprir essa dimensão, são decisivos uma boa seleção e um adequado treinamento dos que irão compor a equipe de trabalho. Funcionário bem treinado, cortês e com personalidade afável é elemento-chave para a manutenção de um relacionamento cliente-empresa duradouro.

Tangibilidade. Diz respeito à aparência da estrutura física da empresa, dos equipamentos utilizados, do sistema de comunicação e do pessoal. Esses elementos podem transmitir uma imagem da qualidade do serviço prestado pela empresa, já que, por sua própria natureza, o serviço é intangível. O prestador de serviços deve ter grande preocupação com essa dimensão, pois muitos usuários valorizam a boa aparência, elemento que já faz parte da cultura de nossa população. No caso do laboratório clínico, além da aparência da instalação física, do pessoal e do equipamento utilizado, é importante que o resultado do exame seja impresso em papel de boa qualidade, de forma bem apresentável e com redação clara e objetiva, sem erros de ortografia. Igualmente relevante é a presença de detalhes técnicos que possam facilitar a interpretação dos resultados.

Este estudo tem como objetivo identificar os atributos mais importantes e conhecer o perfil dos consumidores dos laboratórios clínicos para que os empresários desse setor possam oferecer serviços de melhor qualidade e, conseqüentemente, aumentar a fidelidade dos clientes — estratégia necessária para sobreviver nesse mercado altamente competitivo.

METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada com clientes de um laboratório privado não-hospitalar — Laboratório Bioclínico Ltda. —, localizado na cidade de Campo Grande, MS, que atua no setor de análises clínicas há 28 anos e atende em média 230 clientes por dia.

Os atributos pesquisados se associavam às cinco dimensões que determinam a qualidade em serviços, com base na teoria apresentada na seção anterior.

Os questionários, em número de 2 000, foram entregues aos clientes no momento do cadastro na recepção, solicitando-se que fossem devolvidos quando da retirada dos resultados dos exames.

Nos questionários constavam 16 atributos (Tabela 1). Para medir o grau de sua importância, foram oferecidas as seguintes alternativas: 'essencial', 'muito importante', 'importante', 'pouco importante' e 'irrelevante'.

A pesquisa foi realizada no período de 10 a 24 de outubro de 2003. Com os resultados, foi calculada a média baseada em tabulação ponderada — escala Likert (Samara & Barros, 2002). Foi atribuído peso 2 à alternativa 'essencial', 1 à 'muito importante', 0 à 'importante', -1 à 'pouco importante' e -2 à 'irrelevante'. A frequência de cada alternativa (f) foi multiplicada por seu peso (p) para se obter o produto (fp). A soma dos produtos das alternativas foi dividida pela soma das frequências das alternativas, de modo a se obter a média. A média mais alta foi considerada como o atributo de melhor avaliação.

RESULTADOS

Dos 2 000 questionários distribuídos no momento do cadastro do cliente no laboratório, foram devolvidos 879, quando os resultados dos exames foram retirados no laboratório.

Destes, 609 estavam adequadamente preenchidos, o que correspondeu a 34,45% de respostas.

Com relação à amostra, os clientes que responderam os questionários apresentaram os seguintes perfis: 20,9% tinham mais de 60 anos de idade; 35,5% pertenciam à faixa etária de 41 a 60 anos; 32,1%, à de 21 a 40 anos; 11,4%, à de 0 a 20 anos. Os questionários dos clientes menores de 18 anos foram respondidos pelos acompanhantes. Segundo dados coletados internamente pelo laboratório em estudo, os clientes que mais realizam exames laboratoriais estão na faixa etária de 41 a 60 anos e os que menos os realizam estão na de 0 a 20 anos. Verificou-se que 36,4% dos respondentes eram do sexo masculino e 63,6% do feminino. Do total dos respondentes, 25,5% estavam realizando exames pela primeira vez nesse laboratório, enquanto 76,5% já haviam realizado exames ali mais de uma vez. Verificou-se também que 80,4% dos respondentes realizaram exames através do plano de saúde Unimed, 15,1% através de outros planos e apenas 4,5% pagaram por eles individualmente. Com os dados obtidos, calculou-se a média por tabulação ponderada — escala Likert (Samara & Barros, 2002) — do grau de importância dado pelos usuários a cada atributo na preferência de um laboratório clínico. A Tabela 1 e a Figura 1 apresentam os atributos mais valorizados pelos clientes do laboratório clínico em estudo.

Tabela 1
Importância dos atributos na escolha de um laboratório clínico

Atributos	Média
1 Higiene e limpeza do laboratório	1,73
2 Confiabilidade dos resultados	1,72
3 Certificado de qualidade laboratorial	1,42
4 Acerto da veia na primeira tentativa de coleta	1,38
5 Conferência da identificação da amostra biológica pelo paciente	1,36
6 Entrega de resultado pontualmente, na hora marcada	1,35
7 Atendimento rápido	1,23
8 Atendimento especial para pessoas da melhor idade (> 60 anos)	1,22
9 Atendentes bem apresentáveis e simpáticos	1,12
10 Atendimento especial para crianças	1,06
11 Estacionamento amplo e de fácil acesso	0,69
12 Coleta em domicílio	0,56
13 Ambiente bem decorado e agradável	0,46
14 Café da manhã reforçado após a coleta	0,39
15 Localização do laboratório próximo à residência	0,23
16 Entrega de resultado via internet	0,08

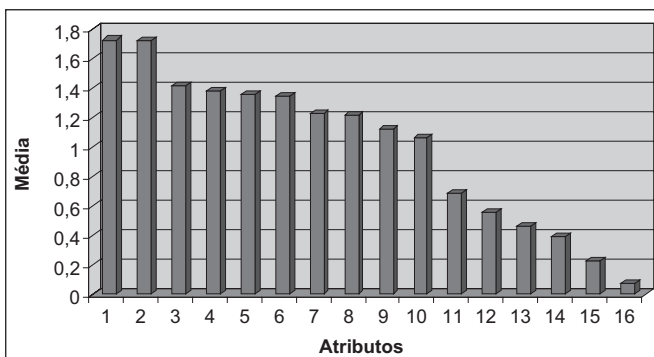


Figura 1: Importância dos atributos na escolha de um laboratório clínico: (1) higiene e limpeza do laboratório; (2) confiabilidade dos resultados; (3) certificado de qualidade laboratorial; (4) acerto da veia na primeira tentativa de coleta; (5) conferência da identificação da amostra biológica pelo paciente; (6) entrega de resultado pontualmente, na hora marcada; (7) atendimento rápido; (8) atendimento especial para pessoas da melhor idade (> 60 anos); (9) atendentes apresentáveis e simpáticos; (10) atendimento especial para crianças; (11) estacionamento amplo e de fácil acesso; (12), coleta em domicílio; (13), ambiente bem decorado e agradável; (14) café da manhã reforçado após a coleta; (15) localização do laboratório próximo à residência; (16) entrega de resultado via internet.

Da mesma forma, foram realizados cálculos da média dos clientes que responderam os questionários após serem segmentados por sexo, uma vez que as mulheres constituem 63,6% da clientela do laboratório pesquisado. Por essa razão, é interessante conhecer as preferências desse segmento na escolha de um laboratório clínico. Os resultados desse cálculo são apresentados na Tabela 2 e na Figura 2.

Tabela II
Importância dos atributos na escolha de um laboratório clínico, por sexo

Atributos	Média	
	Masc.	Fem.
1 Higiene e limpeza do laboratório	1,73	1,73
2 Confiabilidade dos resultados	1,7	1,74
3 Certificado de qualidade laboratorial	1,36	1,45
4 Acerto da veia na primeira tentativa de coleta	1,36	1,4
5 Conferência da Identificação da amostra biológica pelo paciente	1,27	1,41
6 Entrega de resultado pontualmente, na hora marcada	1,26	1,41
7 Atendimento rápido	1,19	1,32
8 Atendimento especial para pessoas da melhor idade (> 60 anos)	1,2	1,25
9 Atendentes bem apresentáveis e simpáticos	1,18	1,08
10 Atendimento especial para crianças	0,95	1,12
11 Estacionamento amplo e de fácil acesso	0,65	0,72
12 Coleta em domicílio	0,55	0,57
13 Ambiente bem decorado e agradável	0,45	0,46
14 Café da manhã reforçado após a coleta	0,25	0,47
15 Localização do laboratório próximo à residência	0,29	0,2
16 Entrega de resultado via internet	0,02	0,12

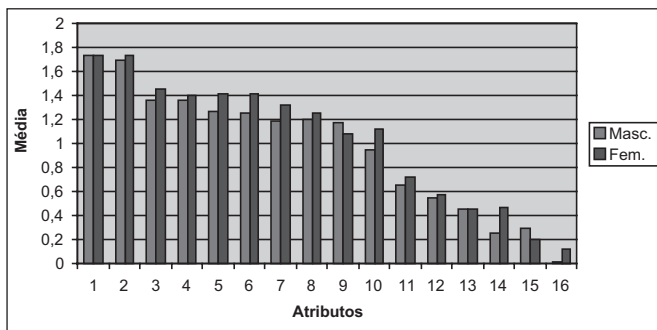


Figura 2: Importância dos atributos na escolha de um laboratório clínico, por sexo. (1) higiene e limpeza do laboratório; (2) confiabilidade dos resultados; (3) certificado de qualidade laboratorial; (4) acerto da veia na primeira tentativa de coleta; (5) conferência da identificação da amostra biológica pelo paciente; (6) entrega de resultado pontualmente, na hora marcada; (7) atendimento rápido; (8) atendimento especial para pessoas da melhor idade (> 60 anos); (9) atendentes apresentáveis e simpáticos; (10) atendimento especial para crianças; (11) estacionamento amplo e de fácil acesso; (12), coleta em domicílio; (13), ambiente bem decorado e agradável; (14) café da manhã reforçado após a coleta; (15) localização do laboratório próximo à residência; (16) entrega de resultado via internet.

Pelo fato de que, com o avanço da idade, o grau de importância dado a cada atributo pode ser alterado, realizou-se o cálculo da média através da tabulação ponderada (escala Likert) por faixa etária dos clientes. Os resultados são apresentados na Tabela 3 e na Figura 3.

Tabela III
Importância dos atributos na escolha de um laboratório clínico, por faixa etária

Atributos	Média			
	Idade em anos			
	0-20	21-40	41-60	>60
1 Higiene e limpeza do laboratório	1,77	1,76	1,7	1,71
2 Confiabilidade dos resultados	1,77	1,76	1,7	1,68
3 Certificado de qualidade laboratorial	1,54	1,48	1,41	1,25
4 Acerto da veia na primeira tentativa de coleta	1,39	1,38	1,39	1,4
5 Conferência da Identificação da amostra biológica pelo paciente	1,56	1,43	1,27	1,27
6 Entrega de resultado pontualmente, na hora marcada	1,43	1,47	1,31	1,23
7 Atendimento rápido	1,2	1,36	1,22	1,27
8 Atendimento especial para pessoas da melhor idade (> 60 anos)	1,26	1,26	1,23	1,17
9 Atendentes bem apresentáveis e simpáticos	1,03	1,2	1,1	1,2
10 Atendimento especial para crianças	1,2	1,14	0,97	1,0
11 Estacionamento amplo e de fácil acesso	0,54	0,77	0,71	0,63
12 Coleta em domicílio	0,63	0,62	0,5	0,55
13 Ambiente bem decorado e agradável	0,39	0,43	0,47	0,52
14 Café da manhã reforçado após a coleta	0,56	0,39	0,41	0,28
15 Localização do laboratório próximo à residência	0,09	0,14	0,31	0,34
16 Entrega de resultado via internet	-0,03	0,13	0,08	0,06

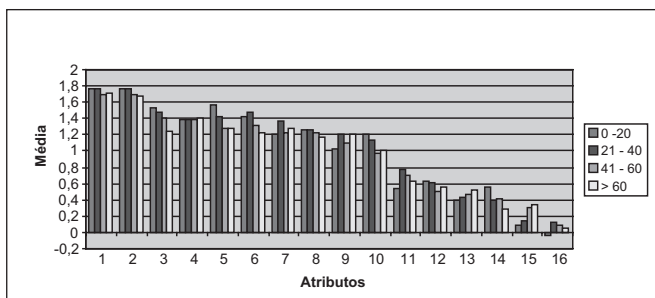


Figura 3: Importância dos atributos de qualidade na escolha de um laboratório clínico, por faixa etária. (1) higiene e limpeza do laboratório; (2) confiabilidade dos resultados; (3) certificado de qualidade laboratorial; (4) acerto da veia na primeira tentativa de coleta; (5) conferência da identificação da amostra biológica pelo paciente; (6) entrega de resultado pontualmente, na hora marcada; (7) atendimento rápido; (8) atendimento especial para pessoas da melhor idade (> 60 anos); (9) atendentes apresentáveis e simpáticos; (10) atendimento especial para crianças; (11) estacionamento amplo e de fácil acesso; (12), coleta em domicílio; (13), ambiente bem decorado e agradável; (14) café da manhã reforçado após a coleta; (15) localização do laboratório próximo à residência; (16) entrega de resultado via internet.

Na presente pesquisa, dentre os cinco determinantes considerados, a confiabilidade revelou-se o elemento crucial na percepção da qualidade dos serviços. No caso específico dos serviços laboratoriais, a confiabilidade, associada à segurança, constitui o fator mais importante para a qualidade dos serviços e, conseqüentemente, para a satisfação dos clientes. Os resultados da avaliação dos quatro atributos que se relacionam com esses dois determinantes da qualidade são apresentados na Tabela 4 e na Figura 4.

Tabela IV
Atributos relacionados com a confiabilidade e com a segurança, na escolha de um laboratório clínico

Atributos	Média
1 Confiabilidade dos resultados	1,72
2 Certificado de qualidade laboratorial	1,42
3 Acerto da veia na primeira tentativa	1,38
4 Conferência da identificação da amostra biológica	1,36

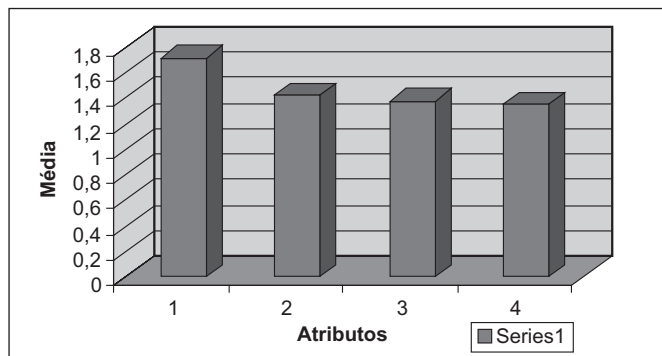


Figura 4: Avaliação dos atributos relacionados com a confiabilidade e com a segurança, na escolha de um laboratório clínico. (1) confiabilidade dos resultados; (2) certificado de qualidade laboratorial; (3) acerto da veia na primeira tentativa de coleta; (4) conferência da identificação da amostra biológica.

Capacidade de resposta é outro determinante da qualidade em serviços que tem importância para a satisfação do cliente, pois diz respeito ao atendimento de suas necessidades de forma receptiva e ágil. Por essa razão, foi realizada uma análise para conhecer os atributos que se relacionam com essa dimensão e que receberam melhor avaliação pelos clientes. Os resultados dessa análise estão mostrados na Tabela 5 e na Figura 5.

Tabela V
Atributos relacionados com a capacidade de resposta, na escolha de um laboratório clínico

Atributos	Média
1 Entrega de resultados pontualmente, na hora marcada	1,35
2 Atendimento rápido	1,23
3 Atendimento especial para pessoas na melhor idade (> 60 anos)	1,22
4 Atendimento especial para crianças	1,06
5 Coleta em domicílio	0,56
6 Entrega de resultados via internet	0,08

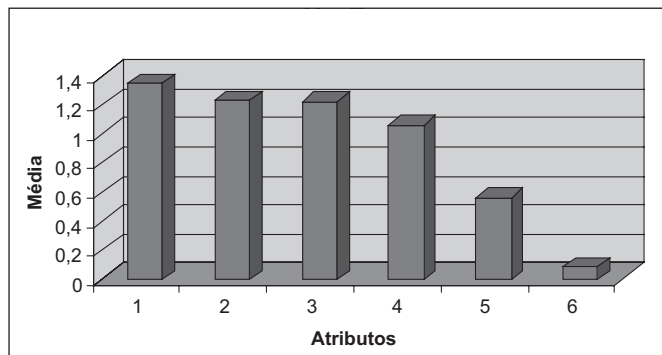


Figura 5. Importância dos atributos relacionados com a responsividade, na escolha do laboratório clínico. (1) entrega dos resultados pontualmente, na hora marcada; (2) atendimento rápido; (3) atendimento especial para pessoas da melhor idade (> 60 anos); (4) atendimento especial para crianças; (5) coleta em domicílio; (6) entrega de resultados via internet.

A intangibilidade se refere ao fato de que os clientes não podem ver, manusear ou testar os serviços, diferentemente do que ocorre com produtos. Para reduzirem suas incertezas, os clientes procuram evidências físicas que lhes permitam avaliar a qualidade desses serviços. Nesta pesquisa, foram analisados os atributos associados aos elementos tangíveis, e os resultados são mostrados na Tabela 6 e na Figura 6.

Tabela VI
Atributos relacionados com a tangibilidade, na escolha de um laboratório clínico

Atributos	Média
1 Higiene e limpeza do laboratório	1,73
2 Estacionamento amplo e de fácil acesso	0,69
3 Localização do laboratório próximo da residência	0,23

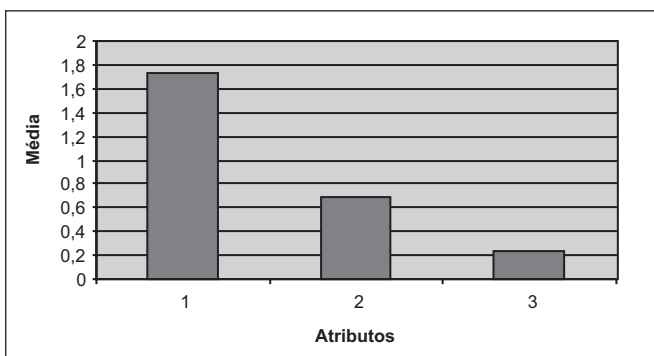


Figura 6. Atributos relacionados com a tangibilidade mais valorizados pelos clientes na escolha de um laboratório clínico. (1) higiene e limpeza do laboratório; (2) estacionamento amplo e de fácil acesso; (3) localização do laboratório próximo da residência.

Para estabelecimento de empatia é importante que o cliente se sinta uma pessoa muito especial e valorizada, e que se sinta bem no ambiente do serviço.

Pelo fato de a empatia ser uma dimensão determinante da qualidade em serviços, segundo Parasuraman (1988), foi realizada uma avaliação dos atributos relacionada com essa dimensão. Os resultados dessa avaliação são mostrados na Tabela 7 e na Figura 7.

Tabela VII
Atributos relacionados com a empatia, na escolha de um laboratório clínico

Atributos	Média
1 Atendentes bem apresentáveis e simpáticos	1,12
2 Ambiente bem decorado e agradável	0,46
3 Café da manhã reforçado após a coleta	0,39

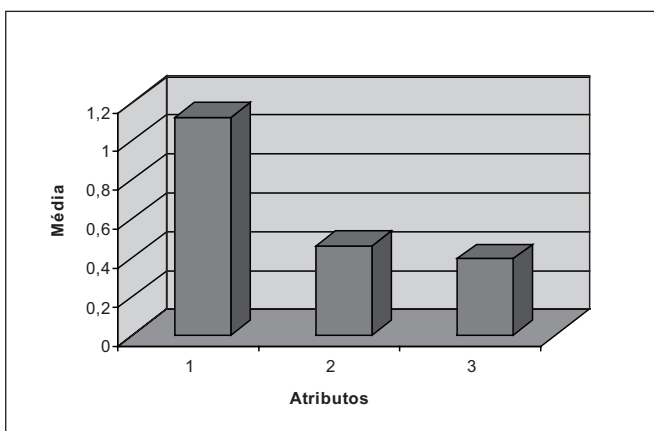


Figura 7: Importância dos atributos relacionados com a empatia, na escolha de um laboratório clínico. (1) atendentes bem apresentáveis e simpáticos; (2) ambiente bem decorado e agradável; (3) café da manhã reforçado após a coleta.

DISCUSSÃO

Basicamente, quando os clientes contratam serviços laboratoriais, avaliam a qualidade dos resultados e a qualidade do processo, ou seja, se o desempenho analítico está compatível com os dados clínicos e se o processo de interação entre cliente e pessoal do laboratório foi o mais agradável possível.

Assim sendo, os atributos relacionados com as cinco dimensões da qualidade (Parasuraman, Zeithaml & Berry, 1985) podem alcançar a qualidade percebida nos serviços e gerar a satisfação do cliente. Segundo os estudos de Heskett *et al.* (*apud* Zeithaml & Bitner, 2003), há uma grande correlação entre satisfação e fidelidade dos clientes — o que as empresas buscam para conquista do sucesso ou para a própria sobrevivência. Essa associação é tanto mais positiva quando maior seja a satisfação. Portanto, a qualidade é a maior fonte de vantagem competitiva em uma empresa.

Dentre os 16 atributos estudados, relacionados com as cinco dimensões da qualidade, os seis que apresentaram a melhor avaliação foram, em ordem decrescente: higiene e limpeza do laboratório (1,73), confiabilidade dos resultados (1,72), certificado de qualidade laboratorial (1,42), acerto da veia na primeira tentativa de coleta (1,38), conferência da identificação da amostra biológica pelo paciente (1,36) e entrega de exames pontualmente, na hora marcada (1,35) (Tabela 1). O fato de que a maioria da clientela do laboratório em estudo pertence às classes sociais A e B, que são mais exigentes, e o fato de que a higiene e limpeza das instalações, como um todo, conotarem organização, ambientes menos contaminados e mais agradáveis, provavelmente constituíram os fatores que mais contribuíram para que esse atributo fosse o mais valorizado. É interessante ressaltar que nenhuma vez a higiene e limpeza do laboratório foram mencionadas na caixa de sugestões e reclamações e nem mesmo nas pesquisas periódicas sobre qualidade realizadas nesse laboratório. Higiene e limpeza impecáveis são procedimentos relativamente pouco onerosos e de fácil implementação num laboratório clínico, com relação custo-benefício bastante favorável. Aplica-se aqui o conceito, bastante disseminado, de que “limpeza ninguém percebe; apenas sujeira”.

Embora Kotler (2002) considere a confiabilidade como a dimensão mais importante da qualidade, a presente pesquisa a revelou como a segunda mais destacada (média 1,72), apesar da diferença muito pequena em relação à dimensão de maior destaque (higiene e limpeza, com média de 1,73). Pelo fato de a confiabilidade ser um determinante de qualidade muito importante, principalmente no setor de laboratórios clínicos, é fundamental implementar um sistema da qualidade que monitore as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. Resultados de exames laboratoriais precisos e exatos são essenciais para um diagnóstico correto ou para monitorar a eficácia de um tratamento médico. Para que o desempenho analítico seja satisfatório, é importante que o laboratório seja acreditado por um sistema da qualidade (DICQ e/ou PALC e/ou CAP). A acreditação do laboratório não só melhora o desempenho analítico; seu certificado, exposto em um recinto do laboratório, inspira maior segurança na prestação dos serviços laboratoriais. A certificação da qualidade laboratorial é um procedimento tão importante que os clientes em estudo a apontaram como o terceiro atributo mais importante na escolha de um laboratório clínico. A valorização desse atributo, sugere que os clientes já estão bem conscientes da importância da certificação ou acreditação de laboratórios.

A Tabela 1 mostra que o acerto da veia na primeira tenta-

tiva de coleta foi o quarto atributo mais destacado, o que indica que a presença de uma equipe de flebotomistas com grande habilidade pode constituir um grande diferencial na satisfação dos clientes. Os integrantes dessa equipe devem não apenas ser contratados com base em boa experiência e num rigoroso critério de seleção, mas devem periodicamente passar por treinamentos adicionais.

A conferência da identificação da amostra biológica foi o quinto atributo mais apontado. Sua importância se deve à possibilidade de ocorrência de erro na identificação da amostra biológica, o que pode gerar incerteza, pelo cliente, na contratação de um serviço laboratorial. A identificação da amostra biológica através de código de barras e a conferência da identificação pelo próprio cliente poderão colaborar para inspirar-lhe maior segurança.

A entrega pontual do resultado do exame, na hora marcada, foi um atributo que também recebeu destaque, provavelmente por representar o cumprimento da promessa de entrega de um serviço contratado. É importante, desse modo, haver um indicador de qualidade que permita avaliar todo o processo envolvido no cumprimento da entrega de resultado dos exames no horário combinado.

A demora no atendimento é um problema que sempre tem causado desconforto aos clientes na recepção de um laboratório clínico. O cliente pode tolerar essa demora até um certo limite, dependendo de seu estado emocional e situacional. É conveniente que cada laboratório monitore constantemente o tempo médio de atendimento e satisfação dos clientes. A agilidade no atendimento é importante, mas não pode deixar de seguir procedimentos que transmitam segurança e organização e que evitem erros e prejuízos ao laboratório.

O item pesquisado que se refere ao atendimento especial para pessoas com mais de 60 anos teve uma avaliação melhor do que o que se refere a crianças, provavelmente devido ao aumento considerável da população idosa e ao reconhecimento de seu valor pela sociedade. Esses dados são importantes porque sugerem que o investimento nos idosos é mais rentável que aquele feito com a clientela infantil, uma vez que a população com mais de 60 anos constitui no laboratório estudado 20,9% da clientela, enquanto a de 13 anos perfaz 6,5%. Além disso, os primeiros realizam em média o dobro de exames, em comparação com os usuários de 0 a 13 anos.

A disponibilidade de estacionamento amplo e de fácil acesso foi pouco apontada na preferência de um laboratório clínico pelos respondentes, talvez porque Campo Grande, MS, cidade com 700 mil habitantes, ainda não apresente problemas sérios de congestionamento de trânsito e de falta de estacionamento. Esse atributo pode ser muito valorizado em laboratórios localizados em cidades mais populosas, onde o espaço para estacionamento é cada vez mais raro e oneroso.

De acordo com a análise das informações encontradas na caixa de sugestões e de reclamações do laboratório estudado, a principal reivindicação dos clientes é a melhoria no café da manhã. No entanto, a pesquisa não revelou ser esse um atributo muito valorizado. Segundo a pesquisa interna realizada pelo laboratório, apenas 40% dos clientes utilizam o serviço da copa do laboratório. Nas cidades de maior porte, onde a distância entre a residência e o laboratório é grande, este item pode, porém, tornar-se muito relevante. É conveniente, portanto, que cada laboratório faça sua própria pesquisa, a fim de identificar a relação custo-benefício antes de proceder a um investimento maior para oferecer um café matinal de melhor qualidade.

O atributo referente à localização próxima à residência não foi levado em grande consideração pelos respondentes. Pode-se considerar que isso se deva ao fato de a cidade não oferecer grandes dificuldades para locomoção. Torna-se fundamental, assim, realizar uma pesquisa antes da instalação de outra unidade de atendimento, para esclarecer se o investimento apresentará um retorno financeiro satisfatório e se a localização da nova unidade é a mais adequada possível.

Quando os clientes foram segmentados por sexo e faixa etária, as diferenças verificadas no grau de importância entre os atributos estudados foram pequenas.

Os atributos que tiveram as piores avaliações, em ordem decrescente, foram: entrega de resultado via internet (0,08), localização do laboratório próxima da residência (0,23), café da manhã reforçado após a coleta (0,35), ambiente bem decorado e agradável (0,46) e coleta em domicílio (0,56).

Este estudo mostrou que, com exceção da higiene e limpeza, que teve a melhor avaliação, os atributos relacionados com a confiabilidade e segurança e, a seguir, com a responsividade determinam a qualidade em serviços laboratoriais, como mostram as Tabelas 4, 5, 6 e 7. Além disso, pode-se supor que o investimento em clientes da melhor idade (com mais de 60 anos) parece ser mais vantajoso no caso do laboratório estudado, já que esse atributo foi mais valorizado do que o atendimento especial para crianças.

Vale ressaltar que os resultados desta pesquisa poderão diferir dos encontrados em outros laboratórios, uma vez que o perfil da clientela de laboratórios pode apresentar grande variação de uma região para outra.

REFERÊNCIAS

1. Grönroos, C. Marketing: Gerenciamento e Serviços. Rio de Janeiro: Campus, 1993, p.51.
2. Heskett, J.L.; Sasser, W.E.; Hart, C.W.L. Serviços revolucionários. São Paulo: Pioneira, 1994. p. 104.
3. Kotler, P.; Hyes, T.; Bloom, P.N. Marketing de serviços profissionais. 2. ed. Barueri: Manole, 2002. p. 54.
4. Parasuraman, A.; Zeithaml, V.A.; Berry L.L. A conceptual model of service quality and its implications for future research. *Journal of Marketing*, v. 49, p. 41 -50, 1985.
5. Parasuraman, A.; Zeithaml, V.A.; Berry L.L. SERVQUAL: A multiple-item scale for measuring consumer perceptions of service quality. *Journal of Retailing*, v. 64, p. 23, 1988.
6. Rojo, F.J.G. O comportamento do consumidor nos supermercados. *RAE – Revista de Administração de Empresas*, v. 38, n. 3, p. 16-24, 1998.
7. Samara, B.S.; Barros, J.C. Pesquisa de marketing: conceitos e metodologia. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2002. p. 104.
8. Zeithaml, A.V.; Bitner M.J. Marketing de serviços: a empresa com foco no cliente. 2. ed. São Paulo: Bookman, 2003. p. 30.
9. Zeithaml, A.V.; Berry, I.I.; Parasuraman, A. The nature and determinants customer expectations of service. Cambridge, USA: Marketing Science Institute, 1991

Endereço para correspondência:

Tatsuya Sakuma

Rua 7 de setembro, 1173

Campo Grande, MS 79002-130

E-mail: bioclinico@zaz.com.br

XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas VI Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

04 a 08 de junho de 2006

Local:
Estação Embratel Convention Center - Curitiba - PR

Promoção e Realização

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Viabilidade celular de linfócitos como auxiliar na Instituição da Terapia Antirretroviral na Infecção pelo HIV-1

Cellular viability of lymphocytes as an auxiliary for the Institution of Antiretroviral Therapy in the Human Immunodeficiency Virus infection

G.L. Baggio¹; J.C. Verdi²; A. Treitinger¹; J. Cunha¹; S.I.A.C.P. Ferreira³ & C. Spada¹

RESUMO - A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) está associada à diminuição progressiva do número de linfócitos T CD4. Além do comprometimento na produção das células T CD4, os altos níveis de apoptose verificados nesses pacientes também são responsáveis pela depleção dessas células. O objetivo deste trabalho foi mostrar a importância da avaliação da viabilidade celular de linfócitos como auxiliar no monitoramento da infecção pelo HIV. Participaram deste estudo 18 voluntários HIV soropositivos com contagem de linfócitos CD4 ≤ 200 células/mm³ e 14 voluntários HIV soropositivos com contagem de linfócitos CD4 ≥ 200 células/mm³. O ensaio de viabilidade celular foi realizado em citômetro de fluxo, modelo FACScallibur™. A avaliação da viabilidade celular demonstrou níveis elevados de apoptose nos pacientes HIV soropositivos com contagem de linfócitos CD4 ≤ 200 células/mm³ (64,21% $\pm$ 15,26), assim como nos pacientes HIV soropositivos com contagem de linfócitos CD4 ≥ 200 células/mm³ (62,63% $\pm$ 21,08). Considerando os altos níveis de apoptose verificados nos pacientes HIV soropositivos, a avaliação da viabilidade celular associada à contagem de células CD4 pode contribuir para o monitoramento da infecção e auxiliar na tomada de decisões à respeito de quando se deve instituir a terapia antirretroviral.

PALAVRAS-CHAVE - terapia antirretroviral, viabilidade celular, HIV, AIDS, linfócitos T CD4.

SUMMARY - Infection with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) is associated with a progressive decrease in CD4 T cell count. Besides T cell production is impaired, the high levels of apoptosis verified in those patients are also responsible for the depletion of T CD4 lymphocytes. The aim of this study was to show the importance of the evaluation of cellular viability of lymphocytes in the accompaniment of HIV infection. Eighteen HIV seropositive subjects with T CD4-cell count ≤ 200 cells per mm³ and fourteen HIV seropositive volunteers with T CD4-cell count ≥ 200 cells per mm³, participated in this study. The cellular viability assay was performed using a FACScallibur™ flow cytometer. Cellular viability assay demonstrated increased levels of apoptosis in the seropositive patients with T CD4-cell count ≤ 200 cells per mm³ (64,21% $\pm$ 15,26), as well in the patients with T CD4-cell count ≥ 200 cells per mm³ (62,63% $\pm$ 21,08). Considering the high levels of apoptosis verified in the HIV seropositive patients, cellular viability assay associated with T CD4-cell count can contribute to monitor HIV infection and help to decide the appropriate moment to institute anti-retroviral therapy.

KEYWORDS - antiretroviral therapy, cellular viability, HIV, AIDS, T CD4 lymphocytes.

INTRODUÇÃO

Os pacientes HIV soropositivos, em estágios avançados da infecção, apresentam alterações qualitativas e quantitativas nas células T, com diminuição na contagem de linfócitos T CD4 e inversão da relação CD4/CD8^[5]. Além do comprometimento na produção das células T CD4^[7], existem evidências de que a depleção das células T periféricas se deve aos altos níveis de apoptose verificados nos pacientes infectados pelo HIV^[12].

A contagem de células T CD4 é um dos marcadores mais utilizados no monitoramento da infecção pelo HIV e, juntamente com a Carga Viral, é fundamental na tomada de decisões quanto ao momento em que se deve instituir a terapia antirretroviral (TARV)^[17]. Embora nenhuma terapêutica seja curativa, o surgimento dos antirretrovirais, bem como o uso de profilaxia para infecções oportunistas na prática clínica, melhorou significativamente a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes HIV soropositivos^[11].

O principal objetivo da TARV é a reconstituição do sistema imunológico, o que exige a efetiva inibição da replicação viral e o restabelecimento numérico e funcional dos linfócitos T CD4. Portanto, definir o momento em que se deve iniciar a TARV é uma das mais importantes decisões a serem tomadas no acompanhamento do paciente HIV soropositivo, sendo que em princípio, a terapia deve ser iniciada

antes de ocorrer dano irreversível ao sistema imunológico^[13].

Atualmente, o Ministério da Saúde preconiza o tratamento antirretroviral para todos os pacientes infectados pelo HIV, sintomáticos ou assintomáticos, que apresentam contagem de linfócitos T CD4 inferior ou igual a 200 células/mm³^[17]. Segundo o Ministério da Saúde, a terapia precoce deve ser evitada, pois pode ser responsável pela limitação de opções para alteração de tratamento em caso de intolerância à medicação, desenvolvimento de resistência e falha terapêutica, além dos efeitos colaterais associados ao uso prolongado dos antirretrovirais^[17].

A administração da TARV leva à supressão da replicação viral e conseqüente aumento da contagem de linfócitos T CD4, o que se deve em grande parte ao aumento da viabilidade celular^[12]. A diminuição dos níveis de apoptose em pacientes HIV soropositivos em uso de TARV pode ser decorrente da diminuição da ativação imune mediada pelo HIV e suas proteínas, bem como pelo próprio efeito anti-apoptótico de alguns antirretrovirais^[9, 12, 15].

A ativação imune crônica é o mecanismo primário responsável pela morte de células T em pacientes HIV soropositivos^[12] e envolve a produção aumentada de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α . Estas citocinas estimulam a replicação viral contribuindo diretamente para a patogênese do HIV e progressão para AIDS^[4]. Uma vez ativadas, as células T ex-

Recebido em 15/10/2004

Aprovado em 04/02/2005

¹Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC; ²Centro de Saúde II - Florianópolis -SC; ³ Laboratório Médico Santa Luzia - SC

pressam receptores que sinalizam à apoptose, sendo Fas (CD95/APO-1) e TNFR-1 (Receptor-1 para o Fator de Necrose Tumoral) os mais bem caracterizados atualmente^[2]. Estes receptores se ligam às proteínas sinalizadoras Fas-L e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α), respectivamente; essa ligação induz a trimerização do receptor e recrutamento dos domínios de morte intracelulares com ativação das caspases e conseqüente morte celular^[14]. As células não comprometidas de pacientes HIV soropositivos e células infectadas pelo HIV *in vivo* e *in vitro*, apresentam aumento da expressão do CD95 na membrana celular e maior susceptibilidade à apoptose via Fas/FasL^[22].

A introdução da TARV induz a diminuição da produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8 além da diminuição da expressão de marcadores de ativação celular, como CD95 e CD95L, tanto nas células T CD4 quanto nas células T CD8 e conseqüentemente diminuição da apoptose via Fas/FasL^[1,9]. Dentre os medicamentos antirretrovirais utilizados, os inibidores da enzima protease diminuem os níveis de apoptose em decorrência da inibição da expressão das caspases 1 e 3 e por induzirem aumento da expressão do gene antiapoptótico Bcl-2^[12].

Associados à ativação imune crônica, outros mecanismos estão envolvidos no aumento dos níveis de apoptose de linfócitos na infecção pelo HIV. As células infectadas pelo HIV tornam-se alvo para os linfócitos T citotóxicos que liberam perforina, uma proteína que abre canais na membrana plasmática, por onde entra a granzima B, uma serino protease que ativa diretamente as caspases 3, 6 e 7, induzindo apoptose^[20,21].

Ao contrário de outros vírus patogênicos, como adenovírus, que desenvolveram mecanismos para evitar a apoptose e continuar a replicação viral^[3], o HIV não possui esta habilidade, suas proteínas virais gp120/gp41, Tat, Nef, Vpr, Vpu e a enzima protease podem promover a morte celular através de mecanismos que incluem a formação de sincícios, as vias receptor-ligante e citotoxicidade direta^[5,10,22]. Além disso, a replicação viral intensa com conseqüente rompimento da membrana celular e acúmulo de DNA não integrado, altera a homeostase celular ocasionando a morte da célula hospedeira^[2].

Apesar do número de células T infectadas pelo HIV ser reduzido, aproximadamente 0,01% do total de células mononucleares, a quantidade de células T CD4 que sofrem apoptose é avaliada em 2×10^9 células/dia, sendo que a elevada morte celular não é somente resultado do efeito citopático direto do vírus em células infectadas, mas principalmente, decorrente de mecanismos indiretos que levam à apoptose células não infectadas^[16].

Tendo em vista a diminuição progressiva da contagem de células T CD4 verificada nos pacientes HIV soropositivos, objetiva-se mostrar a importância da avaliação dos níveis de viabilidade celular de linfócitos, como ferramenta auxiliar no monitoramento da progressão da infecção pelo HIV e na tomada de decisões acerca do momento ideal para instituição da terapia antirretroviral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casística

Participaram deste estudo 18 voluntários HIV soropositivos, com contagem de linfócitos CD4 ≤ 200 células/mm³, com indicação para início de TARV e 14 voluntários HIV soropositivos com contagem de linfócitos CD4 ≥ 200 células/mm³, sem indicação para início da TARV, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde^[17],

provenientes do Centro de Saúde II - Prefeitura Municipal de Florianópolis. Os pacientes devidamente informados, após assinatura do termo de consentimento, foram encaminhados ao Hospital Universitário para coleta das amostras. A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Coleta de Material Biológico e Separação das Células Mononucleares

As amostras de 10 ml de sangue total foram coletadas em tubos contendo heparina. As células mononucleares foram isoladas com Ficoll-Paque® (*Sigma Chemical Company, USA*) e ressuspensas em meio RPMI 1640 (*Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA*), suplementadas com 10% de soro bovino fetal inativado, 10 μ g/ml de estreptomicina e 2,5 μ g/ml de anfotericina B e mantidas por 48 horas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂.

As células mantidas em cultura por 48 horas foram ressuspensas e transferidas para um tubo de citômetro e sedimentadas por centrifugação (1500 rpm/5 minutos); o sobrenadante foi desprezado com o auxílio de pipeta de Pasteur e as células ressuspensas em 200 μ l de solução corante (calceína 1 μ M, EthD-1 8 μ M em solução de PBS pH 7,4) e mantidas em repouso ao abrigo da luz por 15 minutos.

Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado em citômetro de fluxo modelo FACSCallibur (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, C.A., USA*), com o uso de dois programas próprios para análises imunofenotípicas, CELLQuest e PAINT A GATE, que permitem a aquisição das células mononucleares, a visualização da distribuição gráfica dos linfócitos corados, bem como a porcentagem de células viáveis, mortas e em apoptose.

O programa CELLQuest (Figura 1) permite a seleção das células de acordo com seu tamanho e granulosidade, excluindo-se as células maiores como os monócitos e células que apresentam granulações, como os segmentados remanescentes da separação com Ficoll-Paque®.

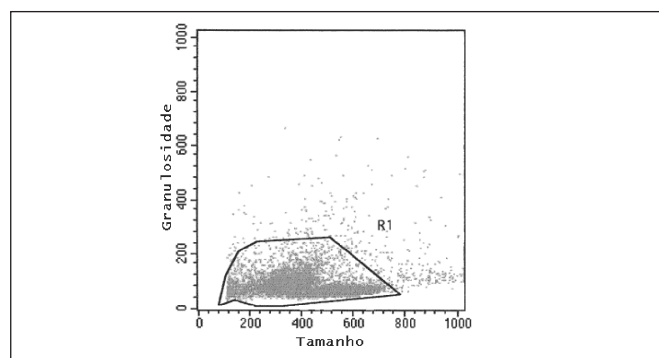


Figura 1: Seleção das células mononucleares no programa CELLQuest pelo tamanho e granulosidade.

No programa PAINT-A-GATE, pode-se observar três populações celulares distintas. As células viáveis que constituem o grupo de células do quadrante inferior direito, marcadas intensamente com calceína; as células inviáveis encontradas nos quadrantes superiores, intensamente marcadas com EthD-1 e uma população intermediária, localizada no quadrante inferior esquerdo, constituindo as células em apoptose (Figura 2).

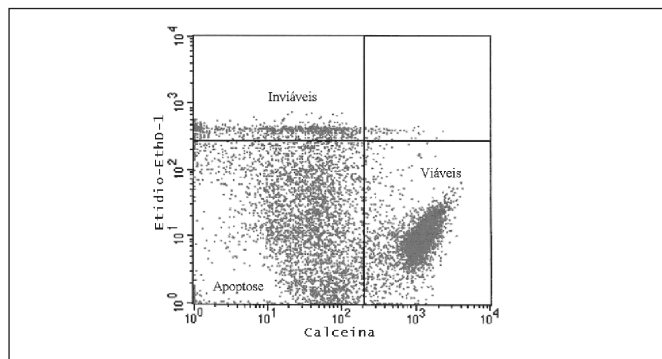


Figura 2: Visualização das três populações celulares de acordo com a emissão de fluorescência no programa CELLQuest.

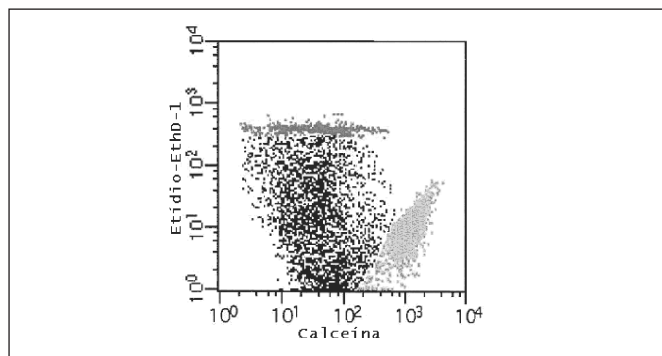


Figura 3: Visualização gráfica das células viáveis, mortas e em apoptose através do programa PAINT-A-GATE.

As células viáveis são permeáveis à calceína, que sofre ação enzimática de esterases celulares, convertendo-se em calceína intensamente fluorescente.

As células mortas sem atividade de esterases são permeáveis ao brometo de etídio, que se liga ao ácido nucléico emitindo fluorescência, sendo que as células em apoptose com pouca atividade de esterases e pouco permeáveis ao EthD-1 também emitem fluorescência.

Deste modo, as células viáveis emitem fluorescência verde, devido à calceína; as células mortas emitem fluorescência vermelha, em função do brometo de etídio, e as células em apoptose emitem um misto de fluorescência verde e vermelha (Figura 3).

Contagem de células T CD4

A contagem de linfócitos T CD4 foi realizada através de citômetro de fluxo modelo FACSCount™ (Becton Dickinson, USA), em amostras de sangue total, utilizando o conjunto reativo com anticorpos monoclonais anti CD4/CD3 (Becton Dickinson, San Jose, C.A., USA).

Determinação da carga Viral do HIV

A quantificação do RNA viral foi realizada por metodologia NASBA (Nucleic Acid Sequence-based Amplification) com o teste NucliSens HIV-1 QT, Organon Teknika BV (Boxtel, Nederland), onde o DNA é extraído, amplificado e quantificado por eletroquimiluminescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à viabilidade celular, contagem de células T CD4 e quantificação da carga viral (CV) são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

A CV e a contagem de células T CD4 são marcadores independentes da progressão da infecção pelo HIV e ambos devem ser considerados no momento do início da TARV.

No entanto, a contagem de linfócitos T CD4 reflete as condições do sistema imune, sendo mais importante como indicador da necessidade de início de tratamento^[11].

A avaliação da viabilidade de linfócitos circulantes realizada neste estudo demonstrou níveis elevados de apoptose nos pacientes HIV soropositivos com contagem de linfócitos CD4 ≤ 200 células/mm³ ($64,21\% \pm 15,26$), assim como nos pacientes HIV soropositivos com contagem de linfócitos CD4 ≥ 200 células/mm³ ($62,63\% \pm 21,08$). Considerando os elevados níveis de apoptose verificados nos testes de viabilidade celular, pode-se afirmar que nos pacientes HIV soropositivos a contagem de células T CD4 não está refletindo as verdadeiras condições do sistema imune, visto que as técnicas empregadas atualmente na rotina laboratorial fornecem o número total da população de células que expressa o marcador de superfície CD4, sem distinção entre células viáveis, inviáveis e em apoptose.

Tabela I

Porcentagem das células viáveis, mortas e em apoptose, contagem de células T CD4 e quantificação da carga viral (CV) em pacientes HIV soropositivos com indicação para início de TARV.

Paciente	Céls. viáveis (%)	Céls. Mortas (%)	Céls. apoptóticas (%)	CD4 (cél/mm ³)	CV Cópias/ml
1	12,72	5,78	81,5	45	110.000
2	4,48	4,07	91,45	64	310.000
3	34,9	4,59	60,51	88	170.000
4	25,73	3,5	70,77	41	63.000
5	20,6	19,76	59,64	123	64.000
6	5,94	16,79	77,27	124	100.000
7	23,83	8,11	68,06	190	190.000
8	30,73	2,74	66,53	45	110.000
9	33,77	12,02	54,21	166	2.700
10	5,08	6,70	88,22	74	140.000
11	24,79	1,60	73,61	115	19.000
12	34,61	2,95	62,44	196	31.000
13	56,72	2,26	41,02	171	97.000
14	45,58	4,82	49,60	152	16.000
15	53,02	2,08	44,9	56	25.000
16	30,69	9,06	60,25	189	130.000
17	54,92	3,42	41,66	160	310.000
18	53,35	1,71	44,94	146	360.000
Média	30,63	6,22	64,21	119,16	123.982
DP	17,19	5,21	15,26	54,96	110.755

Tabela II

Porcentagem das células viáveis, mortas e em apoptose, contagem de células T CD4 e quantificação da carga viral (CV) em pacientes HIV soropositivos sem indicação para início de TARV.

Paciente	Céls. viáveis (%)	Céls. Mortas (%)	Céls. apoptóticas (%)	CD4 (cél/mm ³)	CV Cópias/ml
1	47,12	5,17	47,71	247	22.000
2	53,04	2,89	44,07	369	90.000
3	4,19	11,17	84,64	201	84.000
4	61,71	1,62	36,67	206	29.000
5	2,54	1,99	95,47	449	55.000
6	32,5	6,85	60,65	342	170.000
7	53,03	4,89	42,08	321	58.000
8	25,03	7,09	67,88	268	200.000
9	15,82	7,19	76,99	366	25.000
10	13,05	2,07	84,88	291	48.000
11	55,55	6,23	38,22	446	72.000
12	9,86	3,56	86,58	420	110.000
13	26,47	1,36	72,17	471	80.000
14	52,54	8,53	38,93	298	55.000
Média	32,31	5,04	62,63	335,35	78.429
DP	21,12	2,95	21,08	89,24	52.104

O paciente 1 (Tabela 1) com contagem de células T CD4 de 45 células/mm³ e CV igual a 110.000 cópias/ml, apresenta 81,5% dessas células em apoptose; 12,72% das células T CD4 estão viáveis, ou seja, 6 células/mm³, demonstrando o grave comprometimento imune celular deste paciente. O mesmo ocorre com o paciente 6 (Tabela 1), com CV igual a 100.000 cópias, contagem de células T CD4 igual a 124 células/mm³ e portanto, indicação para início de TARV. O

teste de viabilidade celular deste paciente demonstra que dessas 124 células/mm³, apenas 5,94% estão viáveis, o que significa que este paciente apresenta 8 células/mm³ funcionais e sério comprometimento imune celular.

O paciente 17 (Tabela 1), também com indicação para início de TARV^[17], com CV igual a 310.000 cópias/ml e contagem de células T CD4 igual a 160 células/mm³, apresenta maior viabilidade celular, 54,92%, ou seja, 88 células/mm³ estão funcionais; apesar de apresentar CV elevada, este paciente poderá apresentar uma melhor resposta à TARV. De acordo com Autran^[1], a terapia antirretroviral efetiva pode suprimir a replicação viral, porém pode ser insuficiente para reconstituir o sistema imune de pacientes HIV soropositivos com contagens de linfócitos inferiores a 200 células/mm³.

O paciente 3 (Tabela 2) que apresenta uma contagem de células T CD4 de 201 células/mm³ e CV igual a 84.000 cópias/ml é um paciente sem indicação para início da TARV, de acordo com o Ministério da Saúde. No entanto, este paciente apresenta apenas 4,19% de viabilidade celular, 11,17% das suas células T CD4 estão mortas e 84,64% delas, em apoptose. Levando-se em consideração os dados de viabilidade celular, o paciente 3 apresenta somente 8 células T CD4/mm³, mostrando que neste paciente, a TARV deveria ter sido iniciada mais precocemente.

Em trabalhos anteriores verificou-se que as taxas de mortalidade dos pacientes HIV soropositivos são mais elevadas quando a TARV é iniciada com contagem de linfócitos T CD4 inferiores a 200 células/mm³, independente dos níveis de carga viral, uma vez que a restauração da resposta imune celular nos pacientes submetidos à TARV depende da preservação do microambiente onde essas células são produzidas^[6, 8, 13, 19]. Segundo Gallant^[11], pacientes com contagens de linfócitos abaixo desses níveis tendem a uma pior resposta à TARV e são mais susceptíveis aos efeitos colaterais provocados pelos antirretrovirais.

Analisando os dados do paciente 10 (Tabela 2) fica clara a importância da realização dos testes de viabilidade celular como auxiliar na tomada de decisões à respeito da instituição da TARV aos pacientes HIV soropositivos. Este paciente apresenta CV igual a 48.000 cópias/ml e contagem de células T CD4 igual a 291 células/mm³, contudo, apresenta apenas 13,05% de viabilidade celular. Considerando-se a viabilidade celular, este paciente apresenta uma contagem de células T CD4 de apenas 38 células/mm³ e portanto indicação para instituição da TARV.

A diminuição da viabilidade celular, decorrente da infecção pelo HIV, pode explicar o fato de que pacientes com contagens de linfócitos CD4 superiores a 200 células/mm³ apresentam sinais clínicos de comprometimento do sistema imune celular, visto que a maioria das infecções oportunistas e das neoplasias, características da AIDS, ocorrem quando os níveis destas células encontram-se abaixo de 200 células/mm³^[17]. Para o paciente 2 (Tabela 2) não haveria indicação para início de TARV, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde^[17], uma vez que a contagem de linfócitos T CD4 é superior a 200 células/mm³. Entretanto, das 369 células T CD4/mm³, apenas 53,04% estão viáveis, ou seja, 195 células/mm³. O mesmo ocorre com o paciente 5 (Tabela 2) que apresenta contagem de linfócitos CD4 igual a 449 células/mm³ e não apresenta indicação para início de TARV^[17]. O ensaio de viabilidade celular mostra que destas 449 células/mm³, 95,47% estão em apoptose e apenas 2,54% estão viáveis. Este paciente, portanto, apresenta contagem de linfócitos CD4 igual a 11,4 células/mm³, apresentando CV igual a 55.000

cópias/ml; neste caso, a TARV deveria ter sido iniciada mais precocemente, uma vez que a resposta ao tratamento é pior quanto maior o dano ao sistema imune.

Estes resultados demonstram que a instituição da TARV deve ser uma escolha clínica individualizada, considerando-se o conjunto de dados laboratoriais e clínicos, visto que a TARV ministrada em estágios muito avançados da doença é capaz de suprimir a replicação viral a níveis indetectáveis, porém, não é capaz de recuperar o sistema imune celular^[13].

Quando analisados em conjunto, esses dados demonstram que o HIV é capaz de induzir apoptose, com conseqüente diminuição da viabilidade celular, traduzida por níveis diminuídos de linfócitos T CD4 e progressão acelerada para AIDS.

CONCLUSÃO

Tendo em vista a diminuição da viabilidade celular, os pacientes HIV soropositivos apresentam maior comprometimento no sistema imune e conseqüentemente tornam-se mais susceptíveis a infecções oportunistas características da Aids. Neste contexto, a avaliação da viabilidade celular associada à contagem de células CD4 e quantificação da CV, torna-se uma ferramenta importante na avaliação das condições do sistema imune celular e progressão para Aids, podendo auxiliar na tomada de decisões à respeito do momento em que se deve instituir a TARV.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Médico Santa Luzia, pela viabilização do uso do citômetro de fluxo.

Aos médicos infectologistas do Ambulatório DST/AIDS de Florianópolis, pela triagem dos pacientes.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. AUTRAN, B., CARCELAINT, G., LI, T.S., GOROCHOV, G., BLANC, C., RE-NAUD, M., DURALI, M., MATHEZ, D., CALVEZ, V., LEIBOWITHC, J., KATLA-MA, C., DEBRÉ, P. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol. Lett.*, v. 66, p. 207-211, 1999.
2. BADLEY, A. D., PILON, A. A., LANDAY, A., LYNCH, D. H. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood*, v. 96, p. 2951-2964, 2000.
3. BENEDICT, C.A., BANKS, T., WARE, C.F. Death and survival: viral regulation of TNF- α signaling pathways. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 15, p. 59-65, 2003.
4. BREEN, E. C. Pro and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol. Therapeut.*, v. 95, p. 295-304, 2002.
5. CAGGIARI, L., ZANUSSI, S., BORTOLIN, M. T., D'ANDREA, M., NASTI, G., SIMONELLI, C., TIRELLI, U., DE PAOLI, P. Effects of therapy with highly active anti-retroviral therapy (HAART) and IL-2 on CD4+ and CD8+ lymphocyte apoptosis in HIV+ patients. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 120, p. 101-106, 2000.
6. CHEN, R., WESTFALL, A., CLOUD, G., CHATHAN, A., ACOSTA, E., RAPER, J., HEUDEBERT, G., SAAG, M. Long-term survival after initiation of antiretroviral therapy. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, 2001.
7. DOUCK, D.C., KOUPE, R.A., MCFARLAND, R.D., SULLIVAN, J.L., LUZURIAGA, K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J. Infect. Dis.*, v. 181, p. 1479-1482, 2000.
8. EGGER, M. Prognosis of HIV-1 infected drug naive patients starting potent antiretroviral therapy: multicohort analysis of 12.040 patients. *Viruses*, p. 16-19, 2001.
9. ENSOLI, F., FIORELLI, V., ALARIO, C., DE CRISTOFANO, M., MURATORI, D.S., NOVI, A., CUNSOLO, M.G., MAZZETTA, F., GIOVANNETTI, A., MOLLI-

- CONE, B., PINTER, E., AIUTI, F. Decreased T cell apoptosis and T cell recovery during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin. Immunol.*, p. 9-20, 2000.
- 10.FERRI, K.F., JACOTOT, E., BLANCO, J., ESTÉ, J. A., ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A., XIE, Z., BROTHERS, G., REED, J.C., PENNINGER, J. M., KROEMER, G. Apoptosis Control in Syncytia Induced by the HIV Type 1-Envelope Glycoprotein Complex: Role of Mitochondria and Caspases. *J. Exp. Med.*, v. 192, n.8, p. 1081-1092, 2000.
- 11.GALLANT, J.E. Initial Therapy of HIV Infection. *J. Clin. Virol.*, v. 25, p. 317-333, 2002.
- 12.GOUGEON, M.L. Apoptosis as an HIV strategy to scape immune attack. *Nature Rev. Immunol.*, v. 3, p. 392-404, 2003.
- 13.IMAMI, N., HARXY, G., BURTON, C., PIRES, A., PIDO-LOPEZ, J., MOSS, R., GAZZARD, B., GOTCH, F. Immune responses and reconstitution in HIV-1 infected individuals: impact of anti-retroviral therapy, cytokines and therapeutic vaccination. *Immunol. Lett.*, v. 79, p. 63-76, 2001.
- 14.KRAMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, v. 407, p. 789-795, 2000.
- 15.LEDRU, E., CHRISTEFF, N., PATRY, O., MELCHIOR, J-C., GOUGEON, M.L. Alteration of TNF- α homeostasis following potent antiretroviral therapy. *Blood*, v. 95, p. 3191-3198, 2000.
- 16.MAHLKNECHT, U., DENG, C., LU, M.C., GREENOUGH, T.C., SULLIVAN, J., O'BRIEN, W.A., HERBEIN, G. Resistance to apoptosis in HIV-infected T lymphocytes is mediated by macrophages: Role for nef and immune activation in viral persistence. *Am. Assoc. Immunol.*, v. 165, p. 6437-6446, 2000.
- 17.MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação nacional de DST/AIDS. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília, 2004.
- 18.PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., FAUCI, A.S. Mechanisms of Disease: The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England J. Med.*, v. 328, p. 327-335, 1993.
- 19.PING, Y., KOURTIS, A.P., KIRSCHNER, D.E. Reconstitution of thymic function in HIV-1 patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Clin. Immunol.*, v. 106, p. 95-105, 2003.
- 20.SHI, Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Nature*, v. 9, p. 459-470, 2002.
- 21.TRAMBAS, C.M., GRIFFITHS, G.M. Delivering the Kiss of death. *Nat. Immunol.*, v. 4, p. 399-403, 2003.
- 22.WU, M., DING, H. F., FISHER, D. E. Apoptosis: Molecular Mechanisms. *Nat. Immunol.*, 1999.

Endereço para Correspondência:
gio_baggio@ccs.ufsc.br
celso@ccs.ufsc.br



XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas VI Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

04 a 08 de junho de 2006

Local:
Estação Embratel Convention Center - Curitiba - PR

Promoção e Realização

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Prevalência de Enteroparasitoses em Escolares do Bairro Morro de Santana no Município de Ouro Preto, MG

Prevalence of intestinal parasitosis in students from public school in Morro de Santana, Ouro Preto, MG

Maria Ruth Gonçalves Gaede Carrillo; Angélica Alves Lima & Roney Luiz de Carvalho Nicolato

RESUMO – As parasitoses intestinais representam um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, onde as condições de higiene e saneamento básico são precárias. Considerando que as crianças são as mais atingidas, avaliamos neste trabalho, a prevalência de enteroparasitoses nos discentes das escolas municipais de educação infantil e ensino fundamental, situadas no bairro Morro de Santana em Ouro Preto, MG, no período de agosto a dezembro de 2000. No estudo foram realizados exames parasitológicos de fezes e hemogramas dos alunos na faixa etária de 4 a 16 anos. A análise das fezes revelou alto índice de parasitoses (53% de amostras positivas), com prevalência de *Ascaris lumbricoides*. Dentre os positivos, 49% eram monoparasitados, 41% biparasitados e 10% poliparasitados. Cerca de 4,5% dos alunos apresentaram anemia. Todos os discentes com exames alterados foram encaminhados ao tratamento médico. Além disso, as condições de saúde, saneamento básico e moradia foram avaliadas através de questionários, aplicados em algumas residências do bairro. Destacamos a importância de um programa de educação em saúde para esta comunidade, visto que a conscientização e conhecimento acerca da doença são fundamentais para a prevenção e o controle das enteroparasitoses.

PALAVRAS-CHAVE – Parasitoses intestinais; educação em saúde; prevenção.

SUMMARY - The intestinal parasitosis represent a serious problem of public health, mainly in developing countries, where conditions of hygiene and basic sanitation are precarious. Considering that the children are the more affected, we analyze in this work, the prevalence of intestinal parasitosis in the public school, placed in Morro de Santana in Ouro Preto, MG, during the period from August to December 2000. Exams of feces and blood were accomplished in the age group of 4 to 16 years old. The analysis of the feces revealed high level of intestinal parasitosis (53% of positive samples), with prevalence of *Ascaris lumbricoides*. Among positive samples, 49% were monoparasited, 41% biparasited and 10% poliparasited. About 4.5% of the students presented anemia. All the students with altered exams were guided to the medical treatment. Besides, the conditions of health, basic sanitation and dwelling were appraised, through questionnaires applied in some residences of the neighborhood. We bring out the importance of an education program in health for this community, because the understanding and knowledge concerning the disease are fundamental for the prevention and the control of the intestinal parasitosis.

KEYWORDS - Intestinal parasitosis; education in health; prevention.

INTRODUÇÃO

As enteroparasitoses figuram como um dos grandes problemas de saúde pública, afetando mais de 30% da população mundial, com maior prevalência nos países em desenvolvimento, devido às precárias condições de saneamento básico, o baixo nível sócio-econômico, a falta de orientação sanitária e de programas de educação para a saúde (UNICEF, 1998).

A transmissão dos parasitas intestinais geralmente é orofecal, ou seja, a infecção dá-se pela ingestão de ovos ou cistos, através de alimentos, água ou mesmo qualquer outro objeto contaminado com fezes. Devido ao contato mais estreito com as formas infectantes e a imunidade ineficiente para eliminação dos parasitas a prevalência de enteroparasitoses é alta em crianças (Costa-Macedo *et al*, 1998; Marinho *et al*, 2002; Becker *et al*, 2002).

As parasitoses intestinais podem afetar a saúde, a produtividade e a capacidade física e mental, sendo o seu efeito mais deletério quanto mais grave for o estado nutricional do indivíduo afetado (Castiñeiras & Martins, 2002).

Para o controle das enteroparasitoses, Cantos e colaboradores (1999) salientam a necessidade de boas condições de habitação, saneamento básico, consumo de água potável e de alimentos higienizados, além da higiene pessoal e da educação sanitária.

No Brasil, cerca de quarenta milhões de brasileiros apre-

sentam ascaridíase, reflexo do baixo padrão de vida e escasso poder aquisitivo que condenam grandes parcelas da população à má nutrição, à ignorância, à falta de recursos médicos e à precária proteção em geral. Portanto, até que medidas mais eficazes para a melhoria da qualidade de vida sejam implementadas, considera-se importante a realização de exames de fezes para o diagnóstico correto e tratamento adequado das parasitemias (Neves, 1995).

Considerando o exposto, neste trabalho, avaliamos a prevalência das parasitoses intestinais nos alunos da Escola Municipal Profa. Juventina Drummond (EMPJD) e Escola Municipal de Educação Infantil Cirandinha (EMEIC), situadas no bairro Morro de Santana, no município de Ouro Preto, MG.

METODOLOGIA

Foram realizados 620 exames de fezes dos alunos das escolas envolvidas no Projeto. As amostras foram colhidas em recipientes devidamente identificados, contendo solução conservadora de formol a 10% e examinadas pelo método H.P.J. (Hoffman *et al*, 1934), sendo realizada a leitura de três lâminas de cada amostra.

Também foram realizados 326 hemogramas, sendo as amostras de sangue colhidas em frasco contendo anticoagulante EDTA. Foram considerados positivos para a presença de anemia os casos que apresentaram valores de he-

Recebido em 04/10/2004
Aprovado em 04/02/2005

moglobina menores que 12g/dl, conforme estabelecido por Glassman (1997).

Todos os exames foram executados pelos estagiários do Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Escola de Farmácia, sob a supervisão técnica da coordenação da disciplina de Estágio Supervisionado em Análises Clínicas.

Os resultados foram entregues aos responsáveis, sendo os casos positivos encaminhados ao médico para tratamento. Paralelamente, os estagiários visitaram 144 residências do bairro para avaliação das condições de saúde, moradia e saneamento básico através da aplicação de um questionário às famílias dos escolares. Estas moradias foram escolhidas randomicamente.

Os dados foram analisados utilizando o programa Epi-Info 6 e Excel 6.0 e o teste de Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Observou-se alto índice de parasitoses intestinais nas crianças das escolas analisadas: 53% das amostras avaliadas foram positivas (Figura 1A). Os parasitas encontrados nas amostras estão relacionados na Figura 1B. Os parasitas mais prevalentes foram *Ascaris lumbricoides* (37,91%) e *Entamoeba coli* (32,24%). Embora o diagnóstico de giardíase quando realizado com uma única amostra apresente baixa positividade devido ao fato de que pacientes infectados não eliminam cistos continuamente, a porcentagem de amostras positivas para *Giardia lamblia* foi significativa (12,42%). Para a obtenção de melhores resultados o ideal seria a realização do exame de três amostras fecais em dias alternados.

Em relação ao grau de parasitismo encontramos 49% dos discentes monoparasitados, 41% biparasitados e 10% poliparasitados (Figura 1C).

Não houve diferença estatística entre os parasitas com relação ao sexo ou idade.

Considerando que os parasitas dificultam o processo de digestão e assimilação de nutrientes e contribuem para a desnutrição e anemia, analisamos os hemogramas dos discentes das escolas EMEIC e EMPJD. Nossos resultados mostram que 4,5% das crianças estavam anêmicas (Figura 2).

Verificamos que as condições de saúde, moradia e saneamento básico do bairro Morro de Santana são precárias, o que dificulta o controle das enteroparasitoses. O município de Ouro Preto não dispõe de água tratada, sendo realizada apenas a cloração. Quase a totalidade das famílias visitadas relatou problemas no abastecimento de água, o que certamente compromete a higiene e contribui para a disseminação de doenças. Cerca de 9,7% das famílias relataram não ter filtro em casa. Cerca de 14,8% relataram não haver coleta de lixo na proximidade de suas casas, sendo este na maioria das vezes jogado em algum terreno desocupado, contribuindo para a proliferação de insetos. Foi observada a presença de insetos nas moradias visitadas, principalmente moscas.

A figura 3 (A e B) mostra o número de moradores/residência e o número de cômodos das moradias visitadas. Em cerca de 23,1% das famílias visitadas, 6 pessoas dividem a mesma moradia, em geral de 4 cômodos (38,5%) ou de 5 ou mais (34,5%).

Ressaltamos a importância do atendimento médico e tratamento das crianças parasitadas, bem como a realização de um projeto de educação em saúde visando a conscientização acerca das enteroparasitoses e sua prevenção.

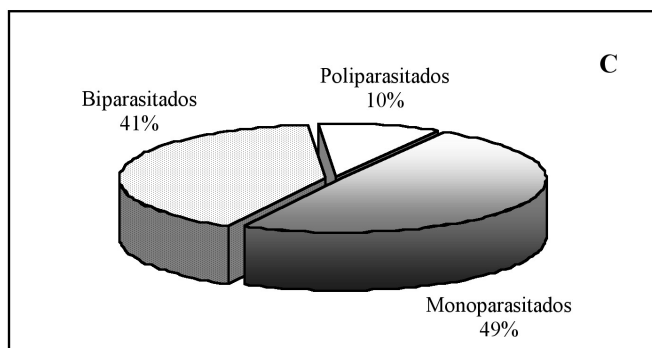
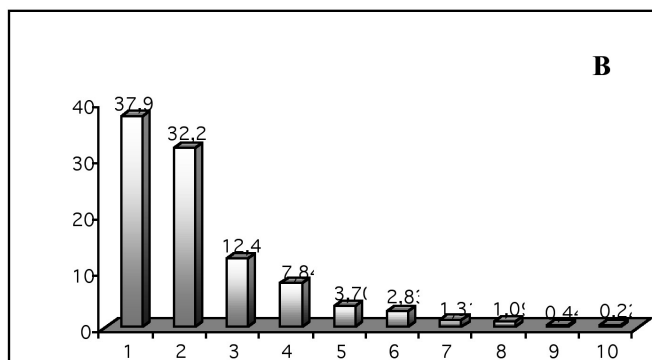
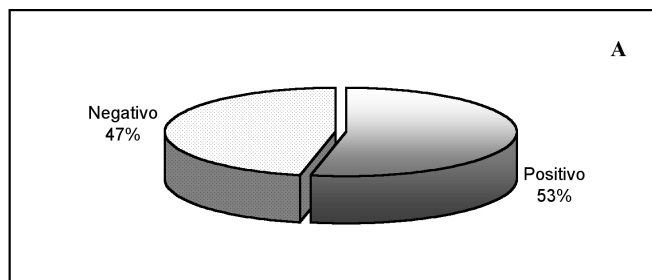


Figura 1: Resultado do inquérito parasitológico realizado com 620 discentes das EMEIC e EMPJD, situadas no Morro de Santana, Ouro Preto, MG. (A) Positividade das amostras. (B) Prevalência de parasitas: 1- *Ascaris lumbricoides*; 2- *Entamoeba coli*; 3- *Giardia lamblia*; 4- *Endolimax nana*; 5- *Trichuris trichiura*; 6- *Enterobius vermicularis*; 7- *Strongyloides stercoralis*; 8- *Iodameba butschilli*; 9- *Ancilostomo duodenale*. (C) Frequência de multiparasitoses.

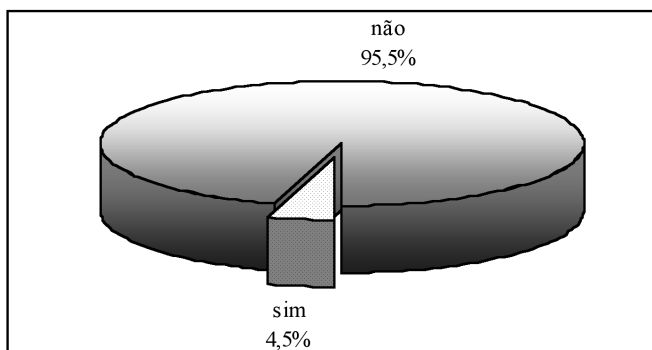


Figura 2: Prevalência de anemia nos discentes das EMEIC e EMPJD, Morro de Santana, Ouro Preto, MG.

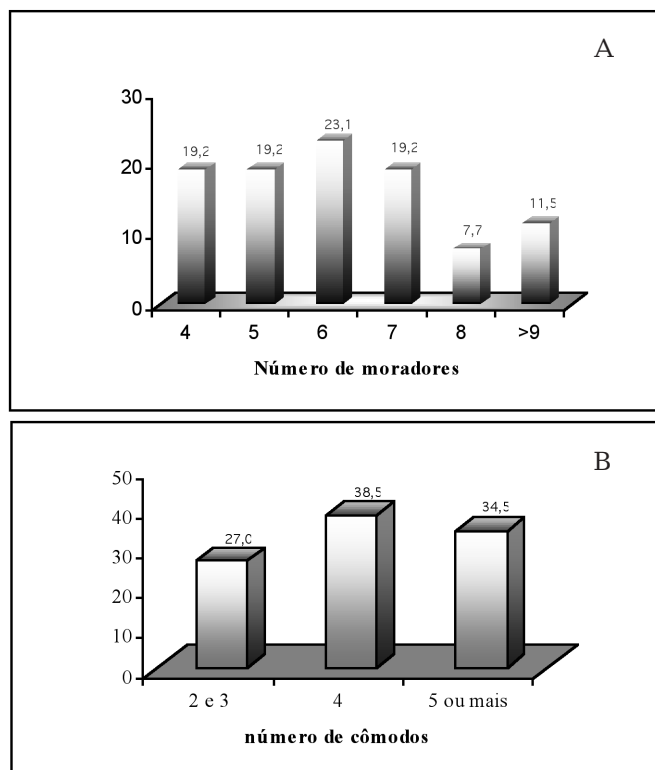


Figura 3: Condições de moradia no bairro Morro de Santana, Ouro Preto, MG. (A) Número de moradores/residência. (B) Número de cômodos/residência.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

São preocupantes os altos índices de parasitoses encontrados no bairro Morro de Santana em Ouro Preto, principalmente por se tratar de crianças em um local com alta taxa de desnutrição, pois a morbidade das parasitoses intestinais tem uma relação direta com o grau nutricional do indivíduo.

De modo geral, os índices de enteroparasitoses apresentados neste estudo revelam um perfil semelhante ao de outras escolas públicas do país localizadas em centros com condições precárias de saneamento básico e baixo nível sócio-econômico (Becker *et al*, 2002; Marinho *et al*, 2002). Nossos resultados mostraram que 37,91% das crianças apresentaram *Ascaris lumbricoides*. Este helminto é a espécie mais prevalente de todos os enteroparasitas que acometem o homem em países com baixas condições sócio-econômicas (Hlaing *et al*, 1990). Segundo a OMS (1990), 980 milhões de pessoas estão parasitadas por *Ascaris* em todo mundo.

Entretanto, ao contrário do que se esperava na população infantil, a prevalência de *Enterobius vermicularis* não foi tão elevada. Possivelmente pelo fato do método utilizado para a análise das amostras de fezes não ser satisfatório para o diagnóstico da enterobíase. Sabe-se que a fêmea deposita seus ovos à noite em torno da região anal: portanto, o melhor procedimento diagnóstico consiste em algum método de "swab" da região com substância adesiva que será posteriormente aplicada a uma lâmina de vidro para pesquisa de ovos característicos de oxiúros. Como os vermes não depositam seus ovos todos os dias, pode ser necessária a obtenção de amostras repetidas.

A disseminação das parasitoses intestinal pela contami-

nação fecal do peridomicílio é favorecida em populações com precária estrutura sanitária (Gioia, 1992). Os dados encontrados podem ser justificados não só pela contaminação do peridomicílio e consequentemente do próprio homem, mas também pelas precárias condições sócio-econômicas e culturais da população (Marzochi & Carvalheiro, 1978). No bairro Morro de Santana, verificamos falta de água e não tratamento dessa, falta de rede de esgoto e de coleta de lixo adequada, proliferação de insetos, crianças descalças, baixos níveis de higiene, educação e conscientização por parte dos moradores locais.

Embora discutida a simples distribuição de medicamentos e orientação médica nos casos que apresentaram exames alterados, dados da UNICEF (1998) a consideram benéfica, pelo menos até que as causas e as condições de contaminação ambiental e de infecções sejam sanadas.

Com o panorama da região descrito anteriormente e considerando-se que no Brasil a carência de educação sanitária é marcante cabendo decisão política para reverter este quadro, acredita-se que a conscientização da população quanto às maneiras pelas quais se previnem as doenças transmissíveis é fator indispensável para o sucesso de qualquer campanha profilática. Medidas preventivas como palestras educativas em escolas e centros comunitários podem ser efetivas para minimizar as contaminações enteroparasitárias e seus efeitos nocivos.

REFERÊNCIAS

1. Becker, A.A.; Ioschpe, R.; Delwing, D.; Delwing, D. e Canali, J. Incidência de parasitoses intestinais em escolares do município de Novo Hamburgo, RS. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 34 (2): 85-87, 2002.
2. Cantos, G.A.; Paludo, A.L.; Bettoni, C.L. & Andrade, D.N. Ocorrência de *Enterobius vermicularis* nas creches da rede pública localizadas em Florianópolis. Revista Laes & Haes 20 (118): 90-104, 1999.
3. Castiñeiras, T.M.P.P. & Martins, F.S.V. Infecções por helmintos e enteroprotózoários. Centro de Informações Saúde Pública. CIVES – UFRJ, 2000-2002.
4. Costa-Macedo, L.M.; Silva, J.R.M.; Silva, R.R.; Oliveira, L.M.; Vianna, M.S.R. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 14: 851-855, 1998.
5. Gioia, I. Prevalência de parasitoses intestinais entre os usuários do centro de saúde de Campinas, SP. Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical, 25 (3): 177-182, 1992.
6. Glassman A.B. Anemia: Diagnosis and Clinical Considerations. In: Harming DM (ed) Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis - 3ª ed., F A Davis Company, Cap 4: 71-78, 1997.
7. Hlaing, T.; Saw, T. & Kyin, M.L. Control of ascariasis through age-targeted chemotherapy: impact of 6 monthly chemotherapeutic regimens. Bulletin World Health Organization, 68 (6): 747-753, 1990.
8. Hoffman, W.A.; Pons, J.A. & Janer, J.L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico Journal Publication Health, 9: 281-298, 1934.
9. Marinho, M.S.; Silva, G.B.; Diele, C.ª e Carvalho, J.B. Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Seropédica, município do estado do Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 34 (4): 195-196, 2002.
10. Marzochi, M.C.A. & Carvalheiro, J. Estudo dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas. III. Distribuição de algumas enteroparasitoses em dois grupos populacionais de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 20 (1): 31-35, 1978.
11. Neves, D.P. Parasitologia Humana. 9ª ed. Belo Horizonte. Cooperativa Editora Atheneu, 1995.
12. OMS. Informal consultation on intestinal helminth infections. WHO/ CDS/ IPI/ 90.1, 1990.
13. UNICEF. Situação mundial da infância, 1998.

Efeitos da Antocianina de Uva no Peso e Níveis Sangüíneos de Glicose e Triacilgliceróis em Coelhos Diabéticos

Effects of Anthocyanin of Grape in the Weight and Blood Levels of Glucose and Triacylglycerols in Diabetic Rabbits

Joselito Nardy Ribeiro¹; Tânia Toledo de Oliveira¹; Tanus Jorge Nagem²; Ednaldo Queiroga Lima¹; Paulo César Stringheta³ & Davilson Bragine Ferreira Junior¹

RESUMO - A diabetes é uma doença crônica que se caracteriza por eliminação freqüente de urina, sede incontrolável, emagrecimento e níveis elevados de triacilgliceróis e glicose no sangue.

Neste ensaio biológico verificaram-se os efeitos da antocianina da uva, em coelhos com diabetes induzida pela droga aloxano.

Verificou-se que, após a aplicação da droga aloxano, ocorreu aumento dos níveis de triacilgliceróis e glicose no sangue dos animais, bem como perda de peso corporal.

Observou-se tendência da antocianina proporcionar certo ganho de peso aos animais. Com relação aos níveis de triacilgliceróis e glicose, constatou-se tendência de queda desses constituintes no sangue dos animais tratados com referida substância, embora os resultados não fossem significativos do ponto de vista estatístico.

PALAVRAS-CHAVE - Antocianina, glicose, triacilgliceróis, diabetes.

SUMMARY - Diabetes is a chronic disease characterized by frequent elimination of urine, excessive thirst, weight loss and high levels of triacylglycerols and glucose in the blood.

In this biological assay, were undergone effects of anthocyanin in rabbits with diabetes induced by the drug aloxane.

Was verified after the application of aloxane, occurred an increase of glucose and triacylglycerol levels in the animals blood, as well loss of corporal weight.

It was also observed a tendency for anthocyanin to produce some weight earnings in the animals. With relation to triacylglycerol and glucose levels, it was verified a tendency to reduction of those constituents in the blood of the animals treated with the mentioned substances, although the results were not significant from the statistical point of view.

KEYWORDS - Diabetes, anthocyanin, glucose, triacylglycerols.

INTRODUÇÃO

A diabetes é uma doença na qual a glicose do sangue se encontra em níveis elevados quando o paciente está em jejum, além de ser acompanhado por alterações no metabolismo de carboidratos e também de lipídios e proteínas. Essas alterações são uma consequência do déficit da secreção da insulina (PALLARDO, 1997).

Para sair da corrente sangüínea e entrar nas células, a glicose precisa ser transportada, e esse transporte para o interior da maioria das células depende da presença de um hormônio conhecido como insulina, que se apresenta anexo aos locais receptores nas membranas celulares. Quando ocorre ausência da insulina suficiente ou redução de sua eficácia, a glicose não pode mais atravessar a membrana da célula, e a consequência disso é que esse açúcar acaba se acumulando na corrente sangüínea, levando a hiperglicemia (MAHAN e KRAUSE, 1994).

A insulina promove também o armazenamento subsequente de lipídeos devido ao estímulo provocado pela insulina na atividade da enzima lipase lipoprotéica, que exerce, entre outras, a função de facilitar a captação de triacilgliceróis pelo tecido adiposo. Na ausência de insulina ou ineficácia de sua atividade, a captação pelo tecido adiposo acaba sendo diminuída, e, como consequência, aumentam-se os triacilgliceróis no sangue (PYORAL *et al.*,

1987; STAMLER *et al.*, 1993).

A hipertrigliceridemia representa uma das alterações lipoprotéicas mais comuns na diabetes. A elevação plasmática dos triacilgliceróis está diretamente relacionada à redução da atividade da lipase lipoprotéica. Essa enzima é responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, e sua ação está vinculada aos níveis circulantes de insulina (HOWARD, 1987; ABBATE e BRUNAEL, 1990).

O diabetes confere maior risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana independentemente das faixas etárias. Alterações nas lipoproteínas LDL, VLDL são freqüentes nesses pacientes. (ROSENGREN *et al.*, 1989; RUBIES *et al.*, 1993; STAMLER *et al.*, 1993).

O diabetes mellitus e a aterosclerose têm uma relação recíproca porquanto o diabetes é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, a qual é a principal causa de mortalidade nesse grupo de indivíduos (BAYERL, 2000). Está bem estabelecido que aterosclerose é mais severa no diabetes mellitus cujos portadores apresentam lipoproteínas glicosiladas. Foi demonstrado que a glicosilação aumenta significativamente a aterogenicidade da lipoproteína (OREKHOV, 1997).

Informações recentes sugeriram que dietas compostas por determinados flavonóides, tais como os presentes na soja (que contém principalmente isoflavonas como a genisteína

Recebido em 29/09/2004

Aprovado em 29/12/2004

¹Laboratório Biofármacos. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

³Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

na, daidzeína, daizina, genistina e outros), são capazes de reduzir hipercolesterolemia (KUROWSKA, 2000). Estudos epidemiológicos demonstraram que a ingestão diária de flavonóides é inversamente associada à mortalidade por doenças cardiovasculares e incidência de infarto (SHIMOI *et al.*, 1998).

Os flavonóides são substâncias encontradas em diversos tipos de vegetais. Nos alimentos, são encontrados nas frutas, leguminosas, em flores e folhas. Nas folhas, os flavonóides bloqueiam a penetração da radiação ultravioleta, que danifica os ácidos nucléicos e as proteínas. Eles, seletivamente, absorvem luz de cores azul, verde e vermelha, que são importantes para a fotossíntese (RAVEN *et al.*, 1996; COOK e SAMMAN, 1996; BATLOUNI, 1997).

São conhecidos mais de 4.200 flavonóides, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos (SIMÕES, 2000).

A associação entre alto consumo de flavonóides e redução do risco de doenças cardiovasculares têm sido proposta como sendo parcialmente relacionada à inibição da oxidação da LDL e agregação plaquetária. O mecanismo proposto para o efeito antioxidante dos flavonóides se desenvolve através da interação com radicais livres diminuindo a oxidação da LDL e, conseqüentemente, reduzindo sua aterogenicidade. Os dados que justificam estas conclusões estão baseados em estudos epidemiológicos que, quando agrupados, incluem centenas de participantes de países industrializados, predominantemente da Europa e América do Norte (PUDDEY, 1999). Os flavonóides com capacidade antioxidante removem os radicais superóxido, oxigênio simpleto e os peróxidos lipídicos, diminuindo a oxidação das LDLs e seus efeitos citotóxicos (BATLOUNI, 1997).

As antocianinas são os pigmentos principais, responsáveis pelas cores das flores. Muitas dessas substâncias se apresentam nas cores vermelha e azul. (RAVEN *et al.*, 1996).

As antocianinas não estão presentes apenas como pigmentos de flores, mas aparecem também em uvas roxas, morangos, amoras pretas, jabuticabas, cerejas, casca da batata-doce, cebola roxa e repolho roxo (FREUND *et al.*, 1988).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, para esse experimento, 18 coelhos machos albinos com aproximadamente dois meses de idade, da raça Nova Zelândia, fornecidos pelo Setor de Cunicultura da Universidade Federal de Viçosa.

Após a chegada, esses animais foram acondicionados em gaiolas individuais e permaneceram durante cinco dias para adaptação, recebendo água à vontade e 120 g de ração para coelhos da marca Linha Natural da Purina.

Após a adaptação, os animais ficaram em jejum por 12 horas, para serem submetidos à primeira medida de peso e dosagem de glicose e triacilgliceróis. Essa primeira dosagem teve como objetivo verificar qual a concentração normal desses constituintes no sangue dos coelhos antes de terem sido submetidos à droga aloxano que induz a diabetes.

Para a medida do peso utilizou-se uma balança da marca Digipeso DP 3000, com capacidade máxima de 15 kg e mínima de 125g com divisão de 5g.

O sangue foi retirado do plexo venoso retro-orbital, sendo, após, centrifugado à 3.000 rpm por 15 minutos para extração do soro, onde foram dosados os níveis de glicose e triacilgliceróis, utilizando-se kit enzimático da marca BIOLAB e o aparelho de dosagens multiparamétrico, da marca Alizé.

Após a primeira análise de sangue e ainda em jejum, 12 coelhos receberam a droga aloxano da marca Sigma. O objetivo da aplicação dessa droga foi induzir a diabetes nos animais.

Após sete dias de aplicação da droga aloxano, foram realizadas a segunda dosagem de triacilglicerol e glicose no sangue, para verificar a indução da diabetes.

Após a constatação de que os animais estavam diabéticos, eles foram separados, de acordo com os seguintes grupos: Grupo 1 (G1) de seis animais normais que receberam apenas 120 g de ração diariamente e água à vontade, Grupo 2 (G2) de seis animais diabéticos que receberam 120 g de ração diariamente e água à vontade, Grupo 3 (G3) de seis animais diabéticos que receberam, além de 120g de ração e água à vontade, antocianina em forma de cápsulas de 20 mg.

RESULTADOS

A tabela 1 nos mostra o efeito da substância teste no peso dos animais aos 14, 21, 28 e 35 dias.

Os resultados indicaram que a antocianina não impediu o distanciamento significativo dos grupos tratamentos em relação ao controle saudável (G1). A antocianina, também, fez com que o grupo G3 tivesse ganho de peso estatisticamente significativo em relação ao grupo G2.

Tabela 1

Pesos médios, em kg, e percentual de variação em relação aos grupos - controle de coelhos submetidos a tratamento com antocianina e avaliados durante 35 dias.

Tempo (dias)	Grupos	Peso (kg)	Variação (%) em relação a: G1	Variação (%) em relação a: G2
0	G1	2,386 A	-	-
0	G2	1,892 B	-	-
0	G3	2,404 a	-	-
7	G1	2,622 A	-	-
7	G2	1,858 B	-	-
7	G3	2,362 a	-9,92	+27,13
14	G1	2,758 A	-	-
14	G2	1,814 B	-	-
14	G3	2,368 a	-14,14	+30,54
21	G1	2,899 A	-	-
21	G2	1,773 B	-	-
21	G3	2,505 a	-13,59	+41,29
28	G1	2,966 A	-	-
28	G2	1,730 B	-	-
28	G3	2,538 a	-14,43	+46,71*
35	G1	3,053 A	-	-
35	G2	1,682 B	-	-
35	G3	2,541 a	-16,77	+51,07*

Em cada tempo A difere de B pelo teste F (p<0,05)

Em cada tempo letras iguais não diferem estatisticamente entre si teste F (p<0,05)

* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

A tabela 2 nos mostra o efeito da substância teste no teor de glicose sanguínea dos animais aos 14, 21, 28 e 35 dias.

Ao analisar a tabela 2 notou-se que, após a aplicação da droga aloxano, os grupos (G1 e G2) apresentaram diferenças significativas entre si, persistindo, assim, até o final do ensaio. Em relação ao grupo tratado verificamos que os níveis de glicose mantiveram-se elevados em relação ao grupo saudável durante todo o experimento. Quando o mesmo foi comparado com o grupo controle diabético, verificamos queda desses níveis de glicose em relação a esse grupo durante todo o experimento tornando-se significativa estatisticamente no 35º dia.

Tabela II
Valores médios de glicose em mg/dL no soro de coelhos e percentual de variação em relação aos grupos - controle de coelhos submetidos a tratamentos com antocianina e avaliados durante 35 dias.

Tempo (dias)	Grupos	Glicose (mg/dL)	Variação (%) em relação a: G1	Variação (%) em relação a: G2
0	G1	148,17A	-	-
0	G2	135,73A	-	-
0	G3	152,65a	-	-
7	G1	150,47B	-	-
7	G2	537,70A	-	-
7	G3	640,77a	+325,85*	+19,17
14	G1	154,85B	-	-
14	G2	526,18A	-	-
14	G3	551,35a	+256,05*	+4,78
21	G1	148,27B	-	-
21	G2	511,38A	-	-
21	G3	476,45a	+221,34*	-6,83
28	G1	146,00B	-	-
28	G2	508,45A	-	-
28	G3	412,12a	+187,27*	-18,95
35	G1	147,57B	-	-
35	G2	509,17A	-	-
35	G3	338,35a	+129,28*	-33,55*

Em cada tempo A difere de B pelo teste F (p<0,05)

Em cada tempo letras iguais não diferem estatisticamente entre si teste F (p<0,05)

* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

A tabela 3 nos mostra o efeito da substância teste nos valores médios de triacilgliceróis dos animais aos 14, 21, 28 e 35 dias. Ao observar-se a tabela 3, percebeu-se que os grupos-controle (G1 e G2) tiveram diferenças estatisticamente significativas aos sete dias, após a aplicação do aloxano, e até o final do ensaio. Sendo que o grupo G2 permaneceu com concentração elevada de triacilgliceróis (500,13 mg/dL aos 7 dias e 443 mg/dL aos 35 dias).

Aos 14 dias, o grupo tratado com antocianina apresentou redução de 5,03% no nível médio de triacilglicerol em relação ao grupo G2. Aos 21 dias esse mesmo grupo apresentou redução na concentração de triacilgliceróis de 23,82% em relação grupo G2.

Aos 28 dias, o grupo G3 apresentou reduções na concentração de triacilgliceróis em relação ao grupo G2 de 43,65%. Aos 35 dias esse mesmo grupo apresentou re-

dução considerável de 60,49%.

DISCUSSÃO

Tabela III
Valores médios de triacilgliceróis em mg/dL no soro de coelhos e percentual de variação em relação aos grupos - controle de coelhos submetidos a tratamentos com antocianina e avaliados durante 35 dias.

Tempo (dias)	Grupos	Triacilglicerol (mg/dL)	Variação (%) em relação G1	Variação (%) em relação G2
0	G1	89,40 ^A	-	-
0	G2	98,02 ^A	-	-
0	G3	111,25 ^a	-	-
7	G1	90,82B	-	-
7	G2	500,13 ^A	-	-
7	G3	556,83 ^a	+513,11*	+11,34
14	G1	87,05B	-	-
14	G2	474,32 ^A	-	-
14	G3	450,47a	+417,48*	-5,03
21	G1	88,77B	-	-
21	G2	461,22A	-	-
21	G3	351,35 ^a	+295,80*	-23,82
28	G1	87,45B	-	-
28	G2	454,02A	-	-
28	G3	255,85a	+192,57	-43,65
35	G1	88,02B	-	-
35	G2	443,22A	-	-
35	G3	175,12a	+98,95	-60,49*

Em cada tempo A difere de B pelo teste F (p<0,05)

Em cada tempo letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (p<0,05)

* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

PESO

Os resultados demonstraram que, mesmo antes da aplicação do aloxano, os grupos- controle (G1 e G2) já eram estatisticamente diferentes em massa corporal. Essa diferença persistiu até o final do experimento. No entanto, após a aplicação do aloxano, notou-se claramente que o controle saudável (G1) apresentou ganho de peso, durante todo o ensaio, em realação ao controle G2.

Essas informações indicaram claramente que a droga aloxano ocasionou perda de peso dos animais do grupo G2. Essa perda de peso é característica de animais que se tornaram diabéticos ao se submeterem a droga aloxano (GORRAY *et al.*, 1986).

De acordo com ARDUÍNO (1979), na diabetes o paciente perde peso por causa, principalmente, do catabolismo das proteínas e da gordura do tecido adiposo. Ocorre, também, perda da glicose pela urina, que pode alcançar cifras de 10% com o correspondente desperdício calórico, e de desidratação decorrente da poliúria.

Quando comparado o grupo tratamento (G3) com o controle G2, percebeu-se que os valores de G3 distanciaram-se significativamente deste controle a partir do tempo 21. Ao observarmos as médias de peso, notamos que, desde a aplicação do aloxano, o grupo G2 perdeu peso e o grupo tratado com antocianina evidenciou certa ganho de peso

GLICOSE

O fato de, após a aplicação da droga aloxano, os grupos (G1 e G2) apresentaram diferenças significativas entre si, persistindo, assim, até o final do ensaio indica que o objetivo de se induzir a diabetes foi atingido.

Vários pesquisadores conseguiram induzir a diabetes em animais experimentais, utilizando a droga aloxano. FRI-NHANI (1998), por exemplo, induziu diabetes em ratos,

aplicando o aloxano, via intravenosa, numa dose de 60 mg/kg de peso corporal dos animais. Em outro modelo experimental, MOHANAN e BOSE (1981) induziram diabetes em ratos por injeção intraperitoneal de aloxano em uma dose de 100 mg/100 g de peso corporal.

Já MARCIANO (1997) testou diferentes concentrações de aloxano para induzir diabetes experimental em ratos. De acordo com esse pesquisador, o sucesso na indução da hiperglicemia foi obtido com a dosagem de 60 mg de aloxano por quilograma de peso corporal dos ratos.

Analisando-se também a relação entre o grupo tratado (G3) com o controle saudável (G1), verificou-se que, após a aplicação do aloxano, houve distanciamento significativo entre eles, persistindo mesmo após a administração da antocianina.

Embora os valores de glicose sanguínea do grupo tratado com antocianina não conseguiram se aproximar do grupo saudável, notou-se claramente que houve redução no teor de glicose desse grupo tratado quando comparado com o grupo controle diabético (G2).

Em outro trabalho, FRINHANI (1998), ao investigar os efeitos de antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* nos níveis de glicose de ratos diabéticos, verificou que, num período de 21 dias de experimento, essas substâncias conseguiram reduzir, consideravelmente, os níveis de glicose desses animais no décimo quarto dia de tratamento.

TRIACILGLICERÓIS

Podemos observar claramente que os animais diabéticos tiveram uma hipertrigliceridemia em consequência da diabetes.

Essa indução também foi observada nos animais do grupo tratado (G3). A hipertrigliceridemia ocorreu porque os animais que se tornam diabéticos tiveram redução da insulina sérica provocado pela destruição das células beta no pâncreas. A falta deste hormônio ocasiona alterações na atividade da lipase, enzima envolvida com os níveis de triacilgliceróis no sangue. Assim, com sua atividade comprometida, esses níveis tendem a tornar-se elevados. (ABBATE e BRUNAEL, 1990).

Os resultados apresentados pelo grupo G3 evidenciaram que a antocianina foi eficiente em reduzir os níveis de triacilgliceróis em coelhos com hipertrigliceridemia induzida por diabetes e que a redução se tornou significativa aos 35 dias de experimento.

JAHROMI e RAY (1993) verificaram redução considerável da concentração de triacilgliceróis provocada pelo flavonóide liquiritigenina, em animais experimentais com hipertrigliceridemia.

Já SUDHEESH *et al.* (1997) verificaram que os flavonóides extraídos da fruta *Solanum melongena*, eram eficientes na redução da hiperlipidemia, quando administrados em ratos hiperlipidêmicos, numa dosagem de 1 mg/100 g de peso corporal/dia. BOK *et al.* (1999), estudando os efeitos da mistura de dois flavonóides (naringina + hesperidina) em ratos machos, verificaram redução considerável no nível de triacilgliceróis do fígado.

A redução dos níveis elevados de triacilgliceróis em diabéticos é importante, uma vez que nesses metabolismo da glicose e dos triacilgliceróis é bastante alterado. Indivíduos diabéticos possuem níveis muito reduzidos do hormônio insulina. Este hormônio auxilia a captura de ácidos graxos livres, na corrente sanguínea, pelo tecido adiposo. Na falta da insulina, os ácidos graxos livres se acumulam na corrente sanguínea. A falta de insulina influencia a ocorrência da hipertrigliceridemia (MAHAN e KRAUSE, 1994), que aumenta o risco de ocorrência de doença arterial coronária. Essas doenças coronárias são as principais responsáveis pelas mortes dos indivíduos portadores de diabetes (PYORAL *et al.*, 1987; STAMLER *et al.*, 1993).

CONCLUSÃO

Os resultados, embora estatisticamente desconsideráveis, indicaram que a antocianina demonstrou promissora tendência em proporcionar ganho de peso aos animais diabéticos, em comparação com o grupo-controle diabético.

Com relação ao teor de glicose, embora estatisticamente irrelevantes, os resultados evidenciaram também certa tendência promissora dessas substâncias em reduzir os níveis elevados de glicose dos coelhos diabéticos, em comparação com os grupos-controle diabéticos.

No tocante ao teor de triacilgliceróis, os resultados indicaram que a antocianina atuou, significativamente, diminuindo o teor elevado de triacilgliceróis dos coelhos diabéticos durante todo o experimento.

REFERÊNCIAS

- ABBATE, S.L., BRUNAEL, J.D. Pathophysiology of hyperlipidemia in diabetes mellitus. *J. Cardiovasc Pharmacol.* v.16 (supl 9), p.51-57, 1990.
- ARDUINO, F. Diabetes mellitus. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. 125p.
- BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da arteriosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.68, n.1, p.55-63, 1997.
- BAYERL, D.M. et al. Coronary stent implantation in diabetici versus nondiabetic patients. Early and late outcomes. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.75, n.5, 2000.
- BOK, S.H., LEE, S.H., PARK, Y.B., BAE, K.H., SON, K.H., JEONG, T.S., CHOL, M.S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-e-metil-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutrient*, v.129, p.1182-1185, 1999.
- COOK, N.C., SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources- review. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, v.7, n.1, p.66-76, 1996.
- GORRAY, K.C., BASKIN, D.G., BRODSKY, J. Response of pancreatic B cells to alloxan and streptozotocin in the guinea pig. *Pancreas*, v.1, p.130-138, 1986.
- FREUND, P.R., WASHAM, C.J., MAGGION, M. Natural color for use in foods. *Cereal Foods World*, v.33, n.7, p.553-559, 1988.
- FRINHANI, E.M.D. Efeito de antocianinas de uvas roxas (enocianinas) e de antocianinas extraídas de trapoeira (*Tradescantia pallida*) em ratos normais e diabéticos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 91p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- HOWARD, B.V. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J. Lipid Res.*, v.28, p.613-628, 1987.
- JAHROMI, M.A.F., RAY, A.B. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from pterocarpus marsupium. *Journal of Natural Products*, Índia, v.56, n.7, p.989-994, 1993.
- KUROWSKA, E.M. et al. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutrition Research* v.20, n.1, p.121-129, 2000.
- MARCIANO, C. Efeito de amido da fruta da lobeira no controle de diabetes mellitus. Viçosa, MG: UFV, 1997. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MOHANAN, S., BOSE, S. Influence of streptozotocin and alloxan induced diabetes on the metabolism of dermal collagen in albino rats. *Acta Diabetologica*, v.18, n.3, p.251-258, 1981.
- MAHAN, L.K., KRAUSE, M.T.A. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 8.ed. São Paulo: Roca, 1994. 957p.
- OREKHOV, A.N., GRUNWALD, J. Effects of garlic on atherosclerosis. *Nutrition*, v.13, n.7-8, 1997.
- PALLARDO, J.P.M. Advances in diabetes. Madrid: Grupo Aula Médica S.A., 1997. 269p.
- PUDDEY, I.B., CROFT, K.D. Alcohol, stroke and coronary heart disease. Are there anti oxidants and pro-oxidants in alcoholic beverages that might influence the development of atherosclerotic cardiovascular disease? *Neuroepidemiology*, v.18, n.6, p.292-302, 1999.
- PYORAL, K., LAAKSO, M., UUSITUPA, M. Diabetes and atherosclerosis. An epidemiological view. *Diabetes Metab. Rev.*, v.3, p.463-528, 1987.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. Biologia vegetal. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. 728p.
- ROSENGREN, A., WELIN, L., TSIOGIANNI, A. Impact of cardiovascular risk factors on coronary heart disease and mortality among middle age diabetic men. A general populations study. *Br. Med. J.*, v.299, p.1127-1231, 1989.
- RUBIES PRAT, J., REVERTER, J.L., SENT, M. Calculated low density lipoprotein cholesterol should not be used or management of lipoprotein abnormalities in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v.16, p.1081- 1086, 1993.
- SUDHEESH, S., PRESANNAKUMAR, G., VIJAYAKUMAR, S., VIJAYALAKSHMI, N.R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. *Plant Food Human Nutrition*, v.51, p.321-330, 1997.
- SHIMOI, K. et al. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-, -glucoside in rats and humans. *FEBS Letters* v.438, p. 220-224, 1998.
- SIMÕES, M.C.O. et al. FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. da UFSC, 2000. 821
- STAMLER, J., VACCAROO, O., NEATON, J.D. Diabetes and other risk factors and 12 year cardiovascular mortality from screend for the Multiple Risk Factor Interventi-on Trial. *Diabetes Care*, v.16, p.434-444, 1993.

Endereço para Correspondência:
Prof.ª Tânia Toledo de Oliveira
Dep. de Bioquímica
Av. P.H. Rolfs, s/n
CEP. 36570-000 Viçosa, MG