

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Teste VDRL para o diagnóstico da sífilis. Avaliação dos resultados em uma unidade de atenção primária de saúde.....	71
<i>Lídiua Ribeiro Santana, Marília Joffily Pereira da Costa Parahyba, Maria José Alencar & Dayan de Araújo Marques</i>	
The VDRL Test for Syphilis Diagnose. Evaluation Results in a Health Basic Unit	
Macroprolactina, um método de diferenciação de prolactinas de elevado peso molecular pela precipitação por Polietilenoglicol.....	75
<i>Alberto Magno Lobo Colares & Northon Pestana da Silva</i>	
Macroprolactine, a method to detect prolactines of high molecular weight with precipitation with polyethylenoglycol	
Controle externo da qualidade dos diagnósticos citológicos no rastreamento do câncer cervical: estudo piloto.....	79
<i>Rita G. Amaral, Nadja L.A. Souza, Suelene B. N. Tavares, Edna J.C. Manrique, Deina Z. Assem, Lucília L. Azevedo, Raniara C.F. Queiroz, Raquel C. Freitas & Gislaine A. Fonsechi-Carvasan</i>	
External quality control in the cytologic diagnosis in screening cervical cancer: pilot study	
Avaliação de Lesões Intra-Epiteliais Escamosas e Microbiologia em exames citológicos realizados em um Laboratório de Porto Alegre, RS.....	83
<i>Andréia Buffon; Mariema Civa & Virginia Frota de Matos</i>	
Avaliation of squamous intraepithelial lesions and microbiology in cytologic smears in a laboratory of Porto Alegre, RS	
O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani: estudo de revisão.....	87
<i>Luciana Albring, Jaime Ebert Brentano & Vera Regina Andrade Vargas</i>	
The cervical cancer, the Human Papillomavirus and its risk factors and the Guarani indigenous women: a review	
Deteção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e imunocitoquímica.....	91
<i>Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc, PhD), Marcos Antonio Mauricio Scheiner (MSc), Flávia da Cunha Vasconcelos, Jane de Almeida Dobbins (MD), Claudete Esteves Klumb (MD, PhD) & Raquel C. Maia (MD, PhD)</i>	
Detection of p53 protein in leukemic cells by flow cytometry and immunocytochemistry	
Elaboração de meio para hemocultura com resina inativadora de antibióticos e comparação laboratorial do meio desenvolvido com o meio bact/alert aerobico fan para a detecção de bacteriemia e fungemia em pacientes em uso de terapia antimicrobiana.....	99
<i>Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva; Alessandro Pereira Lins & Caroline Sathler Oliveira da Cruz</i>	
Elaboration of a blood culture medium with antibiotic-inactivating resin and laboratory comparison of this medium with bact/alert aerobic fan medium for detection of bacteremia and fungemia in patients receiving antimicrobial therapy	
Estudo do perfil de hemoglobinas em 9.189 testes realizados no Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas.....	107
<i>Cleiton Paulo Aigner; Fabiano Sandrini; Edmir Gonçalves Duarte; Mauricio Pacheco Andrade; Marco Antonio Largura & Alvaro Largura</i>	
The Characteristic of 9,189 Tests of Hemoglobinopathy Diagnostic from the Alvaro Center of Clinical Chemistry and Research in the 2004 year	
Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de <i>Punica granatum linn.</i> (romã) sobre isolados ambulatoriais de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	111
<i>Catão, R. M. R.; Antunes, R. M. P.; Arruda, T. A.; Pereira, M. S. V.; Higino, J. S.; Alves, J. A.; Passos, M.G.V.M. & Santos, V. L.</i>	
Antimicrobial activity 'in vitro' of the ethanol extract <i>Punica granatum</i> against of <i>Staphylococcus aureus</i> strains	
Prevalência de Teniase no Município de Pedra Branca Estado do Ceará, Brasil.....	115
<i>Oliveira, M.F.; Sousa, F.C.S.; Pereira, A.C.G.; Alencar, A. M.; Bezerra, F.S.M.; Martins, D.A. & Teles, R. M.A.</i>	
Prevalence of taeniasis in municipal district Pedra Branca of Ceará State, Brazil	
O uso do corante urucum (<i>Bixa orellana L.</i>) na técnica de coloração histológica.....	119
<i>Dayana Cardozo Rohde; Sergio Oliveira Silveira & Vera Regina Andrade Vargas</i>	
The use of stain urucum (<i>Bixa orellana L.</i>) in the techniques histological staining	
Perfil de Resistência de <i>Acinetobacter baumannii</i> a Antimicrobianos nas Unidades de Terapia Intensiva e Semi-Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza*.....	123
<i>Vânia Maria Oliveira de Pontes; Everardo Albuquerque Menezes; Francisco Afrânio Cunha; Maria Rozellê Ferreira Ângelo; Maria Núbia Cavalcante Salviano & Inácio Régis Nascimento Oliveira</i>	
Profile of resistance of <i>Acinetobacter baumannii</i> to antimicrobial in the Semi-Intensive and Intensive Care Units of the General Hospital of Fortaleza.	
Prevalência da tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeleiros em Porto Alegre, RS....	127
<i>Rafael V. Michel, Fernanda P. Borges, Renata C. M. Wiltuschnig, Francine G. Neves, Juliana Ribeiro, Renata C. Vieiro, Patrícia B. Vieira, Gabriela R. Bohns, Tiana Tasca & Geraldo A. De Carli</i>	
Prevalence of trichomonosis among women resident in the Papeleiros Slum in Porto Alegre, RS	

E mais...

Temas Livres do XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2006
e do VI Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

2

VOLUME 38

2006

Teste VDRL para o diagnóstico da sífilis. Avaliação dos resultados em uma unidade de atenção primária de saúde*

The VDRL Test for Syphilis Diagnose. Evaluation Results in a Health Basic Unit.

Liduína Ribeiro Santana¹, Marília Joffily Pereira da Costa Parahyba², Maria José Alencar³ & Dayan de Araújo Marques⁴.

RESUMO - O teste VDRL é um recurso imunodiagnóstico utilizado com frequência para o diagnóstico da sífilis, doença que se mantém ainda hoje como importante problema de saúde pública em todo mundo. O trabalho objetivou verificar os resultados dos testes VDRL de pacientes atendidos em uma Unidade Básica de Saúde. Analisou-se 1.126 exames realizados no laboratório do Núcleo de Atenção Médica Integrada – NAMI – Universidade de Fortaleza, entre janeiro de 1998 a dezembro de 1999. Dos 1.126 exames analisados, 1.090 (96,8%) foram não reagentes (NR), 32 (2,8%) reagentes (R) e 4 (0,4%) duvidosos (D). Quanto aos testes reagentes, 6 (0,5%) eram de pacientes do sexo masculino e 26 (2,3%) do sexo feminino. A idade dos homens variou de 10 meses (sífilis congênita) a 67 anos, sendo 3 (50%) entre homens de 15 a 40 anos. Entre as mulheres, a idade variou de 12 a 45 anos, com 18 casos (69,2%) em mulheres de 20 a 39 anos. Os resultados obtidos revelam a permanência da infecção em nosso meio e a importância do teste VDRL como suporte no acompanhamento dessa doença, em especial em Unidades Básicas de Saúde.

PALAVRAS-CHAVE - Infecções por treponema, Sífilis, Sorodiagnóstico da sífilis.

SUMMARY - The VDRL test is a immunodiagnosis resource used frequently for syphilis diagnose, a disease that maintains itself as an important public health problem all over the world. This study aims to verify the VDRL test results of the patients attended at a Health Basic Unit. It were analysed 1.126 exams made at the "Núcleo de Atenção Médica Integrada – NAMI – Fortaleza – University's laboratory", between January, 1998 and December 1999. Among the 1.126 analysed exams, 1.090 (96,8%) were not reagent (NR), 32 (2,8%) were reagent (R) and 4 (0,4%) unclear (D). About the reagent tests, 6 (0,5%) were from male patients and 26 (2,3%) were from female patients. Men's age varied from 10 months (congenital syphilis) to 67 years old, being 3 men (50%) between 15 to 40 years old. Among women, age varied from 12 to 45 years old, with 18 cases (69,2%) in women from 20 to 39 years old. The obtained results reveal the maintenance of the disease in our environment and the VDRL importance as a support in the follow up of this disease, specially in Health Basic Units.

KEYWORDS - Treponemal infections, Syphilis, Syphilis serodiagnosis.

INTRODUÇÃO

A sífilis ou lues é uma doença infecciosa sistêmica, de evolução crônica, que ocupa uma importância significativa entre os problemas mais frequentes de saúde pública em todo o mundo. O agente causador da sífilis foi denominado em 1905, como sendo o *Treponema pallidum*, um espiroqueta adquirido na maioria dos casos durante relações sexuais. Outras formas de transmissão também podem ser observadas: transfusões sanguíneas, passagem transplacentária da mãe infectada para o feto, pela saliva e contato com exsudatos de lesões recentes da pele ou mucosas (ROUQUAYROL *et al.*, 1999).

De acordo com o Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde (1999), a doença está classificada em:

- Sífilis adquirida recente
(com menos de um ano de evolução)
 - Primária
 - Secundária
 - Latente recente
- Sífilis adquirida tardia
(com mais de um ano de evolução)
 - Latente tardia
 - Terciária

- Sífilis congênita recente
(diagnosticada até o 2º ano de vida)
- Sífilis congênita tardia
(diagnosticada após o 2º ano de vida)

O diagnóstico da sífilis é baseado na avaliação clínica, na identificação do agente etiológico (pesquisa direta do *T. pallidum* no exsudato seroso das lesões) e nos testes sorológicos. O recurso diagnóstico mais frequentemente utilizado é o teste sorológico, visto que, o paciente na maioria das vezes, quando procura o serviço de saúde, já não mais se encontra na fase inicial da doença, que se caracteriza pelo surgimento da úlcera ou cancro. As provas sorológicas constituem o único meio de identificação para a forma latente da sífilis adquirida, na qual não são observados quaisquer sinais ou sintomas clínicos que sugiram a presença da doença. Dois grupos de testes sorológicos são utilizados para o diagnóstico:

- Testes antigênicos não treponêmicos ou testes lipóídicos:
 - VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*)
 - RPR (*Rapid Plasm Reagin*)
- Testes treponêmicos ou pesquisa de anticorpos verdadeiros
 - FTA-ABS (*Fluorescent Treponema Antigen Absorvent*)
 - MHA-TP (*Micro hemo-aglutinação para Treponema pallidum*)
 - EIA / ELISA (*Enzimaimunoensaio para anticorpo anti-Treponema*)
 - PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Recebido em 23/02/2005

Aprovado em 14/11/2005

*Laboratório do Núcleo de Atenção Médica Integrada da Universidade de Fortaleza, Ceará.

¹Professora Assistente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Fortaleza – UNIFOR. Farmacêutica Bioquímica da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. E-mail: liduinass@yahoo.com.br

²Médica, Professora Auxiliar do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Fortaleza – UNIFOR. Mestre em Saúde Pública. E-mail: joffily@terra.com.br

³Professora Assistente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Fortaleza – UNIFOR. Farmacêutica Bioquímica da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.

⁴Aluno concluinte do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Fortaleza – UNIFOR

O treponema possui uma fração lipídica, comparável a cardioplipina em sua constituição antigênica. Os testes não treponêmicos ou lipoídicos, utilizam reações tendo por base a cardioplipina, na qual detectam-se anticorpos denominados reaginas. Processos patológicos, como doenças autoimunes, determinadas infecções bacterianas e virais, algumas protozooses e situações, dentre as quais gravidez, idade avançada e drogadicção, também podem liberar antígenos lipoídicos, os quais levam à produção de reaginas, traduzindo-se em resultados falsos positivos para sífilis, demonstrando assim a não especificidade das reações não treponêmicas (VAZ *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 1999; CORBELLINI *et al.*, 2000).

Os testes treponêmicos utilizam antígenos de *T. pallidum* através de reações imunológicas de elevada sensibilidade e especificidade. São testes confirmatórios, úteis para exclusão de falsos positivos à sorologia não treponêmica, porém com procedimentos mais complexos, alto custo, não disponíveis como exames de rotina e inadequados para avaliação da resposta terapêutica (VAZ *et al.*, 1996; CORBELLINI *et al.*, 2000).

A prova do VDRL, é um dos testes não treponêmicos utilizados rotineiramente no imunodiagnóstico da sífilis. Devido ao baixo custo e praticidade quanto à sua realização, vem sendo usado em larga escala na maioria dos laboratórios de unidades de atenção primária de saúde. Apresenta uma técnica rápida de microfloculação, na qual utiliza antígenos extraídos de tecidos como a cardioplipina, um lípido derivado do coração de bovinos. A cardioplipina, quando combinada com lecitina e colesterol, forma sorologicamente um antígeno ativo, capaz de detectar anticorpos humorais presentes no soro durante a infecção sífilítica, uma a quatro semanas após o aparecimento do cancro primário. As dosagens quantitativas do VDRL, expressas em títulos, em geral se elevam até o estágio secundário. A partir do primeiro ano da doença, os títulos tendem a diminuir, podendo a reatividade desaparecer mesmo sem tratamento. Com a infecção corretamente tratada, o VDRL tende a negatar-se entre 9-12 meses, embora a reatividade em baixos títulos ($\leq 1:8$) possa perdurar por vários anos ou até por toda a vida. Esta reatividade residual denomina-se "memória" sorológica. Desta maneira, títulos baixos podem significar doença muito recente ou muito antiga, tratada ou não (BELDA, 1991).

Este trabalho tem como objetivo verificar os resultados dos testes VDRL de pacientes atendidos em uma unidade de atenção primária de saúde, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi desenvolvida uma análise retrospectiva no universo dos 2.146 testes VDRL realizados no laboratório do Núcleo de Atenção Médica Integrada – NAMI – Universidade de Fortaleza, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999. O critério utilizado, para a inclusão na amostra, foi o fato dos pacientes se encontrarem devidamente cadastrados no Serviço de Arquivo Médico – SAME, da unidade, no período referido. O total resultou em 1126 exames VDRL. Os testes foram solicitados pela equipe médica e de enfermagem, tendo por base o critério gestacional e casos suspeitos de sífilis, quer sejam na ginecologia-obstetria, na pediatria ou clínica médica.

As variáveis estudadas contemplam o sexo e a idade, sendo 99 pacientes do sexo masculino e 1027 do sexo feminino, com idades variando entre 10 meses e oitenta anos. Analisou-se os resultados do referido teste na população

estudada, verificando-se o número de casos VDRL reagentes (R), não reagentes (NR) e duvidosos (D). Os testes que apresentaram resultados duvidosos não tiveram confirmação subsequente, pelo fato do não retorno dos pacientes ao serviço.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A verificação dos 1.126 testes VDRL mostrou um maior número de pacientes do sexo feminino, com idades entre 03 e 70 anos. A faixa etária predominante variou de 17 a 42 anos. Uma possível explicação para a maior frequência de mulheres em nossa casuística, seria a utilização do teste VDRL como rotina pré-natal, realizado na clínica obstétrica do serviço. Tayra e Matida, em estudo realizado em 1997, no estado de São Paulo, afirmam ser histórico o maior comparecimento das mulheres às unidades básicas de saúde, provavelmente em decorrência da demanda do serviço ginecológico. Com relação ao sexo masculino, a idade variou de 10 meses a 80 anos, não havendo predominância de faixa etária para a realização do exame.

Dos exames verificados, foram encontrados 32 (2,8%) testes reagentes (R), 1090 (96,8%) testes não reagentes (NR) e 4 (0,4%) testes duvidosos. Com referência aos testes reagentes (R), 6 (0,5%) são de pacientes do sexo masculino e 26 (2,3%) de pacientes do sexo feminino, observando-se uma maior proporção de testes reagentes entre os homens. Estudo realizado por Vaz *et al.*, (1996), em laboratório privado do Estado de São Paulo, encontrou 3% de testes VDRL reagentes em 2.080 pacientes do sexo masculino e em 6.641 pacientes do sexo feminino. Rouquayrol *et al.*, (1996), no levantamento das doenças de notificação compulsória, em Fortaleza, no período de 1991 a 1995, revela uma maior frequência de sífilis em pessoas do sexo masculino.

Quanto aos testes não reagentes (NR), 91 (92%) eram de pessoas do sexo masculino e 999 (97,3%) de pessoas do sexo feminino. Um percentual de 0,4% (04 casos) de testes duvidosos foi encontrado para ambos os sexos (Tabela 1). A idade dos pacientes com testes reagentes (R) variou de 10 meses a 67 anos para o sexo masculino. Cinquenta por cento dos casos encontrados foram entre homens na faixa de 20 a 49 anos (Tabela 2). Esses dados estão em consonância com os encontrados na literatura, quando mostra uma maior incidência da doença em homens jovens (15 a 40 anos), provavelmente, devido a uma maior exposição (ROUQUAYROL *et al.*, 1996). Foi constatado nesse grupo, um único caso de sífilis congênita recente (diagnosticada até o 2º ano de vida). Em 1993, os Ministérios da Saúde dos países latino-americanos estabeleceram como meta para o ano 2000, a eliminação da sífilis congênita, considerada um problema de saúde pública (M.S., 1999).

A tabela 3 apresenta os testes reagentes (R) de pacientes do sexo feminino, cuja faixa de idade variou de 12 a 45 anos, com predominância da segunda (23,0%) e terceira (46,2%) décadas de vida, mostrando tendência semelhante aos resultados encontrados no levantamento epidemiológico das doenças infecciosas em Fortaleza – 1991 a 1995, quando revela uma maior frequência da infecção sífilítica em mulheres com idades situadas entre 20 a 34 anos (ROUQUAYROL *et al.*, 1996).

A tendência temporal da infecção sífilítica em Fortaleza, mostrou um decréscimo no período de 1991 a 1995, entretanto, dados do SINAM (Sistema de Informações de Agravos de Notificação – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará) mostram a ocorrência de 554 casos de sífilis no ano de 1998, sendo 76 de sífilis congênita, 477 não especificada e

01 caso de sífilis secundária. Para o ano de 1999, observa-se a notificação de 319 casos, com 76 casos de sífilis congênita, 239 não especificada, 03 secundárias e 01 caso de sífilis recente latente.

Os índices de VDRL reagentes (R), encontrados neste estudo, refletem a permanência da infecção em nosso meio e alertam para a necessidade da realização deste teste em populações de maior risco, em especial as gestantes, devido a transmissão transplacentária.

TABELA I

Distribuição dos pacientes segundo testes VDRL e sexo

TESTE	MASCULINO		SEXO FEMININO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
VDRL -R	6	6	26	2,5	32	2,8
VDRL -NR	91	92	999	97,3	1.090	96,8
VDRL -D	2	2	2	0,2	04	0,4
TOTAL	99	100	1.027	100	1.126	100

R - reagentes; NR - não reagentes; D - duvidosos
Fonte: Lab. NAMI, 1998 - 1999

TABELA II

Distribuição dos pacientes do sexo masculino com teste VDRL reagente (R)

GRUPO ETÁRIO	N	%
<1	1	16,7
1 - 19	1	16,7
20-49	3	50,0
≥ 50	1	16,7
TOTAL	6	100

Fonte: Lab. NAMI, 1998 - 1999

TABELA III

Distribuição dos pacientes do sexo feminino com teste VDRL reagente (R)

GRUPO ETÁRIO	N	%
10 - 19	4	15,4
20 - 29	6	23,0
30 - 39	12	46,2
≥ 40	4	15,4
TOTAL	26	100

Fonte: Lab. NAMI, 1998 - 1999

A análise dos resultados encontrados nos permite delinear:

1. Para a realização dos exames:

- Houve maior número de mulheres;
- A faixa etária predominante entre as mulheres variou de 17 a 42 anos;
- Não houve predominância de faixa etária entre os homens.

2. Para os testes reagentes:

- Maior proporção para o sexo masculino;
- Cinquenta por cento dos testes foram entre homens jo-

vens (15 a 40 anos);

- Quanto ao sexo feminino, observou-se predominância da segunda e terceira décadas de vida.

CONCLUSÃO

Embora o comportamento do VDRL frente ao diagnóstico da sífilis apresente algumas limitações, como reações falso-positivas em situações patológicas ou fisiológicas, menor sensibilidade quando comparado aos testes treponêmicos, deve-se ressaltar a importância do referido teste como diagnóstico preventivo e principalmente como seguimento terapêutico, através de dosagens quantitativas. Desta maneira, aliada à avaliação clínica do paciente, o teste VDRL se constitui um instrumento de significativa importância na triagem sorológica, como também no acompanhamento da infecção sífilítica.

REFERÊNCIAS

1. Belda, W. Sífilis. In: Veronesi, R, editor. Doenças infecciosas e parasitárias. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 910-925.
2. Coberllini JPN, et al. Sífilis: atualidades na abordagem terapêutica. JBM 2000; 78(6):44-50.
3. Lima JCC, et al. A história da sífilis e seu diagnóstico laboratorial. São Paulo: Laes & Haes; ago/set 1999; 20(120): 203-212.
4. Manual de Controle das doenças sexualmente transmissíveis- DST. 3. ed. Brasília, DF: Coordenação Nacional de DST/AIDS. Ministério da Saúde; 1999.
5. Rouquayrol MZ, et al. Epidemiologia das doenças infecciosas em Fortaleza. Fortaleza: Secretaria de Saúde do Estado do Ceará; 1996. 176 p.
6. Rouquayrol MZ. Epidemiologia e saúde. 5a. Rio de Janeiro: MEDS; 1999.
7. SINAM - Sistema de Informações de Agravos de Notificação. Fortaleza, Ce. Secretaria de Saúde CEARÁ; 1998. [Mimeografado].
8. SINAM - Sistema de Informações de Agravos de Notificação. Fortaleza, Ce. Secretaria de Saúde CEARÁ; 1999. [Mimeografado].
9. Tayara A, Matida LH. Relatório dos casos notificados de doenças sexualmente transmissíveis no período de 1987 a junho de 1995, DST. J Bras. Doenças Sex Transm 1997; 9(1):30-36.
10. Vaz AJ, et al. Resultados de testes imunodiagnósticos da sífilis: (VDRL e FTA-ABS) obtidos em laboratórios privado (São Paulo-SP, 1996). News Lab, São Paulo. set/out. 1997; 24:124-8.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Luduina Ribeiro Santana
Rua Paulo Moraes, 790/204 - Papiçú
CEP. 60175-175 Fortaleza - CE

IFCC WORLDLAB
Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Macroprolactina, um método de diferenciação de prolactinas de elevado peso molecular pela precipitação por Polietilenoglicol.

Macroprolactine, a method to detect prolactines of high molecular weight with precipitation with polyethylenoglycol.

Alberto Magno Lobo Colares & Northon Pestana da Silva*

RESUMO - Um estudo realizado no setor de hormônios do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Brasília adaptou para equipamentos de quimioluminescência o método de precipitação por polietilenoglicol em soros de pacientes com hiperprolactinemia para detecção de isoformas da prolactina com elevado peso molecular (macroprolactina), evitando, com isto, estudos de imagens para confirmação diagnóstica.

PALAVRAS-CHAVE - Macroprolactina, precipitação por polietilenoglicol.

SUMMARY - A research made in the hormone sector of the Laboratory of Clinical Analysis of the Hospital Geral de Brasília of the Defense Ministry had adapted the method of precipitation with polyethylenoglycol (PEG 6000) in serum of patients with hyperprolactinemia for chemiluminescence equipments in order to detect the isoforms of prolactine with high molecular weight (macroprolactine), avoiding, with this, image studies to confirm diagnosis.

KEYWORDS - Macroprolactine, precipitation with polyethylenoglycol.

INTRODUÇÃO

Em virtude de um considerável número de casos trazidos ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Brasília, de pacientes com aumento no nível de prolactina sérica, frente ao diagnóstico clínico e estudos de imagens incompatíveis com hiperprolactinemias sugestivas de adenomas hipofisários, o setor de hormônios deste laboratório iniciou uma pesquisa no 2º semestre de 2002, com a finalidade de solucionar tal incompatibilidade. Após acesso a publicações científicas, os caminhos levaram ao estudo da macroprolactina e a sua dosagem. Um novo desafio se configurou, uma vez que se necessitou adaptar a técnica de precipitação pelo Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) aos equipamentos utilizados em nossa rotina, na metodologia de quimioluminescência, protocolo até então por nós desconhecido.

Buscando sempre a sintonia entre o teste laboratorial e o diagnóstico clínico, este estudo comprovou a eficácia da adaptação da técnica, pioneira em laboratórios das Forças Armadas e criou-se, em 2004, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Brasília o protocolo com a dosagem rotineira da macroprolactina em todos os pacientes com hiperprolactinemia.

A metodologia mais utilizada na pesquisa da existência de quantidades significativas de macroprolactina é o estudo da recuperação após a precipitação com Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). A frequência do achado do predomínio da macroprolactina em pacientes com hiperprolactinemia se encontra na faixa de 25%⁽²¹⁾. A importância destes achados se prende ao fato de estas formas terem menor atividade biológica e estão associadas a casos assintomáticos ou oligosintomáticos e ao encontro de estudos de imagem normais. Desta maneira, em especial, em pacientes cujo quadro clínico não seja característico de hiperprolactinemia, a pesquisa da macroprolactina é fundamental. Em amostras positivas, estudos de imagens como ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada podem ser evitados, principalmente, em pacientes sem quadro clínico suspeito de hiperprolactinemia.

A dosagem da prolactina é um teste rotineiro em numerosas condições da prática clínica e o encontro de níveis elevados (hiperprolactinemia) pode desencadear outros protocolos diagnósticos mais complexos e de custo elevado.

A prolactina, do ponto de vista molecular, é um hormônio bastante heterogêneo, existindo em três formas principais em circulação: monômero de 23 KDa, dímero (Bigprolactina) com 45 KDa e macroprolactina (Big-big prolactina) de peso molecular acima de 150 KDa.

Em condições normais ou em pacientes com hiperprolactinemia sintomática, predomina na circulação a forma monomérica (acima de 90%). A macroprolactina é constituída, na maioria dos casos, por uma associação entre uma molécula de prolactina e uma imunoglobulina, o que leva a uma meia vida mais longa e atividade biológica menor, esta se encontra em praticamente todos os indivíduos, mas em concentrações pouco expressivas, em geral abaixo de 10% da prolactina geral circulante.

FISIOLÓGICO	FARMACOLÓGICO	PATOLÓGICO
Gravidez	TRH	Tumores hipofisários
Amamentação	Estrógenos	Lesão de haste-hipotálamo-hipofisário
Estímulo do mamilo	Neurolépticos	Sela vazia
Exercícios	Anti-hipertensivos	Insuficiência Renal Crônica
Estresse	Metoclopramida	Doenças Infiltrativas
Sono	Reserpina	Ovários policísticos
Período neonatal	Antidepressivos	Doença de Cushing

Quadro 1 - Principais fatores do aumento da prolactina

Diversos trabalhos relatam o encontro de pacientes com níveis elevados de prolactina sérica que, no entanto, são assintomáticos. Este indivíduos tinham em comum o fato de que a forma predominante de prolactina circulante era a macroprolactina.

A estrutura da macroprolactina relaciona-se com a presença de imunoglobulinas em circulação e que se ligam a prolactina formando um imunocomplexo alterando as propriedades funcionais, tornando-se menos disponível para a ligação com os receptores específicos, diminuindo a atividade biológica, porém aumentando a sua meia vida na circulação e, sendo detectado por equipamentos de auto-

Recebido em 09/05/2005
Aprovado em 22/12/2005

*Oficiais Farmacêuticos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Brasília – Ministério da Defesa – Exército Brasileiro

mação na dosagem da prolactina, causam um considerável aumento nas suas dosagens.

MATERIAIS E MÉTODOS

O método de referência para a quantificação da macroprolactina é a cromatografia líquida em coluna de gel filtração, porém é um método trabalhoso, demorado e alto custo. Uma metodologia de triagem detecção da presença de macroprolactina em quantidades significativas em pacientes com hiperprolactinemia, necessita de que seja simples, específica e de baixo custo, porém com boa reprodutibilidade com método de referência.

Na busca desta metodologia de triagem, buscou-se a adaptação da técnica de precipitação pelo PEG 6000 ao método de quimioluminescência, onde a exposição de complexo imunoglobulina-prolactina a concentrações definidas de polietilenoglicol causa a insolubilidade do mesmo.

Foram utilizados neste estudo os equipamentos Immulite 2000 (DPC laboratories) e ADVIA Centaur (Bayer), para as determinações da prolactina pelo método de quimioluminescência. A precipitação do soro foi efetuada utilizando-se uma solução a 25% de Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) Merck Ref. S 37510315.

Como faixa de corte na eleição dos pacientes a serem dosados, foi definido o dobro da concentração limite da faixa de referência utilizada neste laboratório, ou seja 58 ng/ml para mulheres e 34 ng/ml para homens.

Preparo do reagente de precipitação:

Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) Merck (S 37510315) a 25%
- Preparar 10 ml de solução utilizando 2.5 g de PEG para 10 ml de água destilada (válido por 3 meses em temperatura de 2 a 8 °C).

Após a dosagem da prolactina, pelo método de quimioluminescência, e sendo confirmada a hiperprolactinemia prepara-se a amostra:

Precipitação das cadeias pesadas:

PEG 6000 a 25%0,200 mL
Soro0,200 mL

- Homogenizar em vórtex por 1 minuto.
- Centrifugar a cerca de 2500 rpm por 20 minutos.
- Dosar a prolactina no sobrenadante.

Cálculo da recuperação:

$\frac{\text{Prolactina do sobrenadante}}{\text{Prolactina Total}} \times 100 = \% \text{ de recuperação}$

Valores de referência:

- Maior que 60% - Negativo para macroprolactina
- Entre 30 e 60% - Indeterminado
- Menor que 30% - Positivo para macroprolactina

OBS. Os valores considerados como indeterminados devem ser submetidos a dosagem por cromatografia em coluna de gel ou a diagnóstico de imagem.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A aplicação rotineira do teste de precipitação com polietilenoglicol, na pesquisa da macroprolactina, tem revelado números surpreendentes. Ao longo de 12 meses de acompanhamento em um total de 3406 dosagens de prolactina, realizou-se a pesquisa em todas as amostras com níveis de prolactina superiores ao dobro do limite superior da faixa de referência, com 181 amostras (5,3 % do total). Destas, 84 amostras (46,4%) apresentaram recuperações acima de 60%, com o predomínio da forma monomérica. Recuperações inferiores a 30%, ou seja, positivas para macroprolactina, foram encontradas em 71 amostras, 39,2 % do universo pesquisado. Resultados indeterminados, com recuperação entre 30 e 60%, somaram 26 amostras, ou 14,4%, que foram encaminhadas ao serviço de diagnósticos por imagens.

Recuperação	Acima de 60% (Negativas)	Abaixo de 30 % (Positivas)	Entre 30 e 60 % (Indeterminadas)	Total
Amostras	84 (46.4 %)	71 (39.2 %)	26 (14.4%)	181 (100 %)

Quadro 2: Resumo dos resultados obtidos

CONCLUSÃO

A diferenciação dos casos de hiperprolactinemias assintomáticas, através da precipitação pelo polietilenoglicol (PEG 6000), ajuda a definir o quadro clínico em mais de 85 % dos casos analisados, a um custo muito baixo, evitando-se encaminhamentos desnecessários de pacientes a estudos de imagens (tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear), o que desonera o sistema de saúde e agiliza o diagnóstico destes casos.

REFERÊNCIAS

1. BANDEIRA, F. – Endocrinologia e Diabetes. – Medsi, 2003; 5: 75-77; 8: 106-15.
2. BJORO T., MOKRID, L., WERGELAND R., TURTER A., KVISTBORG A., SAND T. et al. Frequency of hyperprolactinemia due to large molecular weight prolactin (150 – 170 KDa PRL). Scand J Clin Lab Invest 1995; 55: 139-47.
3. BONHOFF, A., VUILLE J.C., GOMEZ, F., GELLERSEN, B. Identificativo de macroprolactin in a patient with asymptomatic hyperprolactinemia as a stable Prl-IgG complex. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1995; 103: 252-5.
4. CAMPINO, C., TORRES, C., AMPUERO S., DIAZ S., GONZALES G.B. SERON-FERRE, M. – Bioactivity of prolactins isoforms: lactation recovery of menses in nursing women. Human Reprod 1999; 14:989-905.
5. CAVACO, B., PRAZERES, S., SANTOS, M.A., SOBRINHO L.G., LEITE V., Hyperprolactinemia due to big, big prolactin is differently detected by commercially available immunoassays. J. Endocrinol Invest 199; 22: 203-8.
6. CAVACO, B., LEITE, V., SANTOS, M.A., ARRANHADO, E., SOBRINHO, L.G., Some forms of big-big prolactin behave as a complex of monomeric prolactin with na immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 2342-6.
7. CORONHO, V., PETROIANN A., SANTANA E.M., PIMENTA L.G. – Tratado de Endocrinologia e Cirurgia Endócrina. Guanabara Koogan, 2001: 34; 293-301.
8. CRUZ, T. Hyperprolactinemia: challenges in diagnosis. In; COUTINHO, E.M. and SPINOLA, P. (ed) Current knowledge in reproductive medicine, Elsevier, Amsterdam, 2000; pp 417-24.
9. FAHIE – WILSON M.N., SOULE S. G., Macroprolactinaemia: a contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. Ann Clin Biochem 1997; 34: 252-8.
10. FAHIE-WILSON, M., BRUNDSSEN, P., SURREY, J., EVERITT, A., Macroprolactin and Roche Elecsys prolactin assay; characteristics of the reaction and detection by precipitation with polyethyleneglycol. Clin Chem 2000; 46;

- 1993-5.
11. FAHIE-WILSON, M., Detection os macroprolactin causing hyperprolactinemia in commercial assays for prolactin. *Clin Chem* 2000; 46: 2022-3.
 12. GLEZER A., DALVA, C.B. BRONSTEIN, M.D., VIEIRA, J.G.H., Macroprolactinemia e incidetaloma hipofisário. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2001; 45:190-8.
 13. GUAY A. T. SABHARWAL P., VARMA S., MALARKEY W.B., Delayed diagnosis of psychological erectile disfunction because of the presence of macroprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1996: 81: 2512-4.
 14. HANACHE, O.M.G., ROCHA A.J., MAIA JÚNIOR, A.C.M., MACIEL, R.M.B., VIEIRA J.G.H., Screening for prolactinaemia may prevent unnecessary pituitary imaging studies. *Clin Endocrinol*, in press.
 15. HATTORI N., INAGAKI C., Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia bioassay and clearance studies of PRL- immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3107-10.
 16. HATTORI, N., IKEKUBO, K., ISHIBARA T., MORIDERA K., HINO, M., KURABACHI, H., Correlation of antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 438-45.
 17. JACKSON R.D., WORTSMAN J., MARALKEY W.B., Characterization of a large molecular weight prolactin in wimen with idiopathic hyperprolactinemia and normal menses., *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 258-64.
 18. JOHN, R., McDOWELL, I.F.W., SCANLON, M.F., SCALON, M.F., ELLIS, A.R., Macroprolactin reactivities in prolactin assays: na issue for clinical laboratories and equipment manufacturers. *Clin Chem* 2000; 46: 884-5.
 19. LARREA F., VILLANUEVA C., CRAVIOTO M.C., ESCORZA A. DEL REAL, O., Futher evidence that big,big prolactin is preferentially secreted in womem with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *Fertil steril* 1985; 44: 25-30.
 20. LEITE, V., COSBY H., SOBRINHO L.G., FRESNOZA, A., SANTOS, M.A., FRIESEN, H.G., Characterization of big,big prolactin in patients with hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol* 1992; 37: 365-72.
 21. LESLIE H., COURTNEY C.H., BELL, P.M., HADDEN D.R., McCANCE D.R., ELLIS, P.K. et al. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a single polyethylenegcol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2743-6.
 22. LINDSTEDT G., Endogenous antibodies against prolactin – a “new” cause of hyperprolactinemia. *J Eur Endocrinol* 1994; 130: 429-32.
 23. SINHA Y. N. – Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance, *Encr. Ver.* 1995: 16: 354-69.
 24. SUSH H.K., FRANTZ A.G. Size heterogeneity of human prolactin in plasma en pituitary extracts. *J.Clin. Endocrinol. Metab* 1974; 39: 928-35.
 25. VIEIRA J.G.H., TACHIBANA T.T., OBARA L.H. MACIEL R.M.B., extensive experience and validation of polyethylenegcol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1998; 44: 1758-9.
 26. VIEIRA, J.G.H. – Macroprolactina . – *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 2002: 1-9.
 27. VIEIRA, J.G.H., NISHIDA, S.K., LOMBARDI, M.T., KASAMATSU, T.S., desenvolvimento de um método imunofluorimétrico para a dosagem de prolactina sérica e identificação das isoformas circulantes. *Arq. Bras Endocrinol Metab* 1996; 40: 1987-92.
 28. VILAR, L. – *Endocrinologia Clínica. Medsi*, 2001; 3: 23-30.
 29. WHITTAKER P.G., WILCOX T., LIND T., Maintened fertility in a patiente with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Edocrinol Metab*, 1981; 53: 863-6.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Alberto Magno Lobo Colares
SQS, 209/503 - Bl. K
CEP: 70272-110 - Brasília - DF
E-mail: lobocolares@yahoo.com.br



IFCC WORLDBLAB
Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Controle externo da qualidade dos diagnósticos citológicos no rastreamento do câncer cervical: estudo piloto*

External quality control in the cytologic diagnosis in screening cervical cancer: pilot study

Rita G. Amaral¹, Nadja L.A. Souza², Suelene B. N. Tavares², Edna J.C. Manrique², Deina Z. Assem³,
Lucília L. Azevedo³, Raniara C.F. Queiroz³, Raquel C. Freitas³ & Gislaïne A. Fonsechi-Carvasan⁴

RESUMO - Todos os sistemas de avaliação do desempenho dos Laboratórios de Citopatologia exigem um programa de controle interno e externo da qualidade. Este estudo tem por objetivo avaliar a concordância dos diagnósticos citopatológicos do Laboratório Rômulo Rocha com os diagnósticos da Unidade de Monitoramento Externo da Qualidade (UMEQ), bem como, avaliar a frequência de casos discordantes, falso-positivos e falso-negativos. Foram enviados a UMEQ 537 esfregaços selecionados pelo sistema SISCOLO durante o ano de 2003, incluindo todos os casos positivos, todos os insatisfatórios e no mínimo 5% dos exames negativos. Apenas seis casos foram considerados discordantes pela UMEQ, dos quais três casos foram considerados negativos pelo Rômulo Rocha, destes, dois foram reavaliados como ASC e um como ASC/AG, um caso negativo foi reavaliado como insatisfatório, um caso de NIC 2/HPV foi reavaliado como ASC e um caso de NIC 1/HPV reavaliado como NIC 2/HPV pela UMEQ. A concordância diagnóstica entre o Rômulo Rocha e a UMEQ foi de 0,99 de acordo com o coeficiente Kappa. Este estudo mostrou estrito controle interno da qualidade desenvolvido no Laboratório Rômulo Rocha. Sua prática pode ser útil para orientar diversas medidas de educação continuada.

PALAVRAS-CHAVE - Controle de Qualidade, câncer cervical, falso-negativo, falso-positivo.

SUMMARY - Systems of laboratory development assessment in cytopathology require an intern and external quality control. The aim of the present study was to assess concordance of cytopathologic diagnosis in the Laboratory Rômulo Rocha with cytopathologic diagnosis carried out in the External Quality Control Unit (UMEQ), as well as to evaluate frequency of discordant cases, false-positive and false-negative. For this, 537 smears were randomly selected by SISCOLO throughout the year 2003, including all positive and unsatisfactory cases and at least 5% of the negative ones. Only six discordant cases were detected. Three of these cases were considered negative by Rômulo Rocha, two were rescreened as ASC and one case was rescreened ASC/AG, one negative case was rescreened as unsatisfactory, one case NIC 2/HPV was rescreened as ASC and another case NIC 1/HPV was rescreened as NIC 2/HPV by UMEQ. The diagnostic agreement between Rômulo Rocha and UMEQ was 0.99 according to kappa coefficient. Results of the study reveal that the Rômulo Rocha uses a very strict quality control, which can be helpful in guiding students in continued education programs.

KEYWORDS - Quality control, cervical cancer, false-negative, false-positive.

INTRODUÇÃO

O exame de citopatológico é o método mais utilizado em programas de rastreamento do câncer do colo do útero por ser simples, barato, seguro e aceitável, tendo como principal objetivo identificar lesões pré-malignas e malignas bem como auxiliar no diagnóstico de infecções genitais e outras entidades benignas (Vooijs *et al.*, 1996; Zeferino, 1996; WHO, 1998).

No entanto, a literatura tem mostrado que existem aproximadamente 2% a 62% de resultados falso-negativos e as principais causas são atribuídas erros na coleta de material, no escrutínio do esfregaço ou na interpretação dos diagnósticos (Gay, 1985; Koss, 1989; Bosch *et al.*, 1992; Mitchell & Medley, 1995).

Em países onde programas de rastreamento são bem estruturados e organizados, taxas de incidências e mortalidade por câncer do colo uterino são reduzidas, mas para isso são de fundamental importância um monitoramento sistemático do desempenho e acurácia. Tem sido mostrado que programas de controle interno e externo da qualidade podem melhorar a eficácia e acurácia dos diagnósticos do rastreamento cervical (CDC, 1992).

Dentre os métodos de garantia interna da qualidade dos exames citopatológicos o universalmente utilizado é a revisão aleatória de 10% dos resultados negativos no escru-

tínio de rotina (Kraemer, 1989; CDC, 1992; Melamed & Flehinger, 1992).

Recentes estudos mostram outra abordagem para a redução de falso-negativos. O método consiste em revisão rápida de 100% dos exames citopatológicos negativos no escrutínio de rotina. De todos os métodos manuais de revisão, este é o que parece apresentar melhor desempenho na detecção de falso-negativos e também melhor relação custo benefício (Hutchinson, 1996; Faraker & Boxer, 1996; Diehl & Prolla, 1998, Amaral *et al.*, 2003).

Programas de controle externo da qualidade também foram implementados visando melhoria no diagnóstico citopatológico. Na Itália foi realizado um programa de controle externo da qualidade com a participação de sete laboratórios e identificou uma grande variabilidade entre os observadores. Para adequação da amostra houve uma variação do Kappa entre 0.01 e 0.29 e para anormalidades epiteliais uma variação entre 0.53 e 0.78 (Cocchi, *et al.*, 1996).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza que todos os laboratórios que realizam os exames citopatológicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) devem submeter-se ao Sistema de Monitoramento Externo da Qualidade (Brasil, 2002). Para o monitoramento externo, são selecionadas no mínimo 10% do total dos exames realizados, obedecendo aos critérios: todas as lâminas positivas, todas as lâminas insatisfatórias e no mínimo de 5% dos exames normais (Brasil, 2002).

Recebido em 22/06/2005

Aprovado em 20/12/2005

Trabalho Vencedor do Prêmio PNCC de 2005

*Laboratório Rômulo Rocha da Faculdade Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

¹Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás

²Citologistas do Laboratório Rômulo Rocha/Faculdade de Farmácia-UFG

³Alunas do VII de Especialização em Citologia Clínica/Faculdade de Farmácia-UFG

⁴Estatística do CAISM-UNICAMP

Em resumo, um dos maiores problemas enfrentados pelos laboratórios de citopatologia é o número elevado de resultados falso-negativos, e um dos principais motivos é variabilidade inter-observador, principalmente nos diagnósticos limítrofes. É importante identificar as principais causas de erros e divergências de diagnósticos, para que através de um treinamento e educação continuada os profissionais possam uniformizar os critérios citológicos, atualizar e melhorar o desempenho no diagnóstico das lesões pré-malignas e malignas. Este estudo tem por objetivo avaliar o desempenho do Laboratório Rômulo Rocha, comparando os resultados dos diagnósticos citopatológicos com os resultados da Unidade de Monitoramento Externo da Qualidade (UMEQ) bem como, avaliar a frequência de casos discordantes, falso-positivos e falso-negativos.

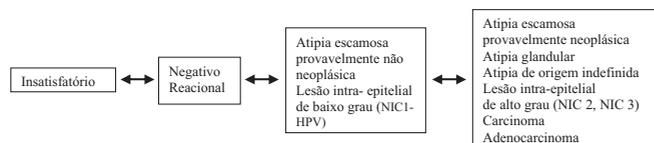
MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo teve como base a população feminina usuária do Sistema Único de Saúde (SUS) de Goiânia que se submeteram ao exame citopatológico realizados no Laboratório Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia-UFG no ano de 2003. Na rotina do Laboratório são adotados os seguintes critérios de revisão como controle interno da qualidade: 1- esfregaços positivos, 2- esfregaços com critérios clínicos relevante e exames prévios alterados, 3- revisão rápida de 100% dos esfregaços negativos, 5- esfregaços insatisfatórios.

A casuística deste estudo foi de 537 esfregaços citopatológicos, cujas lâminas selecionadas com os respectivos laudos foram encaminhados para a Hospital das Clínicas/UFG-UMEQ, incluindo todos os casos positivos, todos os casos insatisfatórios e no mínimo 5% dos exames negativos, selecionados aleatoriamente, devendo atingir no mínimo 10% do total de exames realizado, de acordo com o Sistema de Informação Laboratorial do Programa Nacional de Combate ao Câncer do Colo Uterino- SISCOLO-Qualidade (BRASIL, 2002). Pelo critério de seleção foram selecionados 223 esfregaços negativos, 113 insatisfatórios, 63 ASC, dois ASC/AG, 95 NIC 1/HPV, 31 NIC2/HPV, seis NIC3/HPV/AG, três AG e um carcinoma invasor.

Foram considerados discordantes os casos em que houve mudança de conduta clínica, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde/Instituto Nacional do

Câncer (MS/INCA), conforme demonstrado abaixo:



Para a avaliação de ocorrência de falso-negativos e falso-positivos foi utilizada a classificação de erros de diagnósticos em citopatologia, proposta pela equipe do Ministério da Saúde do Canadá (Anderson, *et al*, 1987; Walton, 1976): Falso-negativo: diagnóstico inicial de material inadequado, citologia normal ou inflamatória e a revisão como diagnóstico de NIC 3 (Lesão de alto grau) ou invasor.

Falso-positivo: diagnóstico inicial de NIC (Lesão escamosa) e/ou invasor e a revisão como diagnóstico de citologia normal ou inflamatória.

Para a análise de dados foi utilizado o programa "SAS for Windows" (SAS, 2001). A magnitude da concordância entre os diagnósticos realizados pelo laboratório Rômulo Rocha e

pela UMEQ foi mensurada pelo coeficiente Kappa com seus respectivos intervalos de confiança de 95% e classificado da seguinte forma: menor que 0- concordância péssima; de 0 a 0.2- concordância ruim; de 0.2 a 0.4- concordância razoável; de 0.4 a 0.6- concordância boa; de 0.6 a 0.8- concordância muito boa e de 0.8 a 1,0- excelente (Landis, 1977).

RESULTADOS

Dos 537 esfregaços revisados, observou-se uma discordância para os diagnósticos negativos em quatro casos e insatisfatórios em apenas um caso. Para os diagnósticos classificados como ASC ou ASC/AG houve discordância em quatro caso e para as neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) houve apenas um caso de discordância para NIC 1 (Tabela I).

TABELA I
Frequência dos diagnósticos dos Laboratórios Rômulo Rocha e UMEQ

Diagnóstico	Laboratório R Rocha		UMEQ	
	n	%	n	%
Negativo	223	41,5	219	40,8
Insatisfatório	113	21,0	114	21,2
ASC	63	11,7	66	12,3
ASC/AG	02	0,4	03	0,6
NIC1/HPV	95	17,7	94	17,5
NIC2/HPV	31	5,8	31	5,8
NIC3/HPV/AG	06	1,1	06	1,1
AG	03	0,6	03	0,6
Ca	01	0,2	01	0,2
Total	537	100	537	100

ASC: Células Escamosas Atípicas
NIC 1: Neoplasia intra-epitelial cervical - grau 1
NIC 2: Neoplasia intra-epitelial cervical - grau 2
NIC 3: Neoplasia intra-epitelial cervical - grau 3
AG: Atípia Glandular
Ca: Carcinoma invasor

Observaram-se seis casos discordantes, destes, três casos classificados como negativos pelo Laboratório Rômulo Rocha dois foram reavaliados como ASC e um como ASC/AG pela UMEQ, um caso classificado como negativo foi reavaliado como insatisfatório, um caso classificado como NIC 2/HPV foi reavaliado como ASC e um caso classificado como NIC 1/HPV foi reavaliado como NIC 2/HPV pela UMEQ. Não foram observados casos falso-negativos ou falso-positivos. A concordância diagnóstico entre o Laboratório Rômulo Rocha e a UMEQ foi de 0,99 de acordo com o coeficiente Kappa (Tabela II).

TABELA II
Concordância dos diagnósticos citopatológicos entre os Laboratórios Rômulo Rocha e UMEQ

Lab. R. Rocha	UMEQ									Total
	Neg	Insat	ASC	ASC/AG	NIC1/HPV	NIC2/HPV	NIC3/HPV/AG	AG	Ca	
Neg	219	01	02	01						223
Insat		113								113
ASCUS			63							63
ASC/AG				02						02
NIC 1/HPV					94	01				95
NIC 2/HPV			01			30				31
NIC 3/HPV/AG							06			06
AG								03		03
Ca									01	01
Total	219	114	66	03	94	31	06	03	01	537

Coefficiente Kappa: 0,99 (0,97 a 1,00) IC 95%
Neg: Negativo para malignidade
Insat: Insatisfatório
ASC: Células Escamosas Atípicas
NIC 1: Neoplasia intra-epitelial cervical - grau 1
NIC 2: Neoplasia intra-epitelial cervical - grau 2
NIC 3: Neoplasia intra-epitelial cervical - grau 3
AG: Atípia Glandular
Ca: Carcinoma invasivo

Segundo normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde/Instituto Nacional do Câncer (MS/INCA), a UMEQ terá no máximo 90 dias, a contar do recebimento do material, para a conclusão da avaliação, devolução das lâminas e elaboração de relatório de avaliação do laboratório de origem. Neste estudo observou-se que o tempo de devolução dos esfregaços enviados para UMEQ foi em média de 11 meses (Tabela III).

TABELA III
Tempo de devolução dos esfregaços enviados para a UMEQ

Variável	n	Média meses	Desvio padrão	Percentil 25%	Mediana	Percentil 75%
Tempo Devolução	537	11,10	2,37	9,30	11,57	11,83

DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que os diagnósticos citopatológicos do Rômulo Rocha/UFG em relação aos diagnósticos citopatológicos emitidos pela UMEQ não apresentaram divergências significativas, o nível de concordância entre os Laboratórios foi considerado excelente de acordo com o coeficiente Kappa que foi de 0,99%. Nenhum caso falso-negativo, falso-positivo e discordância de mais de um grau foi observado. Apenas quatro casos classificados inicialmente como negativos foram reavaliados como: um insatisfatório, dois atípias em células escamosas e um atípia em célula escamosa e glandular.

Estudo recente mostrou que na avaliação do controle externo da qualidade a frequência de concordância foi de 86,62%; a discordância de um grau em 12,4% e a discordância de mais de um grau foi de 0,96% (Maeda, *et al.*, 2004).

Ainda, neste estudo, observou-se que o tempo de devolução das lâminas enviado para a UMEQ foi em média 11 meses. Diante deste longo período para a devolução, os casos discordantes não foram imediatamente corrigidos, o que prejudica o objetivo do monitoramento externo da qualidade, que é oferecer serviços de qualidade à população. Felizmente, não houve prejuízo para mulher, tendo em vista que, nenhum caso falso-negativo ou falso-positivo e discordância de mais de um grau foi detectado. No entanto, esforços devem ser feitos para que as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde sejam cumpridas para que a população não fique prejudicada.

Diversos autores têm destacado a importância da revisão dos esfregaços negativos como estratégia para monitoramento interno da qualidade (Jones, 1995; Collaço, 2002; Maeda, *et al.*, 2004). O monitoramento externo da qualidade e a revisão dos esfregaços negativos são exercícios eficientes de educação continuada e permitem entender melhor a causa de diagnósticos incorretos ou discordantes, bem como planejar formas de melhorar o desempenho do laboratório (Pittoli *et al.*, 2003; Maeda, *et al.*, 2004).

Este estudo poderá também, servir de subsídio no sentido de avaliar o desempenho da equipe, bem como, motivar outros laboratórios para a implementação do controle interno da qualidade e educação continuada, visando principalmente a uniformização de critérios. Conseqüentemente diminuirá as taxas de resultados falso-negativos e falso-positivos, que é um dos maiores problemas enfrentados na rotina de um laboratório. Em fim, entendemos que os resultados deste estudo traduzem também, um estrito controle interno da qualidade, que vem sendo desenvolvido pelas

profissionais especialistas em citologia clínica do Laboratório Rômulo Rocha.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos os funcionários do Laboratório Rômulo Rocha, em especial a coordenadora, Profa Joana D'arc X. Alcanfor, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, e ao aluno Diego David de Sousa Gouveia, pelo auxílio na digitação do banco de dados.

REFERÊNCIAS

- Amaral, R. G., Santos, S. H. R., Catharino, J. M., Silva, L. C. B., Westin, M. C. A., Cotta, A. C., Trevisan, M. A., Hardy, E., Zeferino, L. C. Revisão rápida de esfregaços cervicais como método de garantia interna de qualidade, J. Bras. Patol.Med. Lab., 39:151-155, 2003.
- Anderson, G. H. et al. A comprehensive internal quality control system for a large cytology laboratory. Acta Cytol, 31:895-9, 1987
- Baker, A. & Melcher, D. Rapid cervical cytology screening. Cytopathology, 2:299-301, 1991.
- Bosch, M.M.C.; Rietveld, S.P.E.M.; Boon, M.E. Characteristics of false negative smears. Acta Cytol, 36:711-6, 1992.
- Brasil. Instituto Nacional do Câncer.INCA: "Manual Técnico: Prevenção do câncer do colo do útero. Laboratórios, 2002. Disponível < http:// www.inca.gov.br > Acesso em 19 mar 2004.
- Center for Disease Control (CDC). Regulations for implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: a summary. M.M.W.R., 17p, 1992.
- Cocchi, V.; Sintoni, C.; Carretti, D.; Sama, D.; Chiari, V.; Segala, V.; Delazer, Grilli, N.; Papaleo, R.; Ghirardini, C.; Bucchi, L. External quality assurance in cervical cytology: Interlaboratory agreement in the Emilia-Romana region of Italy, Acta Cytol, 40:480-8, 1996.
- Collaço, L. M.; Monitoramento externo da qualidade em citopatologia cervico-vaginal, Curitiba, p.131, 2002. Disponível em <http://www.bases.bireme.br >. Acesso em 15 dez 2003.
- Diehl, A.R.S.& Prolla, J.C. Rapid rescreening of cervical smears for internal quality control. Acta. Cytol., 42:949-53, 1998.
- Faraker, C. & Boxer, M.E. Rapid review (partial rescreening) of cervical cytology. Four years experience and quality assurance implications. J. C. Pathol., 49:587-91, 1996.
- Gay, J.D.; Donaldson, L.D.; Goellner, J.R. False-negative results in cervical cytology studies. Acta. Cytol., 29:1043-6, 1985.
- Hutchinson, M.L. Assessing the costs and benefits of alternative rescreening strategies. Acta. Cythol., 40:4-8, 1996.
- Jones, B.A. Rescreening in gynecologic cytology. Arch. Pathol. Lab. Med., 119:1097-103, 1995.
- Koss, L. G. The Papanicolaou Test for Cervical Cancer detection. A Triumph and a Tragedy. Jama, 261:737-43, 1989.
- Kraemer, B.B. Quality assurance activities of the College of American Pathologist. Acta. Cytol., 33:343-8, 1989.
- Landis, J.R.& Koch, G.C. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, 33:159-74, 1977.
- Maeda, M. Y. S., Loreto, C. Barreto, E., Cavaliere, M. J. et al. Estudo preliminar do SISCOLOR-Qualidade na rede pública de São Paulo, J. Bras. Patol.Med. Lab., 40, 6, 2004.
- Melamed, M.R. & Flehinger, B.J. Reevaluation of quality assurance in the cytology laboratory. Acta. Cytol., 36:461-5, 1992.
- Mitchell, H. & Medley, G. Differences between Papanicolaou smears with correct and incorrect diagnoses. Cytopathol, 6:368-75, 1995.
- Pittoli, J.E.; Melo, E.S.; Pereira, S.M.M.; Maeda, M.Y.S.; Uttagawa, M.L.; Celestino, J.D.; Loreto, C.D. Revisão de esfregaços cervicais negativos em pacientes com lesões intra-epiteliais de alto grau. J.Bras. de Pat. e Med. Laboratorial. 39: 219-221, 2003.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT software changes and enhancements though release 8.2. ary, NC: SAS Institute, Inc. 1999-2001.
- Vooijs, G.P.; Nauwelaers, F.A.; Annik, E.R.P.; Van, A. V. Cytosafe-plus: a workstation for screening, supervision, reviewing, quality assurance and education in cytopathology. Acta. Cythol., 40:90-6, 1996.
- Walton, R. J. Cervical cancer screening programs V. Conclusions and recommendation of task force. Can Med Assoc J, 114:1003-33, 1976.
- World Health Organization (WHO). Manual on the Prevention and Control of Common Cancers. Regional Publications-Westerns Pacific Series, n° 20, 1998.
- Zeferino, L. C.; Costa, A. M.; Panneta, K.; Neves-Jorge, J. P. Screening da neoplasia cervical. Rev. Bras. Ginecol Obstret, 106: 415-9, 1996.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rita Goreti Amaral
Rua Lauro Jacques Qd 6 Lt 23, Apto 403, Setor Negrão de Lima
CEP-74 650-170, Goiânia - GO.
E-mail: amaral@farmacia.ufg.br

Avaliação de Lesões Intra-Epiteliais Escamosas e Microbiologia em exames citológicos realizados em um Laboratório de Porto Alegre, RS

Avaliation of squamous intraepithelial lesions and microbiology in cytologic smears in a laboratory of Porto Alegre, RS

Andréia Buffon¹; Mariema Civa² & Virgínia Frota de Matos³.

RESUMO - O exame citológico é um dos mais apropriados métodos de detecção de lesões pré-cancerosas e câncer de colo uterino. Um total de 11077 exames citológicos foi analisado do arquivo de um laboratório privado em Porto Alegre, RS, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2003. O objetivo do presente estudo foi determinar o padrão de lesões intra-epiteliais escamosas detectadas nestes exames citológicos. Dos exames analisados, 10769 (97,21%) apresentaram resultados dentro dos limites da normalidade, 115 (1,04%) apresentaram células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), 160 (1,44%) foram de lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL/HPV), 32 (0,29%) de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) e 2 (0,02%) apresentaram carcinoma de células escamosas. O maior índice de LSIL/HPV foi encontrado na faixa etária entre 15 e 24 anos, e o maior índice de HSIL foi encontrado na faixa etária entre 35 e 44 anos. Dos 309 exames alterados, quando comparados com a respectiva microbiologia, observou-se um predomínio de *Lactobacillus sp.* (43,7%). Nos casos de ASC-US, 46% tiveram como flora *Lactobacillus sp.*, seguido por 29% de outras floras. Nos casos de LSIL/HPV, também houve um maior índice de *Lactobacillus sp.* (45%), seguido por *Gardnerella vaginalis* (25,6%).

PALAVRAS-CHAVE - Citologia, Lesão Intra-Epitelial Escamosa, Processos Inflamatórios.

SUMMARY - The cytologic smear is one of the most appropriate methods of pre-cancerous and cervical cancer detection. A total of 11,077 cytologic smears from a private laboratory in Porto Alegre / RS - Brasil were analyzed, from January/2003 to December/2003. The purpose of this study was to determine the standard of squamous intraepithelial lesions detected on these smears. From the total analyzed, 10,769 (97.21%) were inside the normality levels, 115 (1.04%) showed atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), 160 (1.44%) low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL/HPV), 32 (0.29%) high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and 2 (0.02%) squamous cell carcinoma. The highest level of LSIL/HPV was found between the ages of 15 and 24, and, between 35 and 44, HSIL was predominant. From the 309 abnormal smears, when compared to respective microbiology, were observed the predominance of *Lactobacillus sp.* (43,7%). On the ASC-US cases, 46% had as flora *Lactobacillus sp.*, followed by 29% of other floras. Regarding the LSIL/HPV, also occurred a higher percentage of *Lactobacillus sp.* (45%), followed by *Gardnerella vaginalis* (25,6%).

KEYWORDS - Cytology, Squamous Intraepithelial Lesion, Inflammatory Process

INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero é a segunda causa de câncer em mulheres no mundo. Estima-se que a incidência em escala mundial seja cerca de 500.000 casos por ano, sendo a patologia responsável por 15% de todas as neoplasias invasoras diagnosticadas em mulheres¹⁹. A estimativa de incidência de neoplasia maligna de colo do útero, no Rio Grande do Sul, para o ano de 2003, foi de 19,89 casos para cada 100.000 mulheres¹².

A citologia cérvico-uterina é um dos exames mais apropriados de triagem para detectar lesões pré-cancerosas e câncer da cérvix. Ela permite a prevenção de cânceres invasivos por identificação de suas lesões precursoras, que podem estar presentes muitos anos antes de ocorrer invasão¹⁶. Para classificar as lesões pré-cancerosas, atualmente, pode-se utilizar uma associação entre o Sistema Bethesda, 2001²⁶, e a classificação de Richart, 1967²³, que relaciona lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) com neoplasia intra-epitelial cervical (NIC I) e infecção por HPV, e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) com NIC II e NIC III.

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) tem sido

descrita como fator necessário para a ocorrência do câncer de colo do útero. Entre os co-fatores que se associam a um elevado risco de desenvolver este câncer, se encontram: idade prematura do início da vida sexual, multiplicidade de parceiros, história de infecções sexualmente transmissíveis como co-infecção pelo HIV e infecção por *Trichomonas vaginalis*²¹ e tabagismo¹². Através de estudos da história natural do carcinoma do colo uterino, chegou-se ao consenso de que justamente no período da adolescência e da vida sexual ativa existem as maiores condições de instalação e desenvolvimento de atipias celulares devido à atividade biológica máxima da matriz celular cervical que, posteriormente, poderá evoluir para a formação de lesões neoplásicas propriamente ditas^{5,24}. Portanto, a estratégia atualmente reconhecida na prevenção desta neoplasia é a detecção precoce por meio do exame preventivo de Papanicolau realizado periodicamente¹².

A citologia tem também importante papel no reconhecimento das lesões inflamatórias, pois ela permite avaliar a intensidade dessas lesões e em alguns casos determinar o agente. A inflamação é o conjunto dos fenômenos reativos a qualquer agressão do tecido, seja bacteriana, viral, micótica, química ou física. No exame de Papanicolau, as lesões inflamatórias são identificadas pela migração de leucócitos

Recebido em 28/01/2005

Aprovado em 29/08/2005

¹Farmacêutica-Bioquímica, Especialista em Citologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC-RS.

²Farmacêutica-Bioquímica, Especialista em Citologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC-RS.

³Farmacêutica-Bioquímica, Especialista em Citologia e Hematologia, Docente do Curso de Especialização em Citologia Clínica da SBAC-RS e Docente/Coordenadora do Curso de Especialização em Citologia Clínica/UFRJ.

tos, macrófagos e plasmócitos para o local da inflamação, modificação da estrutura dos epitélios, por alterações morfológicas específicas ou não a determinado agente e eventual identificação do fator causal⁹.

A associação entre doenças malignas e os distúrbios inflamatórios inclui a incidência aumentada em alguns tipos de câncer. O estímulo crônico do crescimento induzido pelos fatores de crescimento liberados pelas células pode ter um importante papel na carcinogênese destas patologias. Outros fatores incluem o dano químico ou a mutação induzida por radicais livres produzidos pelas células inflamatórias, um agente oncogênico infeccioso e outros fatores desconhecidos que podem ter levado ao distúrbio inflamatório crônico¹¹.

O prognóstico de um paciente com câncer, além das condições inerentes ao próprio paciente, depende do diagnóstico precoce e do planejamento terapêutico correto. Dada a importância da citologia no diagnóstico precoce de lesões intra-epiteliais escamosas como forma de combater a alta incidência de câncer de colo de útero, este estudo objetivou avaliar o padrão de lesões intra-epiteliais escamosas bem como da microbiologia, a partir do arquivo de laudos citológicos de um laboratório privado em Porto Alegre, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2003.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados foram obtidos a partir de um levantamento do arquivo de Laudos Citológicos emitidos pelo Setor de Citopatologia do Laboratório Marques Pereira – Porto Alegre, RS, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2003. A coloração utilizada pelo laboratório para a leitura das lâminas, tanto para a citologia quanto para a microbiologia, foi a coloração de Papanicolaou. Foram analisados todos os Laudos Citológicos de pacientes acima de 15 anos, que apresentaram algum tipo de alteração em células escamosas, totalizando 11077 exames, e os resultados foram classificados segundo o Sistema Bethesda, 2001²⁶. As lesões intra-epiteliais escamosas foram relacionadas com a idade das mulheres e com a microbiologia. Os dados foram agrupados por faixa etária, de acordo com as idades, nos seguintes grupos: 15 a 24 anos; 25-34 anos; 35-44 anos; 45-54 anos; 55-64 anos e acima de 65 anos.

Os critérios utilizados no laboratório para classificar os resultados foram: negativo para lesão intra-epitelial escamosa ou malignidade, quando tanto células epiteliais escamosas quanto glandulares endocervicais apresentaram características morfológicas normais; ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado), quando as anormalidades celulares foram mais acentuadas que as encontradas para alterações inflamatórias ou reativas, mas com critérios insuficientes para concluir um diagnóstico de lesão intra-epitelial escamosa; LSIL/HPV (lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau/HPV), quando as células epiteliais escamosas maduras apresentaram alterações características tais como disqueratose, binucleação ou multinucleação, presença de coilocitos e citomegalia; HSIL (lesão intra-epitelial escamosa de alto grau) quando as células epiteliais escamosas se apresentavam imaturas acompanhadas de aumento da relação núcleo/citoplasma, hiper cromatismo nuclear com cromatina granulosa, contorno irregular da membrana nuclear, células dispostas em agregados do tipo sincício ou isoladas e grupos celulares coesos em fileira; carcinoma de células escamosas quando as células apresentavam todos os critérios de HSIL, mas além disso, presença de macronúcleos proeminentes, cromatina grosseiramente irregular, com aspecto de "tinta Nankin" e diátese tumoral.

RESULTADOS

Este estudo contou com os resultados de exame citológico preventivo de câncer de colo uterino de 11.077 mulheres, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2003, dos quais, 10768 exames (97,21%) apresentaram resultados citológicos negativos para lesão intra-epitelial escamosa ou malignidade, incluindo resultados dentro dos limites da normalidade e alterações reativas. Dos 309 exames citológicos alterados (2,79%), 115 (1,04%) foram classificados como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), 160 (1,44%) como lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL/HPV), 32 (0,29%) como lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) e dois casos (0,02%) como carcinoma de células escamosas (Tabela 1).

TABELA I
Distribuição dos resultados dos exames citológicos

	n	%
Negativo para malignidade	1076 9	97,21
ASC-US	115	1,04
LSIL/HPV	160	1,44
HSIL	32	0,29
Carcinoma de células escamosas	02	0,02
Total	1107 7	100

ASC-US - células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL/HPV - lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; HSIL - lesão intra-epitelial escamosa de alto grau.

O maior índice de ASC-US foi encontrado na faixa etária entre 25 e 34 anos, LSIL/HPV entre 15 e 24 anos, HSIL na faixa etária entre 35 e 44 anos, e dos dois casos encontrados de carcinoma de células escamosas, um esteve entre 35 e 44 anos e o outro, acima de 65 anos de idade (Tabela 2).

TABELA II
Distribuição dos resultados dos exames citológicos por faixa etária

Resultados Citológicos	Período: Janeiro/2003 a Dezembro/2003						Total
	Faixa Etária						
	15 – 24	25 – 34	35 – 44	45 – 54	55 – 65	Acima 65	
ASC-US	30	36	30	10	07	02	115
LSIL / HPV	78	46	23	09	04	00	160
HSIL	03	10	15	03	01	00	32
Carcinoma de Células Escamosas	00	00	01	00	00	01	02

ASC-US - células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL/HPV - lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; HSIL - lesão intra-epitelial escamosa de alto grau.

Quando comparadas as lesões intra-epiteliais escamosas com a microbiologia (Tabela 3), dos 309 exames alterados, a maioria, 135 casos (43,7%) teve como flora *Lactobacillus sp.* Dos casos de ASC-US, 46% tiveram como flora *Lactobacillus sp.* seguido por 29% de outras floras. Nos casos de LSIL/HPV, também houve um maior índice de *Lactobacillus sp.* (45%), seguido por *Gardnerella vaginalis* (25,6%).

TABELA III
Distribuição dos resultados dos exames citológicos e microbiologia

Resultados Citológicos	Período: Janeiro/2003 a Dezembro/2003						Total
	Microbiologia						
	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Trichomonas vaginalis sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Outras floras*	Flora Ausente/não identificada	
ASC-US	53	03	02	18	34	05	115
LSIL / HPV	72	04	05	41	37	01	160
HSIL	09	00	00	11	12	00	32
Carcinoma de Células Escamosas	01	00	00	00	01	00	02

*Outras floras incluem: flora mista, flora bacilar, flora cocóide e flora cocobacilar. ASC-US - células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL/HPV - lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; HSIL - lesão intra-epitelial escamosa de alto grau.

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi realizado um levantamento das lesões intra-epiteliais escamosas diagnosticadas somente pelo método citológico convencional, que se baseia na observação, identificação e classificação de células com características pré-malignas e malignas, não utilizando outros métodos diagnósticos como colposcopia e biópsia para avaliação das lesões escamosas. Dos 11077 resultados analisados (tabela 1), o número de citologias negativas para malignidade foi de 10769 (97,21%) e 309 casos (2,79 %) tiveram citologia alterada. Destes casos alterados, 115 (1,04%) foram de ASCUS, 160 (1,44%) foram de LSIL/HPV, 32 casos (0,29%) foram de HSIL e 2 (0,02%) foram de carcinoma de células escamosas. Estes resultados, em sua maioria, estão em concordância com os dados encontrados na literatura^{10,28}.

Nossos resultados demonstram que aproximadamente 70% dos casos de LSIL/HPV atingem mulheres até 34 anos (Tabela 2). Segundo Bosch, 1999, é esta a faixa etária com maior número de infecção primária pelo HPV. A maior prevalência de HSIL ficou na faixa de 35-44 anos, o que também está consistente com dados da literatura, pois é a infecção persistente por HPV a principal causa de câncer de colo^{6,17}, o que só acontece após uma infecção primária não detectada ou não curada²⁹.

A infecção por microorganismos como *Trichomonas vaginalis*, pode prejudicar o diagnóstico de lesões pré-malignas tais como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) ou mesmo de LSIL/HPV, por causar um processo inflamatório que leva a um aumento do volume nuclear, halo perinuclear, bi- ou multinucleação e ainda disqueratose²⁰. No presente estudo, quando comparados todos os casos de citologias alteradas com a sua respectiva microbiologia, 135 casos (43,7%), apresentaram flora de *Lactobacillus sp.*, ou seja, uma flora normal. Nos casos de ASCUS e LSIL/HPV a flora predominante foi de *Lactobacillus sp.*, portanto, como a maioria das floras nestes casos foi considerada como normal, a identificação destas lesões não sofreu interferência de floras inflamatórias, que poderiam levar a resultados falso-positivos.

Na sua fase aguda, a infecção por *Trichomonas vaginalis* causa uma leucorréia devido a vulvovaginite, apresentando uma secreção espumosa, amarela ou cinza e mucopurulenta²². Nas infecções crônicas os sintomas são geralmente leves, com prurido e dispáuremia, secreção vaginal escassa e misturada com muco¹⁸. Alguns estudos levantam a possibilidade deste parasita ser um agente etiológico de lesões pré-malignas e de possível evolução para câncer cervical, tendo em vista a detecção de anticorpos deste parasita no soro de pacientes com câncer cervical, como também, fatores de separação celular, que favorecem a evolução do câncer³⁰. Por outro lado, muitos autores acreditam que este protozoário é um agente causador de uma simples inflamação, supondo que tecidos com lesões malignas sejam meio de crescimento que favorece a infecção por *Trichomonas vaginalis*¹³. Em nosso estudo, realizamos um levantamento da microbiologia apresentada nos casos alterados, mas não foi constatada nenhuma relação entre este parasita e lesões escamosas. Dos 309 casos encontrados como alterados, apenas 7(2,3%) tiveram como flora *Trichomonas vaginalis*, sendo 3 encontrados nos casos de ASCUS e 4 nos casos de LSIL/HPV.

Gardnerella vaginalis é uma das bactérias mais frequentemente implicadas como causadoras de vaginites inespecíficas, que são caracterizadas pelo aumento da secreção va-

ginal, porém sem a presença de uma inflamação significativa²⁷. O grande número de pacientes que apresenta floras inflamatórias, mostra a importância deste exame para evidência de problemas menos graves, como infecção bacteriana e por outros agentes patogênicos, mas que também merecem importância no seu tratamento. Neste estudo, entre os 309 casos de citologias alteradas, o maior índice de *Gardnerella vaginalis* foi observado nos casos de LSIL/HPV (25,6%).

Devido à sua simplicidade, reprodutibilidade e baixo custo, o diagnóstico citopatológico periódico tem se mostrado de grande utilidade para triagem do câncer de colo uterino em grandes populações⁹. Entretanto, este método apresenta uma alta taxa de falsos negativos na detecção do câncer cervical e suas lesões precursoras, de 6 a 68%^{8,15}. Outros métodos diagnósticos têm sido utilizados para detecção do HPV, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) e captura híbrida para DNA do HPV, (Digene Diagnostics Inc., Silver Spring, MD). Estes testes, quando estudados isoladamente, não têm mostrado uma maior eficiência que o exame citológico convencional², sendo recomendado como um teste secundário, em casos de ASC-US¹. Considerando que a infecção persistente por HPV é um dos fatores de risco mais altos para o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e câncer^{6,17}, muitos estudos têm sugerido que a combinação do exame citológico com testes de detecção do DNA do HPV, aumenta a eficiência no diagnóstico do câncer cervical, principalmente em mulheres com idade acima de 30 anos^{4, 7,14, 25}.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório Marques Pereira, Porto Alegre, RS, por disponibilizar os resultados para análise.

REFERÊNCIAS

1. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES). Management of a patient with an abnormal cervical smear. Service Recommandations et Références Professionnelles et Service Evaluation Economique. Paris (France): ANAES, p. 1-92, 2002.
2. Bergeron C.; Jeannel D.; Poveda J-D; Cassonnet P.; Orth G. Human Papillomavirus Testing in Women With Mild Cytologic Atypia Obstet Gynecol, 95:821-827, 2000.
3. Bosch FX. The worldwide prevalence of HPV. HPV Summit, 9 p., 1999.
4. Bren L. Cervical cancer screening. FDA Consum, 38:36-37, 2004.
5. Brinton L.A.; Fraumeni J.F. Epidemiology of uterine cervical cancer. J Chron Dis, 39: 1051-1065, 1986.
6. Clavel C.; Masure M.; Bory J.P.; Putaud I.; Mangeonjean C.; Lorenzato M.; Nazeyrollas P.; Gabriel R.; Ouereux C.; Birembaut P. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesion: a study of 7932 women. Br J Cancer, 84:1616-1623, 2001.
7. Ferreccio C.; Bratti M.C.; Sherman M.E.; Herrero R.; Wacholder S.; Hildesheim A.; Burk R.D.; Hutchinson M.; Alfaro M.; Greenberg M.D.; Morales J.; Rodriguez A.C.; Schussler J.; Eklund C.; Marshall G.; Schiffman M. A Comparison of Single and Combined Visual, Cytologic, and Virologic Tests as Screening Strategies in a Region at High Risk of Cervical Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 12:815-823, 2003.
8. Gay J.D.; Donaldson L.D.; Goellner J.R. False-negative results in cervical cytology studies. Acta Cytol, 29:1043-1046, 1985.
9. Gompel C.; Koss L.G. Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclínicas. 1a ed. São Paulo, Manole, p. 79-105, 1997.
10. Haas P.; Gonçalves F.T.; Schlatter H.E.; Ratchitzki L. Avaliação do preventivo de câncer de colo de útero em laboratório com atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e laboratório com atendimento de convênios, na cidade de Florianópolis. RBAC, 31:21 - 24, 1999.

11. Henry J. B. Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais, 18a ed. São Paulo, Manole, 1995.
12. Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde. Câncer do colo do útero. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003> Acesso em 2004 maio 18.
13. Koss L.G.; Wolinska, W. *Trichomonas vaginalis* cervicites and its relationship to cervical cancer. *Cancer*, 12:1171-1184, 1959.
14. Lee K.J.; Lee J.K.; Saw H.S. Can human papillomavirus DNA testing substitute for cytology in the detection of high-grade cervical lesions? *Arch Pathol Lab Med*, 128:298-302, 2004.
15. Lee K.R.; Manna E.A.; St John T. Atypical endocervical glandular cells: accuracy of cytologic diagnosis. *Diagn Cytopathol*, 13:202-208, 1995.
16. Leroy J.L.; Boman F. Cervical smears: towards an optimal screening for cervical cancer. *Presse Med*, 32:174-180, 2003.
17. Meijer C.J.L.M. The rationale for cervical cancer screening by HPV. *HPV Summit*, 10 p., 1999.
18. Nicoletti N. The problem of trichomoniasis of the lower genital tract in the female. *Br J Vener Dis*, 37:222-228, 1961.
19. Parella C. I.; Perea E. A. G. Fatores de risco para câncer cervical e seus precursores. *Rer Bras Col*, 5: 27-30, 1998.
20. Pereira SMM. Candidíase e tricomoníase interferindo na variabilidade interobservadores no diagnóstico do ASCUS e SIL. *Folha Med*, 120:25-28, 2001.
21. Potén J.; Adami H.; Bergstrom R. Strategies for global control of cervical cancer. *Int J Cancer*, 60: 1-6, 1995.
22. Rein M. F. Clinical manifestation of urogenital trichomoniasis in women, p. 225-234. In HONINBERG, B. M. *Trichomonads parasitic in humans*. New York, Spring-Verlag, 1990.
23. Richard R.M. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*, 10: 748-784, 1967.
24. Rotkin I. D. A comparison review of key epidemiology studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res*, 33: 1353-1367, 1973.
25. Saslow D.; Runowicz C.; Solomon D.; Moscicki A.B.; Smith R.A.; Eyre H.J.; Cohen C. American Cancer Society Cervical Cancer Screening Guidelines 2002. *CA: Cancer Clin*, 52: 375-376, 2002.
26. Solomon D.; Davey D.; Kurman R.; Moriarty A.; O'Connor D.; Prey M.; Raab S.; Sherman M.; Wilbur D.; Wright T.Jr.; Young N. Forum Group Members. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 287: 2114-2119, 2002.
27. Trabulsi L. R.; Alterthum F.; Gompertz O. F.; Candeias J. A. N. *Microbiologia*. 3º ed. São Paulo, Actínia, p. 351-353, 1999.
28. Vargas V. R. A.; Corte E. A. D.; Menezes H. S.; Amaral R. G.; Pilla C. Análise das lesões intra-epiteliais escamosas em exame citológico em determinada população de Santo Ângelo, RS. *Revista AMRIGS*, 47: 183-186, 2003.
29. Villa L.L. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res*, 71:321 - 41, 1997.
30. Yap E.H.; Ho T. H; Cham Y. C. Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cancer patients. *Geniturin*, 25: 123-131, 1995.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Andréia Buffon
 Rua Veador Porto , 120/302, Bairro Santana
 CEP. 90610-200 Porto Alegre - RS
 e-mail: debuffon@redemeta.com.br Tel.: (0XX51) 32238462 / 98072125



IFCC WORLDLAB
Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani: estudo de revisão

The cervical cancer, the Human Papillomavirus and its risk factors and the Guarani indigenous women: a review

Luciana Albring¹, Jaime Ebert Brentano² & Vera Regina Andrade Vargas³

RESUMO - Introdução: O câncer cervical é o segundo mais comum câncer entre as mulheres no mundo. Esse câncer pode ser detectado precocemente pelo exame de Papanicolaou. Tem sido relatado que o Papilomavírus Humano é o principal fator de risco para o seu desenvolvimento. Outros fatores são: início precoce da atividade sexual, número de parceiros sexuais e sua promiscuidade. Esses fatores de risco estão presentes nas populações indígenas da América do Sul.

Metodologia: Foi realizada uma revisão bibliográfica, nas bases de dados do Lilacs e PubMed, empregando-se as seguintes palavras-chave: câncer do colo do útero; Papilomavírus Humano; indígenas; Guarani e fatores de risco, durante os meses de setembro a dezembro de 2004.

Objetivo: Revisar na literatura sobre o câncer do colo do útero, Papilomavírus Humano e a cultura dos índios Mbya-Guarani da região das Missões no estado do Rio Grande do Sul.

Conclusão: Na literatura brasileira, são escassos os dados sobre a saúde dos povos indígenas, principalmente, sobre o câncer do colo do útero. Porém, para que seja possível determinar esses dados, é necessário conhecer a cultura desses povos e assim adotar medidas de prevenção dessa doença.

PALAVRAS-CHAVE - Câncer do colo do útero; Papilomavírus Humano; indígenas; Guarani e fatores de risco.

SUMMARY - Introduction: Cervical cancer is the second cancer most frequent type of cancer in women all around the world. The Papanicolaou test can detect this cancer. The persistent Human Papillomavirus (HPV) infection in cervical cells is recognized to main risk factor of cervical cancer. The other risk factors are the age at first sexual intercourse, number of sexual partners and their promiscuity. These risks factors are present in the aboriginal populations of the South America.

Methodology: The review in the databases of the Lilacs and PubMed, the key word was: cervical cancer; Human Papillomavirus; indigenous; Guarani indigenous and risks factors, during the months September to December, 2004.

Objective: To review in literature cervical cancer; Human Papillomavirus and the Mbya-Guarani indians of the Missions in the Rio Grande do Sul state.

Conclusion: In Brazilian literature, the data on the health of the aboriginal peoples are poor, mainly on the cervical cancer. However, for to determine these data, it is necessary to know the culture of these peoples and so to adopt measured of prevention of this disease.

KEYWORDS - cervical cancer; Human Papillomavirus; Guarani indigenous and risks factors.

INTRODUÇÃO

No mundo, o câncer cervical é a segunda mais comum doença maligna entre mulheres. No Brasil, representa a terceira mais comum malignidade e no estado do Rio Grande do Sul (RS) é a quarta maior causa de óbito entre as mulheres, representando 10% de todos os tumores malignos femininos. Essa doença pode ser detectada precocemente pelo rastreamento citológico em programas de saúde pública (CÉSAR *et al.*, 2003; PINHO *et al.*, 2003; INCA, 2004a; VARGAS *et al.*, 2004).

Em vários estudos epidemiológicos, tem sido relatado que o Papilomavírus Humano (HPV) é o principal fator de risco para o câncer cervical. Outros fatores de risco também podem estar associados ao desenvolvimento desse tipo de câncer, como o início precoce da atividade sexual, alta paridade, curto intervalo interparto, número de parceiros sexuais, promiscuidade do parceiro sexual, desnutrição em função da alimentação insuficiente e inadequada, hábitos de higiene e tabagismo. Esses fatores de risco estão presentes nas populações indígenas da América do Sul

(GOMPEL & KOSS, 1997; KANESHIMA *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 1996; NORONHA *et al.*, 1999; TABORDA *et al.*, 2000; FRANCO & FRANCO, 2001; INCA, 2004b).

No Brasil, os estudos disponíveis sobre o câncer do colo do útero na mulher indígena são poucos, por isso, faz-se necessário esse estudo a respeito da ocorrência do câncer do colo do útero nessa população.

Para o estudo foi realizada uma revisão bibliográfica nas bases de dados do Lilacs e PubMed empregando-se as seguintes palavras-chave: câncer do colo do útero; Papilomavírus Humano; índios sul-americanos; índia Guarani e fatores de risco. A pesquisa foi realizada de setembro a dezembro de 2004, sem restrição de idioma, sendo destacado o período de 1995 a 2004.

O objetivo desse estudo foi revisar na literatura sobre o câncer do colo do útero, Papilomavírus Humano e a cultura dos índios Mbya-Guarani da região das Missões no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Papilomavírus Humano

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de dupla fita circular de DNA com comprimento de 7900 kilobases de forma

Recebido em 10/02/2005

Aprovado em 14/11/2005

¹Aluna bolsista de Iniciação Científica PIIC-URI, do curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Santo Ângelo (URI).

²Enfermeiro Pós-Graduado em Saúde da Família, agente de saúde responsável pela saúde indígena, da Equipe de Saúde do Posto de Assistência ao índio localizada na Aldeia Tekoa Koenju, no Município de São Miguel das Missões.

³Mestre em Gerontologia Biomédica; Pós-Graduada em Citologia Clínica, Professora de Citologia Clínica, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências da Saúde,

icosaédrica, não envelopado, com 72 capsômeros e pertence à família *Papillomaviridae*. O HPV é classificado conforme a espécie de hospedeiro natural e subclassificado em tipos de acordo com as seqüências de nucleotídeos do DNA (ICTV, 2003; BURD, 2003; PEREYRA & PARELLADA, 2003). Atualmente, são conhecidos mais de 90 tipos de HPV com base na homologia do seu DNA, sendo que aproximadamente 30 possuem tropismo pelo trato anogenital e, esses são divididos em alto e baixo risco para o desenvolvimento do câncer, conforme o seu potencial oncogênico. A organização genômica de todos os HPVs é semelhante. O genoma viral pode ser dividido em três regiões: a região "early" (precoce) contendo os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que são necessários à replicação viral e com propriedades de transformação oncogênica; região "late" (tardia) contendo os genes L1 e L2 que possuem códigos para a formação de proteínas do capsídeo viral; e região regulatória (LCR) que contém a origem da replicação e o controle dos elementos para transcrição e replicação (Figura 1) (RIVERA, 2002; BURD, 2003; PEREYRA & PARELLADA, 2003; KANESHIMA, 2003).

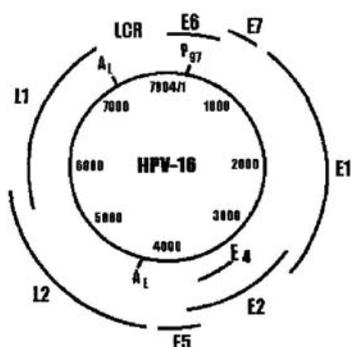


Figura 1: Genoma viral do HPV16 (Fonte: RIVERA, 2002).

O DNA viral dentro da célula do hospedeiro pode assumir duas formas: a episossomal e a integrada. Na forma episossomal, o DNA viral permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, não estando integrado ao DNA da mesma. Essa forma é encontrada nas verrugas genitais e lesões de menor gravidade. Para a integração do genoma circular ao DNA da célula hospedeira, esse deve ser linearizado, pela quebra do DNA viral entre a região E1 e L1, resultando na ruptura ou perda do gene E2, sendo encontrado nas lesões de maior gravidade, como o carcinoma "in situ" e invasivo (PEREYRA & PARELLADA, 2003).

Após a integração dos HPVs de alto risco no genoma celular, esses passam a codificar as oncoproteínas E6 e E7 que promovem o processo maligno. A célula hospedeira possui os genes supressores de tumores *RB* e *TP53*. O gene *RB* é o principal regulador do ciclo celular e o gene *TP53* é chamado de "guardião do genoma", pois tem a finalidade de supervisionar se todos os genes estão íntegros.

A oncoproteína E6 liga-se e inativa a p53, proteína supressora tumoral da célula hospedeira. Com a inativação da p53, essa deixa de desempenhar suas funções como o reparo do defeito genético ou o envio da célula defeituosa para a morte celular programada ou apoptose. A oncoproteína E7 liga-se e inativa a proteína supressora tumoral pRB, estimulando a síntese de DNA na célula do hospedeiro e ativando células quiescentes para o ciclo celular (PEREYRA & PARELLADA, 2003; GROSS & BARRASCO, 1999).

De acordo com a especificidade tecidual o HPV pode ser classificado como cutaneotrópico e mucoso-genitotrópico. Os cutaneotrópicos são aqueles que afetam áreas não genitais, tanto em indivíduos imunocompetentes como nos

imunodeprimidos. Os mucoso-genitotrópicos infectam principalmente a mucosa da genitália, podendo ocorrer em qualquer outra mucosa do organismo como a oral, ocular e respiratória (PEREYRA & PARELLADA, 2003).

Os HPVs dos tipos 6 e 11 induzem a condilomas que afetam a pele anogenital e a parte inferior da vagina, sendo detectado nas lesões intra-epiteliais escamosa de baixo grau (LSIL) e são considerados de baixo risco porque estão envolvidos em lesões benignas. Os HPVs dos tipos 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70 são fortemente associados com câncer intra-epitelial cervical, sendo considerados de alto risco e prevalecem em cânceres anogenitais (GOMPEL & KOSS, 1997; BURD, 2003; KANESHIMA *et al.*, 2003; PINHO *et al.*, 2003; VARGAS *et al.*, 2004).

Da infecção por HPV ao Câncer do colo do útero

Os HPVs infectam a pele e mucosas e iniciam o ciclo infeccioso no momento em que penetram as camadas mais profundas do tecido epitelial da cérvix uterina, em especial na junção escamo-colunar ou em regiões com microlesões que podem ocorrer durante o intercuro sexual. Após um período de incubação, que varia de meses a anos, podem surgir manifestações clínicas como lesões vegetantes (verrugas) até o câncer cervical (Figura 2) (BURD, 2003; PEREYRA & PARELLADA, 2003).

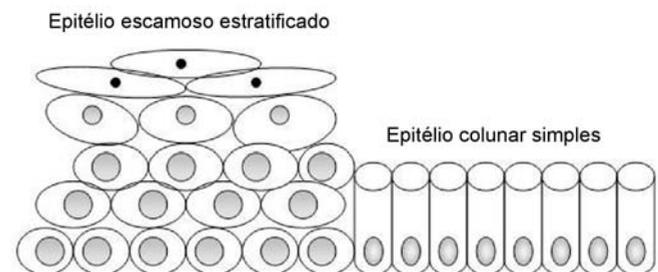


Figura 2: Esquema da junção escamo-colunar (tecido epitelial escamoso estratificado e o tecido epitelial colunar simples).

O reconhecimento de que a infecção por HPV, no trato genital, possa estar associada com lesões pré-cancerosas é relativamente recente. Certas anormalidades planas do epitélio da cérvix uterina, até o momento considerado como lesões neoplásicas intra-epiteliais, apresentavam o mesmo aspecto citológico das lesões verrucosas. Esse aspecto era a presença de células conhecidas como coilocitos (BIBBO & SILVA FILHO, 1998).

A coilocitose é o primeiro aspecto citológico da manifestação do HPV, sendo uma célula escamosa intermediária que apresenta um grande vacúolo citoplasmático ao redor de um núcleo anormal. Outros aspectos citológicos são a disqueratose, binucleação e multinucleação. Essas alterações caracterizam uma lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) (CRUM, 2000; VARGAS *et al.*, 2004).

A progressão maligna resulta da integração do HPV e expressão de alguns genes, ocorrendo uma alteração na relação hospedeiro e o vírus. Esse processo mostra-se como um *continuum* que se estende do epitélio normal passando por lesões de baixo grau, lesões de alto grau antes de se tornar câncer invasor. Nessa progressão o vírus, anteriormente na forma episossomal (circular), passa para a forma linear, e se incorpora ao DNA da célula epitelial hospedeira (PEREYRA & PARELLADA, 2003).

As lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) são caracterizadas por anormalidades no crescimento e diferenciação celular que tem sua origem na replicação das células da camada basal que originam o epitélio. Esse fenômeno produz distúrbios morfológicos em todas as camadas

do epitélio e apresenta células de tamanho menor daquelas vistas em lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (CRUM, 2000, VARGAS *et al.*, 2004).

Fatores de risco

Em diversos estudos epidemiológicos, têm sido relatados que, além do HPV, outros fatores de risco estão relacionados ao desenvolvimento do câncer cervical, tais como: a idade do início da atividade sexual, números de parceiros sexuais e a promiscuidade do parceiro sexual. São considerados como fatores secundários: o número de partos, o uso de contraceptivo oral, tabagismo, imunossupressão ou a imunodeficiência, doenças sexualmente transmissíveis (DST) e outros (GROSS & BARRASCO, 1999; BURD, 2003). Com relação ao início da atividade sexual, tem sido demonstrado, em vários estudos, que se ocorrer antes dos 16 anos dobra o risco para o desenvolvimento do câncer comparado com aquelas que iniciam depois dos 20 anos de idade (BURD, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2002, SKEGG, 2002; GROSS & BARRASCO, 1999).

O número de parceiros sexuais, durante a vida, e a promiscuidade do parceiro sexual são fatores de risco importantes para a infecção por HPV genital. Tem sido relatado que parceiros sexuais de mulheres com câncer cervical tiveram várias infecções genitais, incluindo verrugas e até câncer de pênis (BURD, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2002, SKEGG, 2002; GROSS & BARRASCO, 1999).

A alta paridade é um fator consistente para o câncer cervical em mulheres que possuem DNA do HPV. O fator de risco dobra nas que tiveram 4 filhos, quando comparado com as que tiveram 1 ou nenhum (MUÑOZ *et al.*, 2002, SKEGG, 2002; BURD, 2003).

Com relação aos contraceptivos orais, o seu uso prolongado aumenta o risco de desenvolver carcinoma cervical. Essas pílulas contêm hormônios como dexametasona, progesterona e estrógenos que intensificam a expressão genética do HPV (GROSS & BARRASCO, 1999; SKEGG, 2002; BURD, 2003).

O tabagismo diminui a quantidade e função das células de Langerhans, células apresentadoras de antígenos que são responsáveis pela ativação da imunidade celular local contra o HPV. Os metabólitos da nicotina podem ser encontrados no muco cervical (SKEGG, 2002; BURD, 2003; GOMPEL & KOSS, 1999; PEREYRA & PARELLADA, 2003).

A imunossupressão ou a imunodeficiência como a encontrada em receptores de transplantes ou em pessoas portadoras de HIV, não é somente um fator de risco para infecções genitais por HPV e sua progressão para neoplasias intra-epiteliais cervicais e cânceres genitais, mas também um fator de risco para lesões cutâneas benignas e malignas induzidas por HPV (BURD, 2003; GROSS & BARRASCO, 1999).

As doenças sexualmente transmissíveis como Herpes, Citomegalovírus e Clamídia também são fatores de risco para o desenvolvimento de lesão intra-epitelial escamosa (BURD, 2003; PEREYRA & PARELLADA, 2003; GOMPEL & KOSS, 1999).

Outros fatores, também têm sido relatados, tais como fatores socioeconômicos, higiene e a desnutrição (PEREYRA & PARELLADA, 2003).

Populações indígenas no Brasil

A população indígena, no Brasil, contava com cerca de 5 milhões de pessoas no início do século XVI. Essa população foi dizimada por suas crenças religiosas, sua resistência à escravidão, pelas epidemias de doenças infecciosas, favorecidas pelos novos hábitos de vida impostos pela colonização. Hoje, a população indígena brasileira conta com cerca de 350 mil índios distribuídos entre 215 sociedades indígenas, além daqueles em áreas urbanas (FUNAI, 2004a).

A população indígena total do Rio Grande do Sul é consti-

tuída por 13.448 habitantes pertencentes aos grupos indígenas: Guarani, Mbya-Guarani e Kaingang. Na região das missões, no noroeste desse estado, habitam os índios pertencentes ao grupo Guarani, fazendo parte dos 30 povoados distribuídos pelo Paraguai, Argentina e Brasil (TABORDA *et al.*, 2000; BRENTANO *et al.*, 2004; MS, FUNAI, 2004a).

Entre esses povos, destaca-se o antigo Povo de São Miguel Arcanjo, no atual município de São Miguel das Missões, situado a cerca de 480 km de Porto Alegre. Nessa região, existe uma reserva indígena, que pertence à tribo Mbya-Guarani conhecida pelo nome do rio Inhacapedum, por estar próximo à sua margem, possui 236,6 hectares (ha), essas terras são formadas por campos e mata nativa. A população indígena dessa tribo reside na aldeia Tekoa koenju (que significa Aldeia Alvorecer em Guarani) com aproximadamente 200 habitantes (BRENTANO *et al.*, 2004).

Essa população tem demonstrado considerável aumento, relacionado à migração de indígenas de outras reservas, para a reserva Inhacapedum, principalmente por homens. Isso caracterizou o aumento da população masculina em relação ao sexo feminino, resultando no aumento da promiscuidade. Esse contingente indígena é predominantemente jovem com menos de 15 anos de idade, apresenta alta fecundidade com 7-8 filhos e intervalos curtos entre os filhos, combinados com a iniciação precoce da fase reprodutiva com 13-14 anos de idade (BRENTANO *et al.*, 2004).

Saúde da população indígena

Na concepção indígena, a percepção do significado de saúde e doença tem características místicas e simbólicas, relacionadas às interações sociais e sobrenaturais em desequilíbrio, diferente daquela apontada pela medicina ocidental. A área da saúde indígena, no Brasil, atravessa uma fase caracterizada por alterações profundas que vão desde transformações no perfil epidemiológico até a reestruturação do sistema de assistência à saúde indígena (WILSON, 2001; BRAGA & NODA, 2003).

Atualmente, as poucas informações em saúde da mulher indígena, dificultam a construção do perfil epidemiológico e criam dificuldades para as ações voltadas à atenção à mulher indígena brasileira. Os poucos dados sobre a situação de saúde dessa mulher têm sido reportados nos pouquíssimos estudos disponíveis (ISHAK & ISHAK, 2001; TONON *et al.*, 2003).

Segundo o estudo de Brito *et al* (1996), realizado com índias da tribo Parakanã, 23,2 % dos esfregaços citológicos apresentaram alterações morfológicas compatíveis com infecção por HPV, 1,4% apresentaram neoplasia intra-epitelial cervical de grau 1 e 2 (NIC 1 e 2) e carcinoma cervical. Segundo Taborda *et al* (2000), na pesquisa realizada com o rastreamento do câncer do colo uterino em índias do Parque Indígena do Xingu, na região central do Brasil, foi identificado que 1% das mulheres indígenas apresentava carcinoma cervical e 3% apresentavam lesões pré-malignas (NIC 1, 2 e 3), sendo que 2% apresentavam alterações citológicas sugestivas de HPV (BRITO *et al.*, 1996; NORONHA *et al.*, 1999; TABORDA *et al.*, 2000; FRANCO & FRANCO, 2001; INCA, 2004b).

Em outros estudos com populações indígenas foram relatados alguns problemas ginecológicos como infecções causadas por *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e Papilomavírus Humano (BOWDEN *et al.*, 1999; ISHAK & ISHAK, 2001; TONON *et al.*, 2003).

A limitada evidencia de índices de lesões cervicais em mulheres indígenas sugere que esse tipo de problema possa ser menor que os dados da população nacional. No entan-

to, o pobre acesso, e utilização de programas de rastreamento em populações indígenas podem levar a uma expectativa de altas incidência e mortalidade por câncer cervical nessa população.

CONCLUSÃO

O câncer do colo do útero é uma neoplasia maligna que afeta mulheres do mundo inteiro. A presença de infecções por Papilomavírus Humano (HPV) esta associada ao desenvolvimento do câncer do colo uterino e, é considerado como o principal fator de risco. Para adquirir o vírus do Papilomavírus Humano é necessário que a mulher esteja predisposta a outros fatores de risco, como início precoce da atividade sexual, número de parceiros sexuais e promiscuidade do parceiro sexual. Também são considerados fatores de risco o número de partos, o uso de contraceptivo oral, tabagismo, imunossupressão ou a imunodeficiência, doenças sexualmente transmissíveis (DST) e outros.

Esses fatores de risco estão presentes nas populações indígenas da América do Sul. Na literatura brasileira, são escassos os dados sobre a saúde dos povos indígenas, principalmente sobre o câncer do colo do útero. Porém, para que seja possível determinar esses dados, é necessário conhecer a cultura desses povos e assim então adotar medidas de prevenção dessa doença.

A limitada evidencia de índices de lesões cervicais em mulheres indígenas sugere que esse tipo de problema possa ser menor que os dados da população nacional. No entanto, o pobre acesso, e utilização de programas de rastreamento em populações indígenas podem levar a uma expectativa de altas incidência e mortalidade por câncer cervical nessa população.

REFERÊNCIAS

- BIBBO M, SILVA FILHO AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
- BOWDEN FJ, PATERSON BA, MEIN J, SAVAGE J, FAIRLEY CK, GARLAND SM, TABRIZI SN. Estimating the prevalence of Trichomonas vaginalis, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and human papillomavirus infection in indigenous women in northern Australia. *Sex Transm Inf*; 1999; 75:431-434.
- BURD ME. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin. Microbiol*; 2003;16:1-17.
- BRAGA MDS, NODA SN. A percepção indígena sobre saúde e doença nas experiências de imunização. Disponível em: <http://nerua.inpa.gov.br/NERUA/05.htm>. Acessado em 10/04/2004.
- BRENTANO JE, MOURA VP, DUARTE M. Relatório anual da equipe multidisciplinar da saúde indígena, 2004.
- BRITO EB, MENEZES RC, MARTINS SI, BASTOS MG, SOUZA A. Estudo preliminar para detecção de cervico-vaginites e lesões precursoras do câncer de colo uterino, em índias da tribo Parakanã. *Rev Ass Med Brasil*; 1996;42:11-15.
- CÉSAR JA, HORTA BL, GOMES G, HOULTHAUSEN RS, WILLRICH RM, KAERCHER A, IASTRENSKI FM. Fatores associados à não realização de exame citopatológico de colo uterino no extremo Sul do Brasil. *Cad Saúde Pública*; 2003;19:1365-1372.
- COSTA JSD, OLINTO MTA, GIGANTE DP, MENEZES AMB, MACEDO S, BORBA Andresa T, MOTTA GLS, FUCKS SC. Cobertura do exame citopatológico na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública*; 2003;19:191-197.
- CRUM CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol*; 2000; 13: 243-251.
- FRANCO EL, FRANCO-Duarte E, FERENCZY A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of Human Papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001;164: 1017-1025.

- FUNAI - Fundação Nacional do Índio. Etnias indígenas. Disponível em www.funai.gov.br/mapas/etnia/etn_rs.htm. Acessado em 29/10/2004a.
- FUNAI - Fundação Nacional do Índio. O índio hoje. Disponível em www.funai.gov.br/index.htm. Acessado em 29/10/2004b.
- FUNASA. Ministério da Saúde. Política de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas. 2000. Disponível em www.funai.gov.br. Acessado em 29/01/2004.
- GOMPEL, Claude; KOSS, Leopold G. Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas. São Paulo: Manole, 1997.
- GROSS GE & BARRASCO R. Infecção por Papilomavírus Humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda, 1999.
- HÖKERBERG YHM, DUCHIADA MP, BARCELLOS C. Organização e qualidade da assistência à saúde dos índios Kaigáng do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública*; 2001; 17: 261-272.
- ICTV dB, Index of Viruses. Family 00.099. Papillomaviridae, Genus 00.099.0.007 Human Papillomavirus. Disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/fs. Acessado em 20/04/2003.
- ISHAK MOG, ISHAK R. O impacto da infecção por Chlamídia em populações indígenas da Amazônia brasileira. *Ca Saúde Pública* 2001;17:385-396.
- KANESHIMA EM, SUZUKI LE, IRIE MMT, YOSHIDA CS, SILVA SFM, CONSO-LARO MEL. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico de Papillomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR. *RBAC* 2003; 35:29-33.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Missão: ações nacionais integrantes para prevenção e controle do câncer. Como os papilomavírus são transmitidos. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_vie.asp?ID=327... Acessado em 13/10/04b.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Câncer do colo do útero. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 19/10/04a.
- MUÑOZ N, FRANCESCHI S, BOSETTI C, MORENO V, HERRERO R, SMITH JS, SHAH KV, MEIJER CJLM, BOSCH FX. Role of parity and Human Papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet* 2002; 359:1093-1101.
- NORONHA V, MELLO W, VILLA L, BRITO A, MACÊDO R, BISI F, MOTA R, SAS-SAMOTO K, MONTEIRO T, LINHARES A. Papilomavírus Humano associado a leões de cérvix uterina. *Rev Soc Bras Méd Trop*; 1999; 32:235-240.
- PEREYRA EAG; PARELLADA CI. Entendendo melhor a infecção pelo Papilomavírus Humano. Manual Schering 2003.
- PINHO AA, JUNIOR IF. Prevenção do câncer do útero: um modelo teórico para analisar o acesso e a utilização do teste de Papanicolaou. *Rev Bras Mater Infant*. 2003; 3:95-112.
- TABORDA WC, FERREIRA SC, RODRIGUES D, STÁVALE JN, BARUZZI RG. Rastreamento do câncer de colo uterino em índias do Parque Indígena do Xingu, Brasil central. *Rev Panam Salut Publica/ Pan Am J Public Health*; 2000; 7:92-96.
- TONON AS, PICCONI MA, ZINOVICH JB, NARDARI W, MAMPAEY M, BADANO I, DI LELLO F, GALUPPO JÁ, ALONIO LV, TEYSSIE AR. Human papillomavirus cervical infection in Guarani Índias from the rainforest of Misiones, Argentina. *International Journal of infectious Diseases* 2003; 10:2-7.
- RIVERA RZ, AGUILERA JT & LARRAIN AH. Epidemiologia del virus Papiloma Humano (HPV). *Rev. Chil. Obstet. Ginecol*; 2002; 67:501-506.
- SKEGG DCG. Oral contraceptives, parity, and cervical cancer. [comentary] *The Lancet* 2002; 359:1080-1081.
- WILSON A. Servicios de salud, pueblos indígenas y prácticas médicas. *Rev Salud Pública*; 2001; 3:68-70.
- VARGAS VRA, DALLA CORTE EA, AMARAL RG, MENEZES HS. Prevalência das lesões intra-epiteliais escamosas em exame citológico numa determinada população de Santo Ângelo, RS. *RBAC*; 2004; 36:7-11.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Vera Regina Andrade Vargas
Rua Barão de Santo Ângelo, 1305
CEP: 98801-740 Santo Ângelo - RS
E-mail: vvargas@urisan.tche.br

Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e imunocitoquímica*

Detection of p53 protein in leukemic cells by flow cytometry and immunocytochemistry

Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc, PhD)¹, Marcos Antonio Mauricio Scheiner (MSc)², Flavia da Cunha Vasconcelos³, Jane de Almeida Dobbins (MD)⁴, Claudete Esteves Klumb (MD, PhD)⁵ & Raquel C. Maia (MD, PhD)⁶

RESUMO - Introdução: A proteína p53 desempenha uma função crucial no controle do ciclo celular, reparo do DNA e na indução de apoptose em células geneticamente instáveis. A imunocitoquímica (ICQ) é um dos métodos preconizados para detecção e visualização dessa proteína no núcleo das células, sendo, no entanto um método demorado e trabalhoso o que dificulta a sua aplicação na rotina laboratorial. Atualmente, a citometria de fluxo (CF) também tem sido empregada na detecção da proteína p53 mutada ou estabilizada tendo a vantagem da praticidade e rapidez de execução.

Objetivos e Metodologia: Comparar os resultados obtidos pela CF e ICQ na detecção da proteína p53 em células leucêmicas. Empregamos amostras de 10 pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) 10 com leucemia linfóide crônica (LLC), tendo sido também empregadas, células de linhagens leucêmicas humanas que serviram como controle de expressão positiva e negativa para ambos os métodos além de linfócitos de 40 doadores de sangue. A CF e ICQ foram realizadas após a marcação com anticorpo monoclonal anti-p53 por técnicas convencionais.

Resultados: Observamos concordância nos resultados da maioria das amostras dos pacientes e em todas as amostras das linhagens celulares tendo sido, no entanto constatados níveis de expressão mais elevados nas análises obtidos pela CF quando comparados com a ICQ, refletindo em uma maior sensibilidade desse método.

Conclusão: Apesar da ICQ ser considerada uma técnica adequada para a detecção da p53, nossos resultados indicam que a CF pode ser empregada satisfatoriamente na detecção dessa proteína em amostras de células leucêmicas.

PALAVRAS-CHAVE - Proteína p53, imunocitoquímica, citometria de fluxo, leucemia linfóide crônica, leucemia linfóide aguda.

SUMMARY - Introduction: The p53 protein plays a crucial role in the cell cycle control, DNA damage repair and induction of apoptosis in genetically unstable cells. The immunocytochemistry (ICQ) is one of the most common methodology for detection and visualization of this protein in the nucleus of the cells, but this technique is time-consuming and difficult to apply in the clinical setting. Nowadays the assessment of p53 protein expression by flow cytometry (FC) assays are easier to perform and provide reliable estimates of the prolonged half-life of mutant or inactivated wild-type p53 protein.

Objectives and Methodology: Compare the results of p53 detection by FC and ICQ in leukemic cells. We used samples from 10 patients with acute lymphoid leukemia (ALL), 10 with chronic lymphoid leukemia (CLL). To positive and negative controls of p53 expression in both methods we also employed leukemic cells from human leukemic cell lines and lymphocytes from 40 healthy donors were also used as control for negative labeling in FC. The FC and ICQ were performed after labeling with p53 monoclonal antibody by the usual protocol.

Results: We verified an agreement in the results in the majority of the leukemic cells from patients and in all human leukemic cell line samples.

Conclusion: Despite of ICQ is considered a good methodology for p53 detection in leukemic cells; our results show that FC can be satisfactorily used for detection of this protein in leukemic cells.

KEYWORDS - p53 protein, immunocytochemistry, flow cytometry, chronic lymphocytic leukemia, acute lymphocytic leukemia.

INTRODUÇÃO

O gene *TP53* encontra-se mutado em aproximadamente 50% das neoplasias malignas em humanos, fato este que tem levado numerosos estudiosos a pesquisar níveis de expressão de seu produto de transcrição, a proteína p53, como indicadora de prognóstico em neoplasias humanas de diversas origens¹⁻².

Embora as alterações do gene e da proteína p53 ocorram com menor frequência nas neoplasias do sistema hematopoiético do que em tumores sólidos, diversos trabalhos têm destacado a relevância clínica das disfunções desse gene e/ou inativação de seu produto de transcrição nas leucemias e linfomas. A associação entre a mutação e a superexpressão da proteína p53 com a evolução clínica desfavorável nas leucemias têm sido observadas em vários trabalhos tais como na

leucemia linfóide crônica em transformação para síndrome de Richter (LLC/SR) e nos casos de refratariedade e recaída da leucemia linfóide aguda (LLA)³⁻⁶.

As alterações genéticas do gene *TP53* incluem a troca de nucleotídeos na sequência do gene *TP53* (mutação *missense*), assim como deleções, inversões e translocações envolvendo o cromossomo 17, havendo uma estreita correlação dessas alterações genéticas e a estabilização e acúmulo da proteína p53 no núcleo das células afetadas⁷⁻⁹. Outras formas de inativação da proteína p53 incluem interações da mesma com outras proteínas regulatórias do ciclo celular como as proteínas p16 e MDM2 e também proteínas virais como o antígeno TAX do vírus linfotrópico de células T humana (HTLV) e EBNA5 do vírus Epstein-Barr (EBV) dentre outras. Essas proteínas, quando interagem com a proteína p53 levam a inativação, estabilização e acúmulo da proteína p53 no nú-

Recebido em 11/05/2005

Aprovado em 14/11/2005

*Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer (LHCM / HC-I / INCA/RJ).

¹Farmacêutico-Bioquímico e Professor Adjunto da Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT / UFRN); ²Farmacêutico-Bioquímico do LHCM / HC-I / INCA/RJ; ³Bióloga do LHCM / HC-I / INCA/RJ; ⁴Médica Hematologista responsável pelo do Serviço de Hematologia do HC-I / INCA/RJ; ⁵Médica Hematologista do Serviço de Hematologia e do LHCM / HC-I / INCA/RJ; ⁶Médica Hematologista e responsável pelo LHCM / HC-I / INCA/RJ.

cleo da célula, tornando possível a sua detecção⁷⁻⁹. Os métodos de detecção das alterações do gene e da proteína p53 disponíveis incluem a expressão da proteína p53, as análises moleculares das alterações estruturais do gene *TP53* (mutações, translocações e deleções)^{9, 10}.

A proteína p53 normal tem meia vida curta (6 a 20 minutos), não podendo ser detectada a sua expressão em células normais. Em contraste, a forma mutada ou inativada apresenta uma maior estabilização, tornando possível sua detecção por técnicas imunológicas através de anticorpos monoclonais (AcMo) anti-p53 utilizados nos ensaios da imunohistoquímica (IHQ)^{9, 10}, Western blot (WB)^{9, 10}, imunocitoquímica (ICQ)^{9, 10} e mais recentemente a citometria de fluxo (CF)^{9-14, 16}.

A ICQ e a CF são atualmente os métodos descritos como ideais para detecção da proteína p53 em amostras de pacientes leucêmicos⁹⁻¹⁴. As desvantagens desses métodos é que são incapazes de identificar a proteína p53 em tumores com mutação *non sense* em suas seqüências genéticas, visto que em tal mutação, ocorre ausência de expressão da proteína p53. Calcula-se, no entanto, que essas alterações ocorram em menos de 20% das mutações do gene *TP53* em tumores humanos⁹.

A ICQ é um método de avaliação da expressão da proteína p53 que apresenta a vantagem da correlação dos resultados obtidos com a análise citomorfológica, tornando possível à identificação precisa da localização topográfica da proteína no núcleo da célula. Esta técnica pode utilizar células em suspensão ou *imprint* de tecidos, previamente fixados em lâminas, que são submetidos a permeabilização seguida de incubação com AcMo. A presença da proteína é revelada pela presença de uma reação colorida após a adição do anticorpo secundário com especificidade contra a fração constante da imunoglobulina de camundongo conjugado a um substrato revelador que pode ser a peroxidase ou fosfatase alcalina^{10, 15}.

A CF tem se destacado como um método eficaz na detecção da proteína p53 em células tumorais⁹⁻¹⁴. Este método apresenta a vantagem de ser uma técnica semi-automatizada em que se pode processar e analisar rapidamente um grande número de amostras em tempo reduzido.

Por se tratar de um antígeno localizado no núcleo das células, nessa metodologia, é necessária uma prévia permeabilização celular para em seguida proceder-se a marcação com o AcMo anti p53 que deverá estar conjugado a um fluorocromo¹⁰⁻¹⁴.

Após este procedimento elas são introduzidas por aspiração no citômetro de fluxo, sendo então no interior do equipamento conduzido através de um fluxo de líquido isotônico até um compartimento denominado câmara de fluxo "*flow cell*". Nesse compartimento, um feixe de raios laser incide sobre cada célula, sendo uma parte, bloqueada frontalmente ("*Forward Scatter*" ou FSC) e outra parte dispersada lateralmente ("*Side Scatter*" ou SSC). A fração FSC é relativa ao tamanho da célula e a SSC representa a complexidade intracitoplasmática, que nas células sanguíneas caracteriza a granuloplasma interna. Caso as células expressem o antígeno em estudo ela estará marcada com um anticorpo conjugado a um fluorocromo. No caso das mesmas expressarem outros antígenos para os quais inclui-se a incubação com diferentes anticorpos específicos, as células mostrarão diferentes combinações de anticorpos-fluorocromos. A incidência de raio laser sobre estes fluorocromos causará sua excitação e conseqüente emissão de luz de diferentes comprimentos de onda, indicando uma reação positiva¹⁶.

Dentre outras vantagens da CF em relação a ICQ, destaca-se a capacidade de análise multiparamétrica, fornecendo

concomitantemente informações adicionais tais como expressão simultânea de dois ou mais antígenos, além da possibilidade de medidas da intensidade antigênica, não se limitando ao fornecimento de resultados positivos e negativos como observado na ICQ (Tabela I).

OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi detectar a expressão da proteína p53 em células leucêmicas de pacientes com LLA e LLC, utilizando duas metodologias distintas: CF e ICQ onde procuramos correlacionar a expressão dessa proteína com a evolução clínica dessas leucemias.

Adicionalmente, para tentar melhor correlacionar a superexpressão dessa proteína frente a uma presença de mutação do gene *TP53* investigamos também a presença ou não dessa proteína através desses dois métodos em células procedentes de linhagens leucêmicas humanas descritas na literatura como positivas ou negativas para a expressão da proteína p53^{10, 17, 18}.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS

Linhagens de células leucêmicas

Empregou-se 09 linhagens distintas de células leucêmicas humanas, estabilizadas e mantidas no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer no Rio de Janeiro-RJ (INCA-RJ), segundo recomendação do American Type Culture Collection (ATCC)^{10, 17} (Tabela II).

Amostras de pacientes com leucemias

Foram analisadas amostras de sangue periférico (SP) e / ou medula óssea (MO) de 10 portadores de leucemia linfocítica crônica (LLC) e 10 de leucemia linfóide aguda (LLA), atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital de Câncer, Instituto Nacional de Câncer (INCA / RJ). Das amostras procedentes de pacientes com LLC, 5 foram examinadas na ocasião do diagnóstico e 5 durante o tratamento dos quais 3 em transformação para síndrome de Richter (SR). Quatro dos pacientes com LLA foram estudados no momento do diagnóstico, 2 eram pacientes com LLA refratária e 4 por ocasião da recaída da doença.

Amostras controle

Paralelamente foram empregados linfócitos normais provenientes de 40 indivíduos sadios que serviram como controle de expressão negativa para a proteína p53 pelos dois métodos. As amostras dos pacientes e doadores de sangue foram coletadas após os indivíduos ou seus representantes legais serem esclarecidos dos objetivos do presente trabalho e assinado o termo de consentimento pós-informado.

MÉTODOS

1. Cultivo das células das linhagens leucêmicas humanas

Células procedentes de linhagens leucêmicas foram cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura de células (Tubos Falcon, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo meio de cultura RPMI (RPMI-medium 1640 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), suplementado com soro fetal bovino (Bovine Calf Sera, Gibco™, Invitrogen Corporation, Burlington, Canada). As células foram encubadas inicialmente em uma concentração de 3 – 10 x 10⁵ células / mL a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂.

2. Separação de células mononucleares

Amostras de MO e SP foram coletadas em tubos hepariniza-

dos e as células mononucleares separadas em gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque, 1077 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Após esse procedimento, as células mononucleares foram lavadas três vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e ressuspendidas em meio de cultura RPMI (RPMI-medium 1640 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB / Biomast, Brasil) sendo ajustadas para a concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

3. Confeção de citocentrifugado celular

Suspensões celulares previamente ajustadas na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL em RPMI foram homogeneizadas e para cada citocentrifugado (cytospin) empregou-se 150 μ L da suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ /mL de células mononucleares em uma citocentrífuga (Shandon 2, Londres, Inglaterra) com uma rotação de 500 rpm por 5 minutos. Após a confecção dos *cytospins*, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem até o dia seguinte e então, embaladas em papel alumínio e mantidas a -80°C até a realização dos exames.

4. Teste de viabilidade celular

As células mononucleares foram incubadas em solução de azul de tripan (Triplan blue / Merck, Frankfurter, Germany) a 0,5% em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4 (*Phosphate Buffer Saline* – PBS / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), na proporção de 9/1. Após a homogeneização, a mistura foi observada ao microscópio óptico, sendo descartadas amostras com viabilidade inferior a 80%.

5. Coloração pelo May-Grünwald Giensa e estudo citomorfológico

Estudos citomorfológico de distensão de SP e MO de pacientes com LLA e LLC e citocentrifugados de células mononucleares de pacientes e de linhagens celulares de células tumorais foram realizados após coloração pelo May-Grünwald Giensa (May-Grünwald Giensa / Merck, Frankfurter, Germany) (Figuras 1 - 3). As lâminas depois de coradas foram protegidas com lamínulas, sendo posteriormente examinadas no microscópio ótico, inicialmente com objetiva de 40x e, posteriormente, com objetiva de 100X. A avaliação morfológica para a LLA seguiu os critérios do grupo FAB conforme os subtipos L1, L2 e L3 para a LLA¹⁹ e para a LLC procedeu-se a contagem diferencial dos leucócitos em distensão de sangue periférico (Figura 4).

6. Imunocitoquímica

6.1-preparo das amostras

A expressão e localização topográfica da proteína p53 no núcleo das células foram realizadas em lâminas de microscopia contendo citocentrifugado de células mononucleares.

6.2- Metodologia

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

Foi depositado sobre as amostras, 20 μ L de AcMo anti p53 (DO-7 / Dako, Carpintaria, CA, USA) previamente diluído a 1/50 em PBS/SFB. As lâminas foram então incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida e em segui-

da, incubadas por 5 minutos em uma cuba contendo PBS à temperatura ambiente sob leve agitação para retirar o excesso do AcMo.

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

Procedeu-se então a incubação com o anticorpo terciário (*Strept ABC complex / HRP-DAKO*), diluído a 1/100 em PBS/BSA, conforme recomendação do fabricante, por 30 minutos, em câmara úmida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Lavou-se e incubou-se as lâminas por 5 minutos em PBS a temperatura ambiente, para retirar o excesso do anticorpo terciário e em seguida foi realizada a incubação em solução de diaminobenzidina (Merck, Frankfurter, Germany) diluído na concentração de 0,5% em PBS e acrescida de 10 μ L peróxido de hidrogênio 20v (Peridrol / Merck, Frankfurter, Germany) no momento do exame, por um período de 10 minutos ao abrigo da luz, seguindo-se da rinsagem das lâminas com PBS, para retirar o excedente.

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

A análise foi realizada em um microscópio ótico com objetiva de imersão, com contagem de no mínimo 200 células. A reação foi considerada positiva quando as células apresentavam uma coloração castanho escuro na região nuclear (Figuras 1-4).

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

7- Citometria de Fluxo

7.1- Preparo das amostras

A pesquisa da proteína p53 pela CF foi realizada em triplicata para cada linhagem celular, em 40 diferentes amostras de sangue de doadores saudáveis e em todas as amostras dos pacientes com LLA e LLC, empregando solução de lise (Becton Dickinson's FACS lysing solution, San José CA, USA) para a permeabilização celular^{10, 20, 21, 24-26}.

A suspensão celular ajustada na concentração $1,0 \times 10^6$ / células por mL por tubo foi incubada com solução de lise previamente diluída a 10% em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação a 1.500 rpm por 7 minutos, descarte do sobrenadante e homogeneização do sedimento. Após ressuspendar o sedimento em 2 mL de solução de Tween-20 diluído a 0,5% em PBS (Tween-20 / BHD, England), esta mistura foi centrifugada 2 vezes a 1.500 rpm.

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi homogeneizado e adicionado sobre o mesmo 10 μ L de AcMo anti-p53 (DO-7 / Dako, Carpintaria, CA, USA) conjugado a isotiocianato de fluorosceína (FITC), seguida de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esta etapa o sedimento foi homogeneizado em 2 mL de solução de PBS/Tween-20, seguida de centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos, desprezado o sobrenadante e o sedimento ressuspendido e submetido a mais uma lavagem com solução de PBS/Tween-20. Após o descarte do sobrenadante, ao sedimento final foi adicionado 1 mL de solução de formaldeído diluído a 1% em PBS (Formaldeído PA / Vetec, Brasil) e estocado na geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Para cada amostra foi utilizado um tubo controle de marcação inespecífica, empregando-se para tal, imunoglobulina inespecíficas conjugada ao FITC diluída conforme as especificações do fabricante (IgG 1-FITC, Dako, Carpintaria, CA, USA).

7.2- Leitura e análises

A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo Fluorescence Activated Cell Analyser (FACScan, San Jose, CA, USA) empregando o *software* Cell Quest (The Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), com aquisição de 40.000 eventos, tendo como parâmetros FSC e SSC em escala linear e FL1 em escala logarítmica que detecta a fluorescência verde, ou seja, a reação antígeno/anticorpo conjugado ao FITC.

Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para o AcMo anti-p53. Determinou-se também a quantificação antigênica da proteína p53 através da intensidade de fluorescência, calculada pela razão entre a média de intensidade de fluorescência do tubo com o AcMo e a intensidade média de fluorescência do tubo controle (IMF), calculado a partir da razão do IMF do tubo contendo células com o AcMo anti p53 pelo IMF do tubo com células da mesma amostra marcado com anticorpos inespecíficos^{10, 25-27} (Figuras 1-4).

8 - Análise estatística

Os dados obtidos nos dois ensaios foram analisados por diferentes testes estatísticos e gráficos.

Para comparação dos resultados da expressão da proteína p53 em células leucêmicas pela CF e ICQ, empregou-se o teste de Wilcoxon através do *software* estatístico *Statistical Pack for Social Sciences* (SPSS for Windows versão 9.0; Copyright © SPSS, INC), sendo considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Para análise da correlação da expressão da proteína p53 pelos dois métodos, empregou-se a curva de correlação linear das medidas de expressão da proteína p53 obtida por CF e ICQ, empregando o *software* Microsoft® Excel 2000 versão 9.0.

RESULTADOS

Expressão da proteína p53 nas amostras de linhagens celulares, pacientes leucêmicas e amostras controles.

Conforme observado na tabela III, observou-se correlação

dos resultados entre os dois métodos em 100% dos casos nas amostras das linhagens de células leucêmicas, com expressão da proteína p53 nas amostras Raji, Namalva, MT-2 e C91pl e resultados negativos nas demais linhagens e em todas as células controles.

A análise quantitativa da densidade antigênica determinada pelo cálculo da IMF na CF nessas amostras mostraram-se variáveis, refletindo em uma maior ou menor quantidade da proteína p53 no núcleo das células, sendo observado níveis maiores de intensidade antigênica nas células das linhagens com presença da proteína mutada quando comparada com as linhagens que expressavam a proteína p53 selvagem. Constatou-se desta forma níveis maiores de IMF nas células das linhagens Raji e Namalva, com valores de IMF médio de 51,3 e 42,4 respectivamente, contrastando com os resultados das IMF linhagens C91pl e MT2 que apresentaram IMF médio de 4,2 e 3,5 respectivamente.

Células tumorais com marcação negativa apresentaram baixa intensidade de fluorescência com resultados homogêneos e similares aos resultados obtidos pelas células controle, com IMF médio de 1.0 na maioria dos casos.

Expressão da proteína p53 em amostras de pacientes com LLA e LLC.

De acordo com os dados contidos nas tabelas IV e V e, observou-se correlação entre os resultados da expressão da proteína p53 em células leucêmicas obtidas pelos dois métodos. Ao contrário do observado em amostras de linhagens celulares, constatou-se nesse grupo de amostras, níveis percentuais maiores nos resultados obtidos por CF, quando comparados com os das mesmas amostras obtidas por ICQ, não sendo, no entanto evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos dois métodos (Figuras 5 - 7).

Nos pacientes com LLC, observou-se em ambas as técnicas, níveis mais elevados de expressão da proteína p53 em amostras coletadas dos pacientes previamente tratados, particularmente na LLC/SR, quando comparadas com as amostras coletadas dos pacientes no momento de diagnóstico (Tabela IV).

Resultados similares também foram observados nos casos de LLA onde resultados mais expressivos estavam mais acentuados em amostras coletadas de pacientes por ocasião da recaída nos casos de doença refratária quando comparados com os casos de LLA recém diagnosticados (Tabela V).

TABELA I
Análise comparativa entre a Citometria de fluxo e imunocitoquímica

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

Referência: Cavalcanti Júnior GB. Rev Bras Anal Clin 2003; 35 (3): 135-142).

TABELA II
Linhagens de células tumorais empregadas neste estudo

Linhagem Celular	Origem	Proteína 53 / status	Referências
HL-60	Leucemia promielocítica	- / Deleção	10, 18, 32
K562	Leucemia mielóide crônica em crise blástica	- / Mutada	10, 18, 29
Lucena	Derivada da linhagem K562	- / Mutada	10
Jurkat	Linfoma de células T	- / Mutada	10, 18
MT-2	Leucemia de células-T do adulto / HTLV+	+ / Selva gem	10, 18, 28
C91pl	Leucemia de células-T do adulto/ HTLV+	+ / Selva gem	10, 18
Daudi	Linfoma de Burkitt	- / Mutada	10, 18, 31
Raji	Linfoma de Burkitt	+ / Mutada	10, 18, 27, 31
Namalva	Linfoma de Burkitt	+ / Mutada	10, 18, 31

HTLV: Vírus linfotrófico de células T humanas

TABELA III
Expressão da proteína p53 em células das linhagens leucêmicas e linfócitos sadios pelos dois métodos

Linhagem Celular	Citometria de fluxo (*)	Imunocitoquímica (*)
	(%) / IMF	
HL-60	0 / 1,0	0
K562	0 / 1,3	0
Lucena	0 / 1,2	0
Jurkat	0 / 1,1	0
MT-2	87 / 3,5	89
C91pl	87 / 4,2	87
Daudi	3 / 1,2	0
Raji	93 / 51,3	93
Namalva	93 / 42,4	98
Controle (doador)	0 / 1,0	0

(*) mediana dos resultados; IMF: Intensidade média de fluorescência.

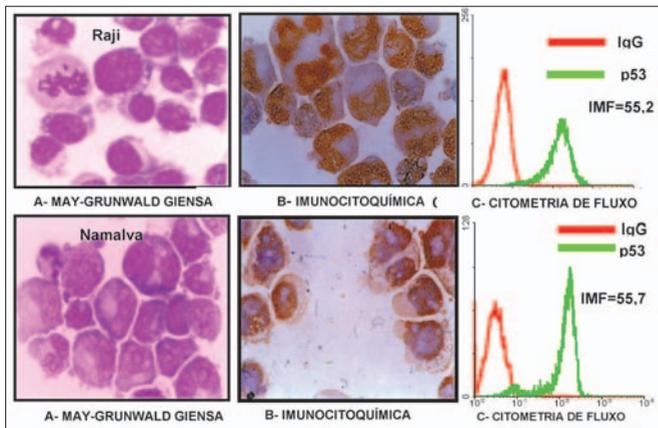


Figura 1- Aspecto citomorfológico e expressão positiva da proteína p53 em células das linhagens Raji e Namalva mantidas em meio de cultura. A) Citomorfologia de citocentrifugado celular após coloração pelo May-Grunwald Giemsa. B) A mesma amostra com forte positividade para a proteína p53 no núcleo das células evidenciada por reação de imunocitoquímica. C) Análise da citometria de fluxo evidenciando elevada intensidade de fluorescência para a proteína p53.

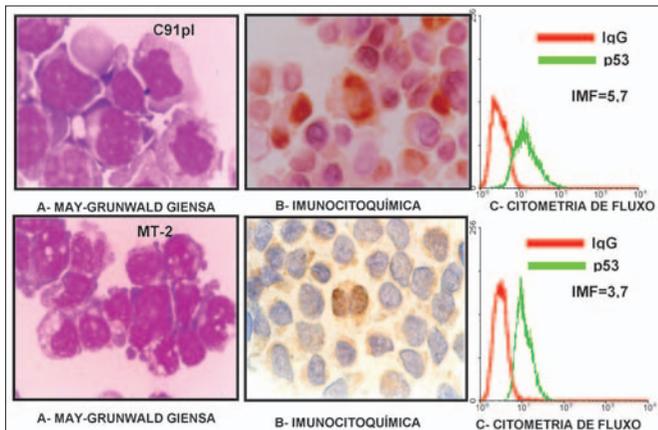


Figura 2- Aspecto citomorfológico e expressão positiva da proteína p53 em células das linhagens MT2 e C91pl mantidas em meio de cultura. A) Citomorfologia de citocentrifugado celular após coloração pelo May-Grunwald Giemsa. B) A mesma amostra com fraca positividade para a proteína p53 no núcleo das células após reação de imunocitoquímica. C) Análise da citometria de fluxo evidenciando baixa intensidade de fluorescência para a proteína p53.

TABELA IV
Expressão da proteína p53 em amostras de pacientes com leucemia linfóide crônica pelos dois métodos

Leucemia linfóide crônica			Imunocitoquímica (%)	Citometria de Fluxo	
Amostras	Status	Estadiamento (*)		(%)	IMF
# Caso 01	SR	AR	80	96	6,8
# Caso 02	AD	BR	0	0	1,0
# Caso 03	AD	BR	0	8	1,5
# Caso 04	AD	BR	0	4	1,3
# Caso 05	AD	BR	0	0	1,0
# Caso 06	PT	RI	60	82	2,2
# Caso 07	SR	AR	80	100	13,3
# Caso 08	PT	AR	60	74	2,0
# Caso 09	SR	AR	70	96	5,3
# Caso 10	PT	AR	75	90	6,8

SR: Síndrome de Richter; AD: ao diagnóstico; PT: previamente tratado; AR: alto risco; BR: baixo risco; RI: risco intermediário. (*) Estadiamento da LLC de acordo com os critérios estabelecidos por Rai e colaboradores: Rai KR; Sawitski A, Cronkite EP, Chamana AD, Levi RN, Pasternack BS. *Blood* 1975; 46: 219-234; Rai KR, Sawitsky, Cronkite EP, Chamana AD, Levi RN, Pasternack BS. *Blood Cells* 1987;12(2):327-238.

TABELA V
Linhagens de células tumorais empregadas neste estudo

Leucemia linfóide aguda		Imunocitoquímica (%)	Citometria de Fluxo	
Amostras	Status		(%)	IMF
# Caso 01	Diagnóstico	0	0	1,0
# Caso 02	Diagnóstico	3	17	1,5
# Caso 03	Recaída	80	100	11,2
# Caso 04	Diagnóstico	0	6	1,4
# Caso 05	Recaída	80	96	2,4
# Caso 06	Recaída	40	56	2,6
# Caso 07	Refratária	10	26	1,5
# Caso 08	Diagnóstico	0	0	1,0
# Caso 09	Diagnóstico	0	0	1,0
# Caso 10	Refratária	15	30	1,6

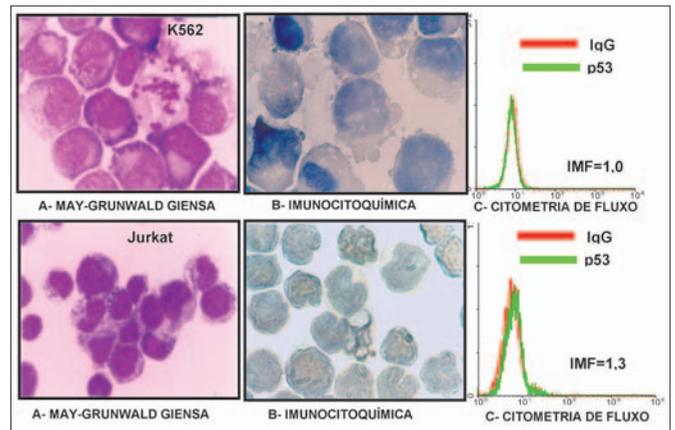


Figura 3- Citomorfologia e expressão negativa da proteína p53 em células da linhagem K562 e Jurkat mantidas em meio de cultura. A) Citomorfologia de citocentrifugado celular após coloração pelo May-Grunwald Giemsa. B) Na mesma amostra, reação negativa para a proteína p53 evidenciada pela reação de imunocitoquímica. C) Análise por citometria de fluxo evidenciando a ausência de fluorescência, caracterizando expressão negativa para a proteína p53.

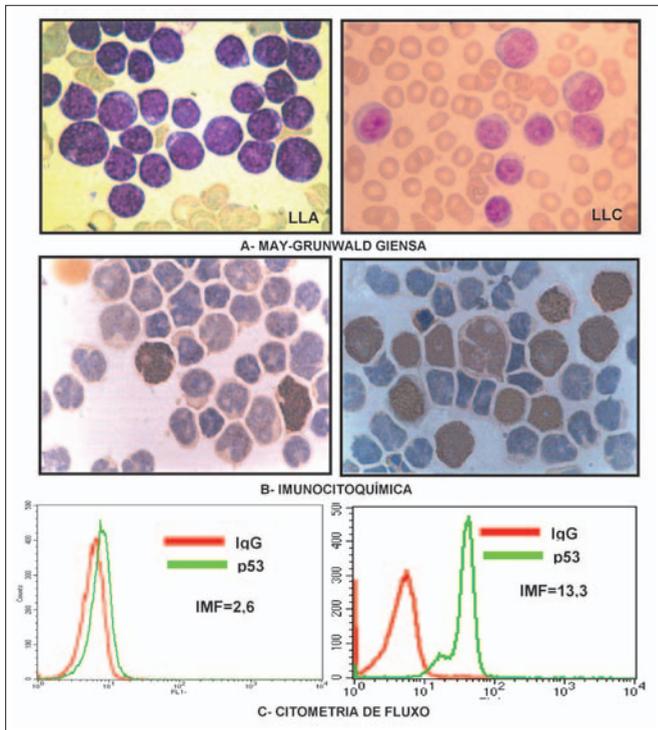


Figura 4- Citomorfologia e expressão da proteína p53 em um caso de leucemia linfóide aguda (à esquerda) e de leucemia linfocítica crônica em transformação (à direita).
A) Citomorfologia de distensão de sangue periférico após coloração pelo May Grunwald Giemsa evidenciando a presença de blastos do tipo L2 da classificação FAB para a LLA e presença de linfócitos e pro-linfócitos na LLC **B)** Na mesma amostra, positividade da proteína p53 no núcleo das células após reação de imunocitoquímica. **C)** Também na mesma amostra, análise por citometria de fluxo demonstrando fraca reatividade para a LLA e forte expressão antigênica para LLC.

DISCUSSÃO

O número crescente de estudos relacionados aos aspectos moleculares da biologia do câncer eleva o interesse sobre o gene *TP53* e a função da respectiva proteína nessas doenças^{1, 2, 9, 22, 23}. A perda da função da proteína p53 durante a carcinogênese pode determinar a progressão inapropriada do ciclo celular após o dano ao DNA, de modo a permitir a sobrevivência das células que, em condições normais, estariam destinadas a entrar em apoptose^{1, 2, 22, 23}. Embora as alterações do gene e proteína p53 ocorram com menor frequência nas neoplasias do sistema hematopoético do que em tumores sólidos, a associação entre a mutação e a superexpressão da proteína p53 nessas neoplasias com a evolução clínica desfavorável nas leucemias têm sido investigada^{3-9, 11, 13}. Nessas doenças, as alterações do gene e proteína p53 são detectadas em 25 a 30% dos linfomas de Burkitt e na crise blástica da leucemia mieloide crônica (LMC), em 5 a 10% das leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásica (SMD), linfomas não Hodgkin (LNH) e na LLC exceto na LLC/SR, onde este percentual é mais elevado. Essas alterações genéticas são raramente observadas na LLA, exceto nas recaídas, na doença refrataria e no tipo citomorfológico L3^{3-9, 11, 13}. Apesar do WB ser referido como método "padrão ouro" na pesquisa da proteína p53 nessas doenças, sua utilização na rotina laboratorial é dificultada em função de algumas de suas particularidades como as numerosas etapas de processamento, a necessidade da utilização de diversos equipamentos e a manipulação de substâncias químicas tóxi-

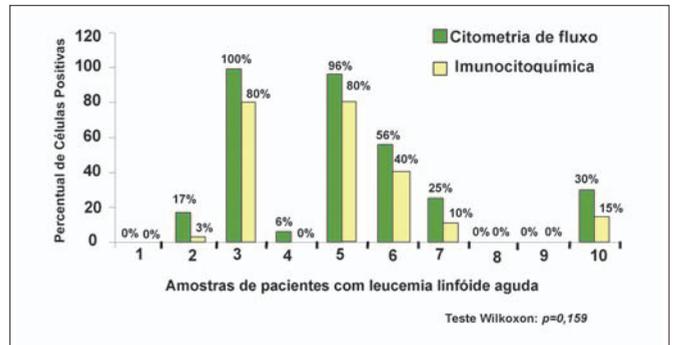


Figura 5 - Valores de expressão da proteína p53 na leucemia linfóide aguda demonstrado pela citometria de fluxo e imunocitoquímica.

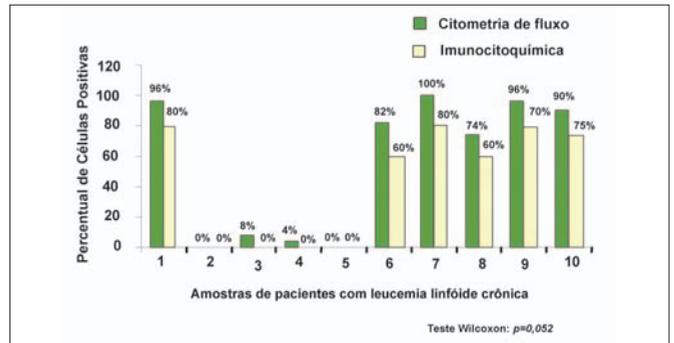


Figura 6- Valores de expressão da proteína p53 na leucemia linfóide crônica demonstrado pela citometria de fluxo e imunocitoquímica.

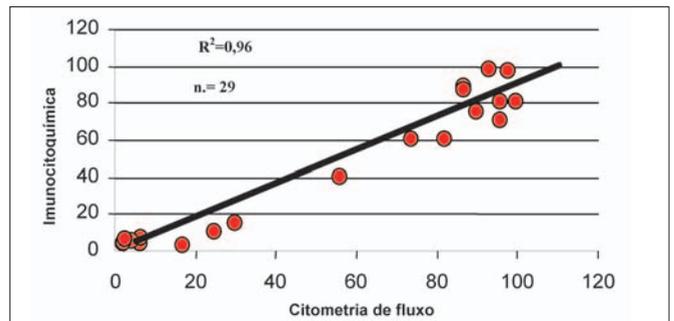


Figura 7- Análise de correlação linear para detecção da proteína p53 determinada pela imunocitoquímica e citometria de fluxo em amostras de pacientes e células de linhagem leucêmicas.

cas^{9, 10, 24}. Tantas peculiaridades assim elevam, significativamente, o custo de execução dessa metodologia e a sua aplicabilidade na rotina laboratorial, levando a substituição por outros métodos como a IHQ, a ICQ e a CF. A IHQ por sua vez, tem suas limitações. A marcação negativa não significa necessariamente ausência de alteração da proteína, podendo configurar um resultado falso negativo. Um resultado negativo de expressão da proteína p53 pode ocorrer em virtude de condições adversas de fixação do tecido, diminuindo a sensibilidade da técnica⁹. Os resultados podem também variar pelo uso de diferentes AcMo, formas de incubação e variações nos métodos de recuperação antigênica, além da subjetividade das contagens e ausência de um valor de *cutoff* uniforme para definir os casos positivos⁹. Por outro lado, a proteína p53 também pode ser detectada em tecidos normais em situações de indução fisiológica frente a alterações acidentais do genoma. No entanto, uma forte expressão no núcleo da maioria das células tumorais, indica uma disfunção da proteína, podendo corresponder a mutação ou estabilização por outros mecanismos⁹.

A ICQ é um método de detecção da proteína p53 que pode empregar células em suspensão, *imprint* de tecidos tumorais ou distensão de sangue e aspirado de medula óssea, apresentando como vantagem a correlação dos resultados com análise citomorfológica, possibilitando também a localização precisa da proteína no núcleo da célula. Esta técnica utiliza células previamente fixadas em lâminas que são submetidas a permeabilização e depois incubadas com AcMo anti-p53. A reação antígeno anticorpo é demonstrada após a adição de uma imunoglobulina conjugada a uma substância reveladora e com especificidade para a fração constante do AcMo^{9, 10, 15}.

A ICQ apresenta, no entanto como fator limitante à rápida degradação da proteína, tornando necessária a preservação do material em baixa temperatura (-80° C)^{9, 10, 15}. Por se tratar de uma metodologia demorada e constituída de muitas etapas, sua utilização na rotina tem sido dificultada, principalmente, quando se utiliza um grande número de amostras o que torna este método alternativo ou completar. Por se tratar de uma metodologia puramente qualitativa, seu resultado limita-se a uma contagem dos elementos positivos ou negativos, ficando a intensidade antigênica sujeita a uma análise subjetiva de acordo com a intensidade da coloração e interpretação do operador^{9, 10}.

Ultimamente a CF tem se destacado como o método de escolha na detecção de marcadores celulares de superfície, intracitoplasmáticos e nucleares, podendo também ser empregada na detecção da proteína p53^{10-14, 16}. Nesse método, a marcação prévia de células com AcMo conjugados a diferentes fluorocromos permite a análise detalhada do fenótipo de uma determinada célula, mesmo em amostras contendo diferentes populações celulares^{10, 16}.

Neste trabalho, investigamos a expressão da proteína p53 em amostras de linhagens de células leucêmicas humanas, linfócitos normais de doadores de sangue e em células leucêmicas de pacientes com LLA e LLC, comparando os resultados obtidos na CF e na ICQ, empregando o AcMo anti-p53 (clone DO-7), específico para a região N - terminal da molécula, que pode ser empregado na detecção da proteína p53 estabilizada por mutação do gene *TP53* ou por outros mecanismos como a interação com outras proteínas do ciclo celular ou virais^{9, 10, 24-26}.

Na pesquisa da proteína p53 por CF, empregamos um protocolo de fixação e permeabilização celular que possibilitasse o acesso e direcionamento do AcMo ao núcleo das células, preservando ao mesmo tempo suas características físico-químicas. Utilizamos para tal, a solução de lise celular da Becton-Dickinson descritos anteriormente por outros autores^{20, 21}, tendo sido este protocolo empregado com modificações por nossa equipe gerando quatro publicações^{10, 24-26}. No presente trabalho, esse mesmo protocolo foi reproduzido com sucesso onde observamos uma boa correlação com os resultados da ICQ em amostras de pacientes leucêmicos (p= 0,159) para a LLC e para a LLA (p= 0,052) e em 100% nas amostras procedentes de linhagens celulares leucêmicas humanas (Tabelas III - V e Figuras 5 - 7).

Apesar da ICQ apresentar desvantagens em termos informativos e operacionais quando comparada com CF, este método, no entanto apresentou a vantagem da reação imunológica se processar na própria célula e de sua análise poder ser associada ao estudo citomorfológico o que possibilitou a distinção entre as células leucêmicas das normais, bem como a descrição precisa da localização da proteína p53 no núcleo das células.

A CF mostrou-se mais adequada para a detecção da expressão da proteína p53 em amostras de pacientes com

leucemias em razão da fácil execução, possibilitando o processamento e análise das amostras em tempo hábil quando comparada com a ICQ. Aliada a estas características, a CF apresentou reprodutibilidade da técnica com concordância nos resultados das análises realizadas em triplicata nas amostras das células tumorais e também nas amostras procedentes do grupo controle, com resultados concordantes tanto na análise quantitativa, quanto na avaliação de densidade antigênica.

As análises das amostras dos doadores serviram também para estabelecer resultados que serviram como parâmetros para definir um ponto de corte, visando identificar valores de *cutoff* uniformes para a expressão da proteína p53 por CF. Observou-se nestes casos variação de 0 a 4% para o percentual de células marcadas e 1,0 a 1,4 para com média de 1.0 para os valores do IMF.

Células das linhagens Raji e Namalva que têm mutação do tipo missense^{10, 18, 27} apresentam níveis de expressão antigênica maiores em detrimento das linhagens C91pl e MT2 que apresentam a forma selvagem do gene *TP53* e que possivelmente apresenta um mecanismo de inativação e estabilização da proteína p53 mediado pelo antígeno TAX do HTLV^{9, 10, 26, 28}.

As linhagens K-562 e Daudi, que também apresentam mutação do gene *TP53* nos codons 135 e 136 do exon 5 e codon 213 no exon 6 respectivamente, as mesmas não mostraram expressão da proteína p53 pelo fato destas mutações impedirem a transcrição da proteína (mutação do tipo *stop codon*)^{18, 29-31}, ocorrendo o mesmo com a linhagem Jurkat que também apresenta mutação stop codon no códon 196 do exon 6¹⁸. A linhagem HL60 também apresenta ausência de transcrição para a proteína p53 por apresentar deleção na região 13p do cromossomo 17^{10, 18, 32}.

Desta forma, a ICQ demonstrou forte positividade no núcleo da maioria das células das linhagens Raji e Namalva (Figura 1), reação positiva, porém menos intensa além de menor quantidade de células positivamente marcadas no núcleo das células das linhagens C91pl e MT2 (Figura 2) e reação negativa para as células das linhagens K562, Lucena, HL-60, Daudi e Jurkat (Figura 3), com resultados similares aos das amostras dos doadores nas análises feitas no CF.

As amostras procedentes dos pacientes leucêmicos apresentaram níveis variáveis de expressão para a proteína p53, porém estatisticamente próximos nos dois métodos (tabelas IV e V; Figuras 5 e 6), sendo também constatados níveis maiores de IMF na CF e maior contagem de células p53+ na CF e ICQ nos casos mais graves dessas doenças como na refratariedade e recorrência da LLA e na LLC/SR. Observou-se também nas amostras de pacientes resultados mais elevados na CF quando comparados com a ICQ. Esses achados associados às características metodológicas da CF e ICQ anteriormente descritas podem refletir em uma maior sensibilidade da CF quando comparada a ICQ, que apresenta além da necessidade de maior tempo de execução (Tabela I). A possibilidade da degradação da proteína p53, quando o material é estocado em temperatura inadequada ou por um tempo prolongado também é um fator limitante e possível causa de erro no emprego da ICQ na pesquisa da proteína p53¹⁰.

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que ambos os métodos de estudo são úteis na detecção da proteína p53 em células leucêmicas.

A CF demonstrou ser uma metodologia mais adequada na

pesquisa da proteína p53 quando comparada com a ICQ em função da simplicidade de execução, maior sensibilidade e por ser mais informativa que a ICQ. Outro ponto importante na vantagem da CF é a rapidez no fornecimento dos resultados quando comparado com a ICQ, podendo desta forma a pesquisa da proteína p53 ser adicionada com marcador adicional no painel para imunofenotipagem de leucemias.

REFERÊNCIAS

1. Soussi T, Debouche K, Bérout C. L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains: le lien entre l'épidémiologie et la carcinogénese. *M/S Synthèse* 2000; 16: 1387-1396
2. Soussi T, Debouche K, Bérout C. p53 Website and analysis of p53 gene mutation in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Human Mut* 2000; 15: 105-113.
3. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler P. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84 (8): 2412-2421.
4. Prokocimer M, Shakai M, Ben Bassat H, Wolf D, Goldfinger N, Rotter V. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood* 1986, 68 (1): 113-118.
5. Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res.* 1991; 53: 257-272.
6. Preudhomme C, Fenaux P. p53 et hemopathies malignes. *Pathol Biol* 1997; 45 (10): 777-908.
7. Martin A. Le gène suppresseur de tumeur p53 (2^a partie): applications en pathologie humaine. *Ann Pathol* 1995; 15 (3): 184-191.
8. Cavalcanti Júnior GB, Klumb CE, Maia RC. p53 e as hemopatias malignas. *Rev Brás.Can.* 2002;419-427.
9. Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002; 24 (2): 111-115.
10. Cavalcanti Júnior GB, Scheiner MAM, Oliveira JGP; Vasconcelos FC, Ferreira ACS, Maia RC. Citometria de fluxo, imunocitoquímica e Western blot na detecção da expressão da proteína p53 em células tumorais: uma análise comparativa. *Rev Bras Anal Clin* 2003; 35 (3): 135-142.
11. Konikova E, Kuseuda O, Babusikova I. Flow cytometry of p53 protein expression in some hematological malignancies. *Neoplasma* 1999; 46 (6): 368-376.
12. Fillippini G, Griffin S, Uhr M, Eppenberger H, Bonilla J, Cavalli F, Soldati G. A novel flow cytometry method for the quantification of p53 gene expression. *Cytometry* 1998; 31: 180-186.
13. Konikova E, Kuseuda O. Flow cytometry of p53 protein expression in some hematological malignancies. *Neoplasma* 2001; 48 (4): 290-298.
14. Kimura O, Sugamura K, Kijima T, Makino M, Shigeru T, Ito H, Kaibara N. Flow cytometry examination of p53 protein in primary tumors and metastases to the liver and lymphonodes of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1996, 39 (12): 1428-1433.
15. Tiniakos DG, Healicon RM, Hair T, Wadehra V, Horne CHW, Angus B. p53 immunostaining as a marker of malignancy in cytologic preparations of body fluids. *Acta Cytol* 1995; 39: 171-176.
16. Mark JJ, Heller R. *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols. Vol 91.* Editora Humana Press; Totowa, New Jersey, USA; 1988.
17. American Type Culture Collection (ATCC): <http://www.atcc.org>. (Capturado em maio de 2005).
18. IARC TP53: <http://www.iarc.fr/p53> (Capturado em maio de 2005).
19. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol*

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dra. Raquel C. Maia
Laboratório de Hematologia Celular e Molecular / Serviço de Hematologia,
Hospital do Câncer I 7º andar, Instituto Nacional de Câncer – RJ.
Praça da Cruz Vermelha nº 23, Centro
CEP: 20230-130 Rio de Janeiro -RJ.



IFCC WORLDBLAB Fortaleza - Brasil

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Elaboração de meio para hemocultura com resina inativadora de antibióticos e comparação laboratorial do meio desenvolvido com o meio bact/alert aerobic fan para a detecção de bacteriemia e fungemia em pacientes em uso de terapia antimicrobiana.*

Elaboration of a blood culture medium with antibiotic-inactivating resin and laboratory comparison of this medium with bact/alert aerobic fan medium for detection of bacteremia and fungemia in patients receiving antimicrobial therapy.

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva¹; Alessandro Pereira Lins² & Caroline Sathler Oliveira da Cruz³

RESUMO - Um novo meio de cultura denominado "Hemocultura GOLD" usado para a ótima recuperação de patógenos da corrente sanguínea (bactérias e fungos) e para a inativação de resíduos de antibióticos em espécimes sanguíneos foi elaborado e estudado em pacientes com diagnóstico de sepsis apesar do uso de terapia antimicrobiana. Os espécimes sanguíneos foram inoculados em frascos GOLD e em frascos aeróbicos FAN do sistema BacT/Alert. Todos os sets de frascos (740 pares no total) foram inoculados com volumes de sangue que variaram de 8 a 10mL. Os frascos foram incubados pelo período padronizado de 7 dias ou até que fossem sinalizados como positivos. Um total de 72 microrganismos relacionados com os processos sépticos foram isolados a partir de amostras de 34 pacientes; 45 isolados foram recuperados de ambos os frascos, 14 foram recuperados somente pelos frascos GOLD e 12 foram recuperados somente pelo frasco aeróbico FAN do sistema BacT/Alert (*P* não significativo). Não houve diferenças significativas entre os dois sistemas na detecção de episódios de septicemia entre os pacientes que estavam recebendo terapia antimicrobiana no momento da realização da coleta do espécime clínico. Das culturas positivas em 72 horas de incubação, o tempo de detecção médio foi menor no sistema BacT/Alert (16,9h) do que no sistema GOLD (18,8h) sendo *P* não significativo. As maiores diferenças nos tempos de detecção foram relacionadas ao isolamento de estreptococos (10,7h pelo sistema BacT/Alert e 17,9h pelo sistema GOLD) e leveduras (média de 26,6h pelo sistema GOLD versus 32,6h pelo sistema BacT/Alert). Com exceção das diferenças citadas acima, os sistemas "Hemocultura GOLD" e BacT/Alert apresentaram-se semelhantes na habilidade de recuperar microrganismos aeróbios e facultativos em pacientes recebendo terapia antimicrobiana.

PALAVRAS-CHAVE - Resina inativadora de antibióticos; Hemoculturas; Infecção sanguínea.

SUMMARY - A new blood culture medium called "Hemocultura GOLD", used to maximum recovery of bloodstream pathogens (bacteria and fungi) and for the inactivate of residual antibiotics in blood specimens, was studied in patients diagnosed as clinically septic despite antimicrobial therapy. The blood specimens were inoculated into GOLD and BacT/Alert Aerobic FAN culture bottles. Both bottles of 740 bottles pairs contained the prescribed blood volume of 8 to 10mL. Bottles were incubated for a standard 7-day protocol or until signaled that they were positive. A total of 72 isolates that were judged to represent true infections were recovered from 34 patients; 45 isolates were recovered from both bottles, 14 were recovered from only the GOLD bottle, and 12 were recovered from only the FAN bottle (*P* was not significant). There was no significant difference between the two systems in the detection of septic episodes among patients receiving antibiotic therapy at the time of blood cultures. Of the cultures found to be positive within the first 72h of incubation, detection was on average earlier by the BacT/Alert system (16.9h) than by the GOLD system (18.8h) but *P* was not significant. Larger differences in average time to detection were seen with streptococci (10.7 h by the BacT/Alert system and 17.9 h by the GOLD system) and yeasts (an average of 26.6h by the GOLD system versus 32.6h by the BacT/Alert system). With the exception of the differences noted above, "Hemocultura GOLD" and BacT/Alert aerobic FAN blood culture bottles were comparable in their abilities to recover aerobic and facultative organisms in patients receiving antimicrobial therapy.

KEYWORDS - Antibiotic-inactivating resin; Blood cultures; Blood stream infection.

INTRODUÇÃO

A infecção da corrente sanguínea, representada pela incapacidade do sistema imune de conter uma infecção em um determinado sítio e, conseqüentemente, impedir disseminação da doença, é um dos mais sérios problemas entre as doenças infecciosas, com tendência a crescer com a utilização de técnicas invasivas para monitorar os pacientes, além do aumento do uso de drogas imunossupressoras^{27,37}. Devido à sua ocorrência freqüente e às taxas de mortalidade tão elevadas, a oportuna detecção e identificação

de uma bacteriemia ou fungemia está entre as mais importantes funções do laboratório de microbiologia. Do ponto de vista diagnóstico, uma hemocultura positiva pode estabelecer uma etiologia infecciosa para a doença do paciente e proporcionar um microrganismo para teste de susceptibilidade e adequação da terapia antimicrobiana^{6,12}. A detecção da infecção na corrente sanguínea tem, por outro lado, importância prognóstica, evidenciando que as defesas do indivíduo falharam na contenção de uma infecção inicialmente localizada e/ou que a terapia de suporte falhou em remover, drenar ou erradicar essa infecção em seu sítio primário^{8,19}.

Recebido em 10/06/2005

Aprovado em 14/11/2005

*Vencedor do prêmio Newprov de melhor trabalho de microbiologia e do prêmio SBAC de melhor trabalho apresentado durante o XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2005.

¹Universidade Federal do Espírito Santo (UFES); ²Laboratório Marcos Daniel (Vitória/ES), Centro ³Tecnológico de Análises - CETAN (Vila Velha/ES).

A cultura de sangue é realizada para identificar bactérias ou outros microrganismos cultiváveis (leveduras, fungos filamentosos). A simples presença de tais microrganismos no sangue é denominada bacteriemia (ou fungemia) e geralmente é patológica^{13,21}. Em indivíduos saudáveis, o sangue é estéril. No entanto, existem algumas exceções: a bacteriemia transitória ocorre frequentemente pouco tempo depois da extração de dentes ou outros tratamentos odontológicos ou cirúrgicos de membranas mucosas contaminadas, de broncoscopia ou cateterização uretral. Este tipo de bacteriemia transitória geralmente é causada por bactérias comensais e, via de regra, resolve-se espontaneamente pela fagocitose das bactérias no fígado ou baço^{10,20,31}. Septicemia é um termo clínico usado para descrever uma bacteriemia ou fungemia com manifestações clínicas de uma infecção severa, o que inclui calafrios, febre, indisposição, toxicidade e hipotensão, sendo o choque sua forma extrema. O número de microrganismos circulantes em episódios de septicemia pode ser pequeno. Mais da metade dos espécimes coletados para hemocultura de pacientes com septicemia confirmada possui uma contagem de menos de 2 unidades formadoras de colônia por mL de sangue total^{14,21,36}.

OBJETIVOS

Os objetivos principais deste estudo foi avaliar a *performance* de uma nova formulação nutritiva acrescida de resina inativadora de antibióticos para o isolamento de bactérias e fungos em amostras sanguíneas, inclusive de pacientes recebendo terapia antimicrobiana e comparar esta formulação com o sistema BacT/Alert na recuperação destes patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Elaboração do meio nutritivo "Hemocultura GOLD"

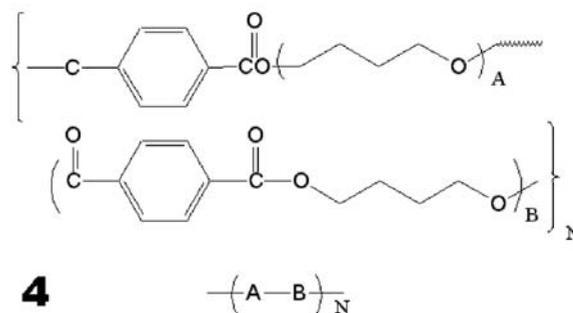
Foi elaborado um novo meio de cultivo com formulação inédita no mercado objetivando uma ótima recuperação de patógenos da corrente sanguínea (bactérias e fungos). A formulação é a que se segue: Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) Merck (15g); Extrato de Levedura (5g); Peptona de Soja (2,5g); Gelatina Bacteriológica (12g); Triptose (2,5g); Cloreto de Sódio (5g); Polianetolsulfonato de Sódio [SPS] (0,25g); Vitamina K (0,005g); Vitamina B1 (0,003g); Vitamina B6 (0,005g); Vitamina H (0,1g); Vitamina B3 (0,2g); L-Cisteína (0,4g); Ácido Para-Aminobenzóico (0,02g); Fosfato Monopotássico (0,2g); Fosfato Dissódico (1,15g); Carvão Ativado em Pó (30g); Água Deionizada (1.000mL); pH final do meio pronto: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

Descrição da utilidade de cada item da formulação

Caldo Brain Heart Infusion (BHI) Merck (fonte de proteínas animais acrescido de glicose como carboidrato fermentável), Extrato de Levedura (um autolisado de leveduras desidratado, que é uma excelente fonte de nitrogênio amínico)^{2,18}, Triptose (um hidrolisado enzimático misto contendo muitos peptídeos diferentes, inclusive os de alto peso molecular – proteoses, excelente fonte de aminoácidos)^{28,35}, Peptona de Soja (obtida através da hidrólise da farinha de soja com papaína que contém, além dos compostos nitrogenados, um alto teor de carboidratos como estaquinose, rafinose e sacarose, além de vários açúcares redutores, sendo também uma excelente fonte de aminoácidos)^{37,42}, Gelatina Bacteriológica (uma proteína colagenosa empregada para neutralizar uma possível inibição do crescimento de bactérias fastidiosas pela presença do anticoagulante SPS)^{33,37},

substâncias reguladoras como Cloreto de Sódio (agente para balanceamento da osmolaridade do meio), L-Cisteína (aminoácido responsável por baixar o potencial de oxidação do meio, beneficiando com isso o isolamento de bactérias anaeróbicas)^{9,15}, Fosfato Monopotássico e Fosfato Dissódico (que atuam como tampões mantendo o pH do meio constante quando há multiplicação microbiana no meio de cultivo)^{35,40} e substâncias impeditivas da ação de antimicrobianos "*in vitro*" como Carvão Ativado em Pó (que decompõe os peróxidos livres no meio e adsorve antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina e lincosamidas, impedindo sua ação "*in vitro*")^{17,22,37}, Ácido Para-Aminobenzóico (usado como inibidor da ação de antibióticos do grupo das sulfonamidas)^{29,31}, Vitamina K (todas as formas de vitaminas K apresentam como parte central a menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), chamada vitamina K3, fundamental para os processos enzimáticos aeróbios e anaeróbios microbianos)^{32,36}, Vitamina B1 (Tiamina – vitamina que se destaca por interferir diretamente no metabolismo de proteínas, lipídeos e principalmente de carboidratos, tendo função de coenzima quando se liga ao fósforo. A tiamina combina-se com trifosfato de adenosina (ATP) e forma uma co-enzima, o pirofosfato de tiamina, necessária ao metabolismo dos carboidratos)^{39,44}, Vitamina B6 (Piridoxina – é convertida em fosfato de piridoxal, que atua como coenzima em vários processos metabólicos que afetam as proteínas, os carboidratos e os lipídios)^{33,37,43}, Vitamina H (Biotina – é uma vitamina do complexo B, sendo uma coenzima essencial no metabolismo de ácidos graxos e em reações de carboxilação)^{21,34}, Vitamina B3 (Nicotinamida – é um componente de 2 coenzimas: o dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NAD) e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP), necessário para o metabolismo lipídico e a respiração celular)^{42,45} e Água Deionizada (diluente das substâncias supra citadas).

Elaboração da resina inativadora de antibióticos: Foi elaborada a partir de precursores com composição química definida gerando, após síntese bioquímica no Centro Químico de Campinas/SP, a resina polimérica (patente requerida pelos autores junto ao INPI) com a seguinte estrutura química:



A resina inativadora de antibióticos foi adsorvida por pérolas de vidro de boro-silicato quimicamente inertes e secas em estufa de vácuo. Foram acrescentadas quatro pérolas preparadas em cada frasco contendo 40mL do meio GOLD citado anteriormente. Os frascos foram então fechados com tampa de borracha, lacrados com selos de alumínio e autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Todas as vitaminas foram adsorvidas por polímeros para evitar a decomposição térmica das mesmas.

Foram realizados estudos minuciosos tanto no caldo "Hemocultura GOLD" elaborado quanto nas pérolas de vidro recobertas com a resina inativadora de antibióticos. Estes

estudos foram conduzidos em diversas instituições brasileiras e estrangeiras (Instituto Adolfo Lutz, Centro Químico de Campinas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Dow Chemicals Ltd. e British Institute of Applied Chemical). Os resultados são demonstrados nos ANEXOS (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e somente após a aprovação criteriosa de cada item estudado o meio de cultura foi colocado em uso.

Testes de controle de qualidade

Foram realizados testes para o controle da qualidade do meio GOLD desenvolvido, correspondendo à *performance* do meio quanto ao crescimento de bactérias e fungos inoculados intencionalmente. Foram inoculadas diluições correspondendo a aproximadamente 10^3 a 10^4 UFC/mL dos seguintes microrganismos: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231. Todos os microrganismos testados apresentaram crescimento abundante após 8, 12, 18 e 24 horas (h) de incubação a 35°C e repiques de 1 microlitro de cada período citado em meios de cultura não seletivos (ágar sangue de carneiro e ágar chocolate), gerando após 24 horas de incubação mais de 100.000 unidades formadoras de colônias para cada microrganismo.

População de pacientes estudada

O estudo foi conduzido em três hospitais de cuidados terciários (Hospital Santa Mônica, Hospital Praia da Costa (ambos do município de Vila Velha/ES) e Hospital FHASDOMAR, Domingos Martins/ES). Todos os hospitais possuem assistência clínica e cirúrgica, possuindo ainda unidades de terapia intensiva adulta e neonatal.

Coleta do sangue para cultura

As amostras de sangue para a cultura foram obtidas de pacientes adultos em cada um dos três hospitais. Todas as amostras de sangue foram analisadas após solicitação médica formal aos laboratórios de referência que atendem a estes hospitais (Laboratório Marcos Daniel, Vitória/ES e Laboratório Medical Lab, Domingos Martins/ES). O sítio da flebotomia foi preparado com polivinil-pirrolidona-iodo (PVPI) antes da venopunção de aproximadamente 20mL de sangue venoso usando-se seringas e agulhas estéreis e descartáveis. As amostras de sangue foram imediatamente inoculadas em frascos GOLD e aeróbico com FAN do sistema BacT/Alert após a descontaminação da tampa de borracha que fecha cada frasco com álcool 70%. Quando a solicitação médica era de 1, 2 ou 3 amostras, estas foram colhidas de forma semelhante, observando-se os períodos de coleta solicitados pelo médico assistente e uma etiqueta foi colocada em cada frasco indicando o seguinte: 1ª amostra, 2ª amostra ou 3ª amostra.

Processamento das amostras nos laboratórios

Quando do recebimento das amostras, as culturas foram encaminhadas segundo os procedimentos operacionais padrão de cada laboratório. Cada frasco em estudo foi comparado visualmente com frascos contendo os mesmos meios de cultura mas inoculados intencionalmente com quantidade conhecida de água destilada estéril para estimar se o volume de sangue era adequado. Os frascos que continham aproximadamente 8 a 10mL de sangue foram considerados apropriados e foram incluídos no estudo. Aqueles que continham volumes maiores ou menores que o padrão foram considerados não aceitáveis e foram pro-

cessados para o benefício do paciente mas os resultados destes frascos não foram inseridos no estudo. Antes da incubação, os frascos do sistema BacT/Alert foram ventilados com agulhas estéreis segundo as recomendações do fabricante. O mesmo foi realizado com os frascos GOLD. Nenhum frasco não ventilado foi incluído no estudo.

Todos os frascos foram examinados com relação a evidências macroscópicas de crescimento microbiano quando recebidos pelos laboratórios. Os frascos com evidência de crescimento microbiano foram imediatamente repicados para meios sólidos sem a incubação posterior dos mesmos em estufa bacteriológica (frascos GOLD) ou no instrumento (frascos do sistema BacT/Alert). Todos os outros frascos foram devidamente incubados em estufa bacteriológica a 35°C (frascos GOLD) e no BacT/Alert (frascos do sistema BacT/Alert) pelo período de 7 dias segundo os procedimentos operacionais padrão dos laboratórios.

Frascos com indicação de crescimento microbiano (turbidez, hemólise ou outro aspecto que pudesse estar relacionado à positividade nos frascos GOLD) e alerta de positividade do sistema BacT/Alert foram separados para análises microscópicas (realização de esfregaço corado pela metodologia de Gram) após homogeneização da mistura sangue-caldo e retirada de alíquota com seringa e agulha estéreis e descartáveis, obedecendo-se todos os critérios de biossegurança relacionados nos procedimentos operacionais padrão de cada laboratório. Baseado nos resultados das colorações de Gram, alíquotas dos frascos considerados positivos foram inoculadas em meios de cultura sólidos apropriados, obedecendo-se procedimentos padronizados. Um subcultivo "cego" terminal em ágar chocolate incubado a 35°C em atmosfera contendo 5 a 7% de CO₂ durante 24 horas foi realizado em cada frasco que, após 7 dias de incubação, foi considerado como "potencialmente negativo". Foram computados todos os alertas de falso-positividade de cada sistema (isto é, frascos considerados previamente como "positivos" mas com resultados negativos na coloração de Gram e no subcultivo).

Análise dos dados

As informações geradas no estudo foram analisadas estatisticamente utilizando-se o teste do qui-quadrado descrito por McNemar e modificado, quando necessário, usando a correção de Yates quando n foi menor ou igual a 20. Este estudo não objetivou a análise de dados de isolamentos de bactérias anaeróbias obrigatórias nem de micobactérias⁴².

RESULTADOS

Um total de 1.206 espécimes sanguíneos foram coletados de pacientes nos três hospitais participantes do estudo, totalizando 740 pares de frascos (considerando-se 1, 2 e 3 amostras solicitadas pelos médicos assistentes); 103 (13,9%) destas culturas foram positivas, havendo a recuperação de 115 bactérias ou fungos.

Os resultados comparativos dos isolamentos de bactérias e fungos a partir dos frascos GOLD e do sistema BacT/Alert são mostrados na Tabela-1. Dos 72 microrganismos clinicamente relevantes isolados, 45 (62,6%) foram recuperados de ambos os frascos, 14 (19,9%) foram recuperados somente a partir do frasco GOLD e 12 (17,5%) recuperados somente do frasco do sistema BacT/Alert (*P* = não significativo).

Não há diferenças estatisticamente significativas na habilidade de ambos os sistemas para detectar os episódios de

septicemia. Vários pacientes recebiam terapia antimicrobiana quando da coleta do espécime clínico para cultura. A Tabela-2 detalha a recuperação de várias espécies de bactérias e fungos isolados de pacientes que estavam em curso de terapia antimicrobiana. Das 72 amostras positivas, 24 (32,9%) foram obtidas de pacientes recebendo terapia antimicrobiana. Não há diferenças estatisticamente significativas nos índices de isolamento dos dois meios de cultura utilizados tanto de pacientes sem terapia antimicrobiana quanto daqueles que estavam utilizando antibióticos. A Tabela-3 indica os índices comparativos de isolamento de 39 microrganismos considerados contaminantes. Nove (23,1%) foram recuperados de ambos os frascos, 13 (33,2%) foram isolados somente nos frascos GOLD e 17 (43,7%) foram isolados somente nos frascos do sistema BacT/Alert ($P < 0,025$). Embora os índices de contaminação foram maiores nos frascos do sistema BacT/Alert, não há diferenças estatisticamente significativas nos índices de detecção de espécies contaminantes quando analisamos os dados individualmente. Em geral, todos os microrganismos clinicamente relevantes foram detectados muito satisfatoriamente por ambos os sistemas. Os percentuais cumulativos dos isolados clinicamente significativos detectados por cada sistema em 24h, 48h e 72h foram 79,2, 90,5 e 94,2% respectivamente para os frascos GOLD e 72,9, 92,0 e 98,0% respectivamente para os frascos do sistema BacT/Alert. A velocidade de detecção (percentuais cumulativos) dos vários microrganismos isolados é mostrada na Tabela-4. Dos 45 microrganismos detectados por ambos os sistemas, 2 (3,5%) foram detectados ao mesmo tempo, 26 (59,2%) foram detectados primeiro pelos frascos GOLD e 17 (37,2%) foram detectados primeiro pelo sistema BacT/Alert ($P < 0,001$). O cresci-

mento de estafilococos coagulase-negativos, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e estreptococos do grupo "viridans" em geral foi detectado primeiro pelo sistema BacT/Alert, enquanto o crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* em geral foi detectado primeiro pelos frascos GOLD.

Para aqueles microrganismos os quais foram detectados dentro das primeiras 72h por um ou outro sistema e que eventualmente cresceram em ambos os sistemas, em geral o sistema BacT/Alert teve melhor performance na detecção mais rápida dos microrganismos (16,9h) em comparação com os frascos GOLD (18,8h). Como indicado na Tabela-5, para a maioria dos microrganismos, a diferença no tempo de detecção entre os dois sistemas foi pequena, geralmente de 1 a 3h.

Das 72 culturas positivas, somente 2 frascos do sistema BacT/Alert (ambos contendo *Staphylococcus aureus* isolados a partir do mesmo paciente) e 2 frascos GOLD (um *S.aureus* e um *S.warneri* de pacientes diferentes) recuperaram isolados clinicamente significativos após 5 dias (120h) de incubação. Um destes episódios (*S.aureus*) foi detectado somente após o sexto dia. Estas duas hemoculturas foram de pacientes diferentes, cada um representado somente por 1 frasco positivo. Microrganismos considerados contaminantes foram recuperados após o sexto dia de incubação (1 [3,3%] pelo sistema BacT/Alert e 1 em frasco GOLD). Duas hemoculturas (1,9%) foram consideradas positivas pelo sistema BacT/Alert no sétimo dia de incubação mas se mostraram negativas quando do Gram e do subcultivo. Somente 6 (0,7%) frascos GOLD apresentaram sinais falsos de positividade (turvação) e em cujos subcultivos não houve crescimento de microrganismos nem foram visualizados microrganismos no Gram.

TABELA I
Resultados comparativos dos microrganismos isolados nos sistemas GOLD e BacT/Alert Aerobic FAN

Microrganismos	Número de isolados recuperados de:			P
	Ambos frascos	Somente GOLD	Somente Aerobic FAN	
Cocos Gram-positivos				
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	4	4	NS ^a
<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>	8	4	4	NS
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2	1	NS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	0	NS
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0	0	NS
<i>Streptococcus</i> do grupo "viridans" ^c	2	0	0	NS
Bastonetes Gram-negativos				
<i>Escherichia coli</i>	5	2	1	NS
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0	0	NS
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	NS
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	NS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1	1	NS
Bactérias anaeróbicas				
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	0	0	NS
Fungos				
<i>Candida albicans</i>	3	1	1	NS
<i>Candida tropicalis</i>	1	0	0	NS
Todos os microrganismos	45	14	12	NS

^a NS, não significativo ($P > 0,05$).

^b 3 *Staphylococcus epidermidis*, 3 *Staphylococcus haemolyticus*, 2 *Staphylococcus warneri*.

^c 1 *Streptococcus sanguis*, 1 *Streptococcus mitis*.

TABELA II
Resultados comparativos dos microrganismos isolados nos sistemas GOLD e BacT/Alert Aerobic FAN a partir de pacientes que estavam recebendo terapia antimicrobiana no momento da coleta do espécime sanguíneo para cultura

Microrganismos	Número de isolados recuperados de:			P
	Ambos frascos	Somente GOLD	Somente Aerobic FAN	
Cocos Gram-positivos				
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	2	2	NS ^a
<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>	2	1	1	NS
<i>Streptococcus</i> do grupo "viridans" ^c	2	1	1	NS
Bastonetes Gram-negativos				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	NS
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	NS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1	0	NS
Fungos				
<i>Candida albicans</i>	2	1	1	NS
Todos os microrganismos	14	6	5	NS

^a NS, não significativo ($P > 0,05$).

TABELA III
Resultados comparativos dos microrganismos considerados contaminantes isolados nos sistemas GOLD e BacT/Alert Aerobic FAN

Microrganismos	Número de isolados recuperados de:			P
	Ambos frascos	Somente GOLD	Somente Aerobic FAN	
Cocos Gram-positivos				
<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>	7	10	12	NS ^a
<i>Micrococcus sp.</i>	0	1	1	NS
Bastonetes Gram-positivos				
<i>Corynebacterium sp.</i>	1	1	1	NS
<i>Bacillus spp.</i>	1	1	2	NS
<i>Propionibacterium sp.</i>	0	0	1	NS
Todos os microrganismos	9	13	17	NS

^a NS, não significativo ($P > 0,05$).

TABELA IV
Resultados comparativos relacionados à velocidade de detecção de positividade dos sistemas GOLD e BacT/Alert Aerobic FAN

Microrganismos	Número de isolados recuperados de:			P
	Ambos frascos ao mesmo tempo	GOLD detectou primeiro	Aerobic FAN detectou primeiro	
Cocos Gram-positivos				
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6	5	NS ^a
<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>	2	6	1	< 0,001
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0	< 0,001
<i>Streptococcus</i> do grupo "viridans" ^c	0	2	1	< 0,005
Bastonetes Gram-negativos				
<i>Escherichia coli</i>	3	1	2	NS
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	NS
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	1	1	NS
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	NS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	1	NS
Fungos				
<i>Candida albicans</i>	0	1	2	< 0,001
<i>Candida tropicalis</i>	0	1	2	NS
Todos os microrganismos	15	20	15	< 0,001

^a NS, não significativo ($P < 0,05$).

TABELA V
Tempo médio para detecção do crescimento dentro das primeiras 72 horas de incubação nos sistemas GOLD e Bact/Alert Aerobic FAN

Microrganismos	Média de tempo (h) para detecção de positividade:		P
	Aerobic FAN	GOLD	
Cocos Gram-positivos			
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,0	18,1	0,03
<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>	18,4	21,3	0,0001
<i>Enterococcus faecalis</i>	11,6	21,9	0,0002
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10,3	12,8	0,0001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8,3	12,9	0,03
<i>Streptococcus</i> do grupo "viridans"	11,7	19,4	0,0003
Bastonetes Gram-negativos			
<i>Escherichia coli</i>	13,1	14,4	NS ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,7	11,8	NS
<i>Enterobacter spp.</i>	19,9	20,1	NS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,7	16,4	NS
Fungos			
<i>Candida albicans</i>	43,5	31,2	0,002
<i>Candida tropicalis</i>	21,8	22,1	NS
Média dos tempos de positividade (h)	16,9	18,8	0,0003

^a NS, não significativo (P < 0,05).

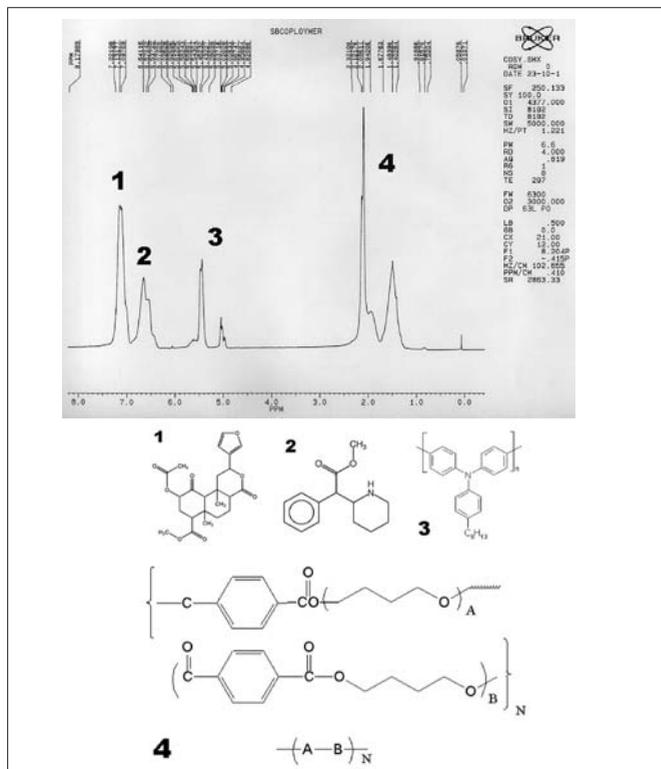


FIGURA 1: Síntese química da resina inativadora de antibióticos. O gráfico mostra as etapas da síntese através de espectrofotometria por infra-vermelho, indicando as moléculas utilizadas como precursores (estruturas 1, 2 e 3) gerando, como produto final, a resina polimérica (estrutura 4).



FIGURA 2: Estrutura molecular da Resina Inativadora de Antibióticos sintetizada quimicamente (Molscrip[®] e Raster3D[®]).

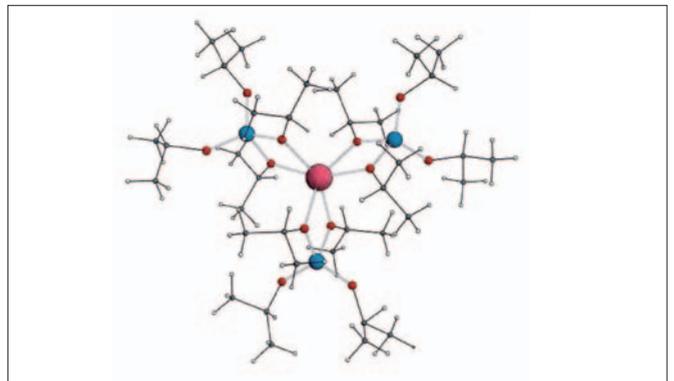


FIGURA 3: Estrutura molecular da Resina Inativadora de Antibióticos sintetizada quimicamente (Molscrip[®] e Raster3D[®]).

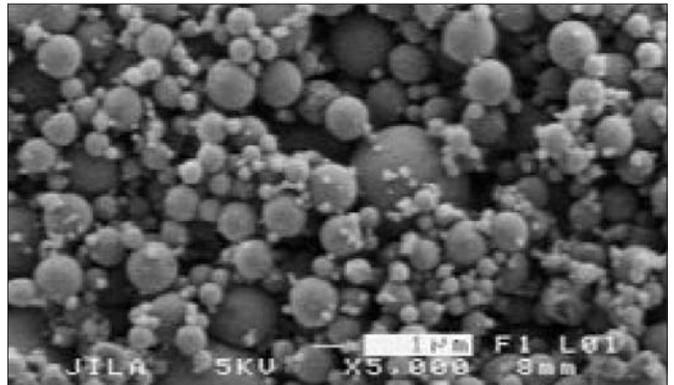


FIGURA 4: Microscopia eletrônica da Resina Inativadora de Antibióticos evidenciando o padrão polimérico esférico assumido pela mesma após a síntese química [Aumento de 4.500x].

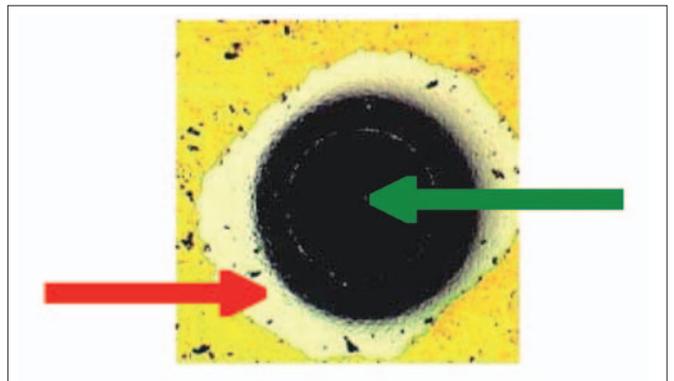


FIGURA 5: Microscopia eletrônica da esfera de vidro (seta verde) recoberta com a Resina Inativadora de Antibióticos (seta vermelha) [Aumento de 6.500x].

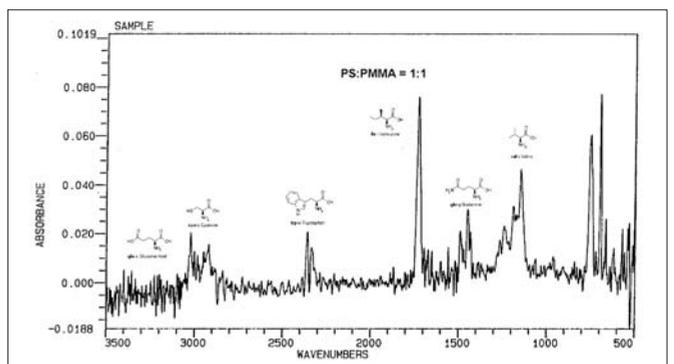


FIGURA 6: Composição de aminoácidos presentes no caldo de hemocultura GOLD. O gráfico mostra os aminoácidos que compõem a parte nutritiva do meio (juntamente com outros fatores de crescimento). Gráfico obtido através de espectrofotometria por infra-vermelho após a esterilização do meio.

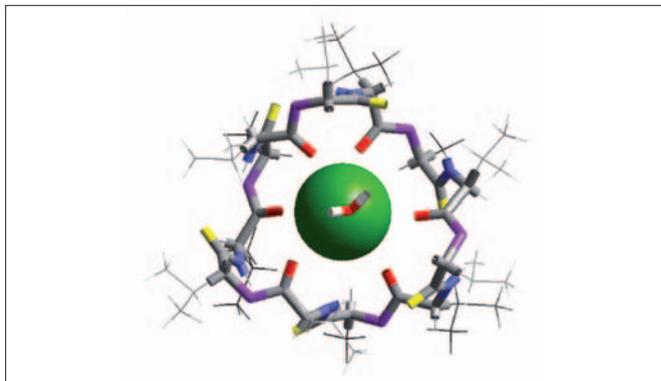


FIGURA 7: Estrutura molecular da Resina Inativadora de Antibióticos com os respectivos sítios de ligação adsorvendo uma molécula de oxacilina (esfera verde) – visão frontal (Molscrip[®] e Raster3D[®]).

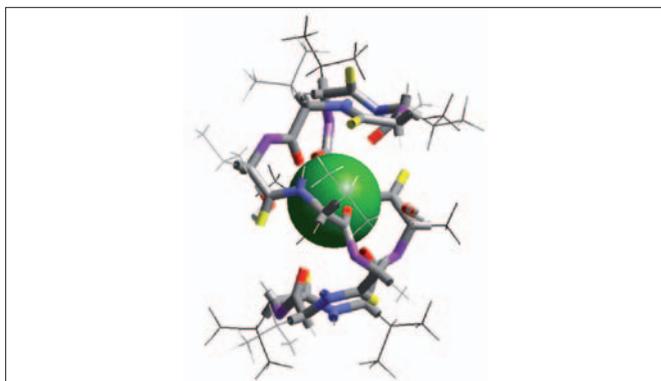


FIGURA-8: Estrutura molecular da Resina Inativadora de Antibióticos com os respectivos sítios de ligação adsorvendo uma molécula de oxacilina (esfera verde) – visão lateral (Molscrip[®] e Raster3D[®]).

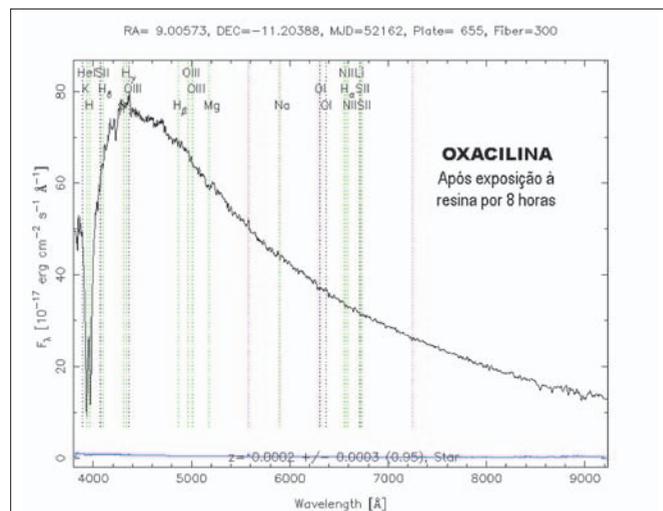


FIGURA-9: Diminuição substancial da concentração de oxacilina introduzida intencionalmente no meio de hemocultura GOLD após 8 horas de contato com a Resina Inativadora de Antibióticos e incubação a 35°C. Gráfico obtido através de espectrometria de massa.

DISCUSSÃO

Os meios para cultura de sangue são nutricionalmente enriquecidos, como os caldos trípticos de soja, caldos de peptonas suplementadas, caldo de cérebro e coração, caldo Columbia e caldo *Brucella*^{27,36}. Entretanto, variações na composição do mesmo tipo de meio derivados de diferen-

tes fornecedores podem afetar a *performance* destes meios. No mercado brasileiro, os caldos de hemocultura em sistemas manuais utilizam formulações simples, com poucos fatores de crescimento para bactérias fastidiosas, como frações mais largas de peptídeos, vitaminas e aminoácidos. Em geral são caldos encontrados prontos na forma de pó obtidos diretamente dos fornecedores (Merck, Oxoid, Bio-brás, Difco, etc.) sem qualquer alteração importante, onde somente a adição do SPS pode ser observada (caldos de hemocultura tendo como base TSB, BHI ou Tioglicolato representam mais de 90% das formulações disponíveis comercialmente no Brasil).

Apesar da disponibilidade de drogas antimicrobianas, as taxas de mortalidade por septicemia continuam altas em todo o mundo. A identificação e a susceptibilidade dos patógenos devem ser determinadas tão cedo quanto possível durante a septicemia, uma vez que a administração precoce do antimicrobiano apropriado aumenta as chances de sobrevivência do paciente. Entretanto, o isolamento rápido dos patógenos envolvidos no processo infeccioso pode ser difícil quando o paciente está sob uso de terapêutica antimicrobiana^{8,11,19,36}. Estas drogas podem ser transferidas juntamente com o sangue para o interior do frasco de hemocultura e inibir o crescimento bacteriano "*in vitro*"^{17,31,44}. Oponinas naturais, beta-lisinas e outros inibidores encontrados no sangue também podem suprimir o crescimento microbiano nos frascos de hemocultura^{4,7,17}.

Muitos métodos foram desenvolvidos para minimizar este efeito: diluição substancial do sangue nos frascos contendo os caldos nutritivos, remoção dos microrganismos através de filtração em membrana e inativação dos agentes antimicrobianos com penicilinase, SPS ou derivados de tiol^{5,13,41}. Melnick e Wallis (J.L. Melnick e C.Wallis, U.S. Patent 4.145.304, 1979) desenvolveram um método para a remoção de antibióticos e outros inibidores do crescimento bacteriano do sangue humano sem uma diminuição significativa da concentração bacteriana. Eles desenvolveram um sistema misto de resinas chamado *Antimicrobial Removal Device* (ARD) (Marion Scientific, Kansas City, MO, EUA)^{1,40,41} o qual remove antibióticos e alguns inibidores do crescimento bacteriano eficientemente após a agitação do sangue coletado com estas resinas e posterior inoculação nos frascos comuns de hemocultura. Os frascos contendo o ARD possuem uma suspensão salina de 15mL de uma resina polimérica adsorvente, 10mL de uma resina de troca catiônica e 5mg de SPS. Este sistema teve sua produção descontinuada há alguns anos e nunca chegou a ser comercializado no Brasil.

Em 1990 a Organon Teknika (Durham, NC, EUA) introduziu no mercado um sistema automatizado para a detecção de patógenos da corrente sanguínea denominado BacT/Alert⁴⁶. Este sistema é baseado na detecção colorimétrica de concentrações de CO₂ por meio de um sensor colocado internamente no fundo dos frascos de hemocultura. Cada sensor é monitorado a cada 10 minutos por um refletômetro. O fabricante indicava a utilização deste sistema também para amostras provenientes de pacientes em uso de terapia antimicrobiana, utilizando-se para tanto os frascos com Fator Neutralizador de Antibióticos (FAN). As culturas positivas são reconhecidas através de um *software* que monitora o CO₂ inicial e o aumento desse gás no interior do frasco. O sistema BacT/Alert é capaz de incubar, agitar e monitorar continuamente frascos aeróbios e anaeróbios. O sistema foi posteriormente vendido para a bio-Mérieux (Marcy l'Etoile, França). Os frascos do sistema Bactec (B-D Diagnostic Systems, Sparks, MD, EUA) que,

segundo o fabricante, também podem ser utilizados para a cultura de amostras de pacientes em uso de drogas antimicrobianas, contém resina adsorvente não iônica (13,3% p/v), resina de troca catiônica (0,8% p/v) e SPS (0,025% p/v) em 30mL de caldo triptico de soja.

A maioria dos meios para hemocultura comercialmente disponíveis contém o anticoagulante SPS em concentrações que variam de 0,025% a 0,05%. Além das propriedades de inibição da coagulação do sangue, o SPS também inativa neutrófilos e certos antibióticos, incluindo estreptomina, kanamicina, gentamicina e polimixina, além de precipitar o fibrinogênio, beta-lipoproteínas, beta-1C-globulina e outros componentes do complemento sérico^{8,27,37}. Krogstad *et al.* demonstraram que a habilidade do SPS para inativar aminoglicosídeos depende das suas propriedades polianiónicas. Este efeito também foi produzido por outros poliânions (como o sulfato de dextran) mas não por detergentes não iônicos e foi antagonizado por resinas de troca iônica. Os experimentos de ultra-filtração demonstraram que os aminoglicosídeos são adsorvidos pelos poliânions e as determinações de sódio total e livre nos meios de cultivo contendo SPS indicam que este efeito é independente da carga iônica¹⁸.

O SPS pode também inibir o crescimento de certas bactérias (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptobacillus moniliformis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* e *Gardnerella vaginalis*) conforme o relato de diversos autores^{30,37,45}. Graves *et al.* demonstraram que o crescimento de *Panaerobius* é inibido pelo SPS em concentrações de 0,05%³⁴. Wilkins e West demonstraram que a inibição de crescimento promovida pelo SPS pode ser neutralizada em meios de cultura pela adição de 1,2% de gelatina em pó²⁸. Um efeito de proteção similar foi também demonstrado em culturas de *N.gonorrhoeae* e *N.meningitidis* por Eng e Holten. A inclusão de gelatina em pó a 1,2% permitiu que os gonococos e meningococos sensíveis ao SPS se desenvolvessem livremente tanto em meios sólidos quanto em caldos nutritivos apesar da presença do anticoagulante. A proteção fornecida pela gelatina pode ser mediada pelo efeito de colóide e ainda através da estabilização da membrana citoplasmática⁸. Wilkins e West também sugeriram que proteínas ou largos fragmentos protéicos contendo uma estrutura terciária própria capaz de se ligar às moléculas de SPS podem, quando presentes em concentração suficiente, proteger contra o efeito inibitório do SPS. O BHI, uma infusão de tecido cerebral e cardíaco bovino possui predominantemente porções intactas de proteínas e de largos fragmentos protéicos, os quais permitem fortes ligações às moléculas de SPS, protegendo, portanto, as bactérias do efeito inibitório deste anticoagulante. A adição de sangue a este meio também aumenta a concentração de proteínas que podem auxiliar no processo de inibição da ação deletéria do SPS. Já o TSB, um digerido enzimático de proteínas, contém predominantemente pequenos fragmentos de peptona e a adição da mesma quantidade de sangue relatada anteriormente em geral não provê uma taxa de proteção adequada aos efeitos inibitórios do SPS. Além disso, Wilkins e West também concluíram que a adição de sangue a um meio com fragmentos de peptona obtidos enzimaticamente não conferiu proteção contra a inibição de *Streptobacillus*, *Gardnerella* e *Peptostreptococcus* pelo SPS²⁸.

Apesar dos dois sistemas avaliados neste estudo mostrarem *performance* semelhante comparativamente na recuperação de isolados clinicamente significativos, houve uma maior tendência de isolamento de microrganismos conta-

minantes no sistema BacT/Alert (estafilococos coagulase-negativos, *Bacillus spp.* e *Propionibacterium spp.*), resultando em dados estatisticamente importantes ($P < 0,025$). Os dois sistemas foram também comparados com relação a velocidade de detecção de positividade para a recuperação de patógenos clinicamente importantes. Em geral, as bactérias Gram-positivas foram detectadas mais precocemente pelo sistema BacT/Alert, enquanto os fungos leveduriformes isolados foram recuperados mais precocemente pelo sistema GOLD. O sistema BacT/Alert, em geral, recuperou os microrganismos clinicamente importantes mais cedo quando comparado com o sistema GOLD. Entretanto, a magnitude das diferenças no tempo de detecção das maioria dos microrganismos foi frequentemente de 1 a 3h, o qual não pode ser considerado como um intervalo clinicamente importante ($P < 0,001$). As mais notáveis diferenças nos tempos de detecção entre os dois sistemas foi com relação aos *Enterococcus faecalis* e estreptococos do grupo "viridans", os quais foram detectados 7h ou mais cedo pelo sistema BacT/Alert e as leveduras, as quais foram detectadas 12h ou mais cedo pelo sistema GOLD.

Uma semelhança adicional entre os sistemas comparados foi a dificuldade da leitura dos esfregaços corados pelo método de Gram a partir de alíquotas de ambos os frascos. O carvão ativado contido em ambos os sistemas possui tamanhos similares aos das bactérias e fungos leveduriformes e é, invariavelmente, depositado nas lâminas de vidro quando da preparação dos esfregaços. Na maioria dos casos a presença de partículas de carvão na lâmina não atrapalhou a acurácia da leitura e interpretação dos esfregaços corados. Entretanto, em poucas ocasiões foi requerido o crescimento do microrganismo em meio sólido para se confirmar a interpretação dos esfregaços corados.

CONCLUSÃO

Este estudo pode mostrar que a formulação do caldo de hemocultura GOLD possui várias vantagens sobre os caldos comercialmente disponíveis, especialmente pelo maior valor nutritivo, possibilitando o crescimento de microrganismos fastidiosos, além da inativação de vários antibióticos "in vitro", os quais poderiam resultar em caldos de hemocultura falsamente negativos, gerando enormes consequências negativas para o tratamento correto do paciente. Neste estudo também houve a demonstração clara de que a formulação sugerida, aliada à resina inativadora de antibióticos, pode se tornar uma alternativa economicamente viável para todos os laboratórios clínicos, uma vez que sua *performance* foi comparável ao sistema automatizado BacT/Alert, sem que houvesse a necessidade de instrumentos e *softwares* específicos para o monitoramento das amostras, gerando confiabilidade e boa relação custo x benefício ao laboratório clínico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra.Márcia Tomaz Freire pela criteriosa revisão deste artigo.

REFERÊNCIAS

1. Appleman, M.D., Swinney, R.S., Heseltine, P.N.R. 1982. Evaluation of the antimicrobial removal device. J. Clin. Microbiol. 15:278-281.
2. Auckenthaler, R., B. Pepey, and P. Rohner. 1992. Comparison of the BacT/Alert with the Signal Oxoid blood culture system, abstr. C-55, p. 429. In Abstracts of the 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology 1992. American Society

- for Microbiology, Washington, D.C.
3. Bannister, E. B., and G. L. Woods. 1995. Evaluation of routine anaerobic blood cultures in the BacT/Alert blood culture system. *Am. J. Clin. Pathol.* 104:279-282.
 4. Cornish, N., B. A. Kirkley, K. A. Easley, and J. A. Washington. 1998. Reassessment of the incubation time in a controlled clinical comparison of the BacT/Alert aerobic FAN bottle and standard anaerobic bottle used aerobically for the detection of bloodstream infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 32:1-7.
 5. Cornish, N., B. A. Kirkley, K. A. Easley, and J. A. Washington. 1999. Reassessment of the routine anaerobic culture and incubation time in the BacT/Alert FAN blood culture bottles. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 35:93-99.
 6. Doern, G. V., R. Vautour, M. Gaudet, and B. Levy. 1994. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 32:1757-1762.
 7. Eykyn, J. S., E. R. Gransden, and I. Phillips. 1990. The causative organisms of septicemia and their epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 25(Suppl. C):41-58.
 8. Eng, J., Holten, E. 1977. Gelatin neutralization of the inhibitory effect of sodium polyanethol sulfonate on *Neisseria meningitidis* in blood culture media. *J. Clin. Microbiol.* 6:1-3.
 9. Illstrup, D. M. 1978. Statistical methods employed in the study of blood culture media, p. 31-39. In J. A. Washington II (ed.), *The detection of septicemia*. CRC Press, West Palm Beach, Fla.
 10. Illstrup, D. M., and J. A. Washington II. 1983. The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and fungemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1:107-110.
 11. Isaacman, D. J., R. B. Karasic, E. A. Reynolds, and S. I. Kost. 1996. Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. *J. Pediatr.* 128:190-195.
 12. James, P. A., and K. M. Al-Shafi. 2000. Clinical value of anaerobic blood culture: a retrospective analysis of positive patient episodes. *J. Clin. Pathol.* 53:231-233.
 13. Kellogg, J. A. 1995. Selection of a clinically satisfactory blood culture system: the utility of anaerobic media. *Clin. Microbiol. News* 17:121-128.
 14. Kellogg, J. A., J. P. Manzella, and D. A. Bankert. 2000. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J. Clin. Microbiol.* 38:2181-2185.
 15. Kennaugh, J. D., W. W. Gregory, K. R. Powell, and J. O. Hendley. 1984. The effect of dilution during culture on detection of low concentrations of bacteria in blood. *Pediatr. Infect. Dis.* 3:317-319.
 16. Kirkley, B. A., K. A. Easley, and J. A. Washington. 1994. Controlled clinical evaluation of Isolator and ESP aerobic blood culture systems for detection of bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 32:1547-1549.
 17. Krisher, K., D. R. Whyburn, and F. E. Koepnick. 1993. Comparison of the BacT/Alert pediatric blood culture system, Pedi-BacT, with the conventional culture using the 20-milliliter Becton-Dickinson supplemented peptone broth tube. *J. Clin. Microbiol.* 31:793-797.
 18. Krogstad, D., Murray, P.R., Granich, G.G., Niles, A.C., Ladenson, J.H. and Davis, J.E. 1981. Sodium polyanethol sulfonate inactivation of aminoglycosides. *J. Clin. Microbiol.* 20:272-274.
 19. Lindsey, N.J., Riely, P.E. 1981. In vitro antibiotic removal and bacterial recovery from blood with an antibiotic removal device. *J. Clin. Microbiol.* 13:503-507.
 20. Martin, W. J. 1992. Routine anaerobic blood cultures: reasons for continued use. *Clin. Microbiol. News* 14:133-135.
 21. McDonald, L. C., J. Fune, L. B. Gaído, M. P. Weinstein, L. G. Reimer, T. M. Flynn, M. L. Wilson, S. Mirrett, and L. B. Reller. 1996. Clinical importance of increased sensitivity of BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 34:2180-2184.
 22. Mermel, L. A., and D. G. Maki. 1993. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann. Intern. Med.* 119:270-272.
 23. Mirrett, S., R. J. Everts, and L. B. Reller. 2001. Controlled comparison of original vented aerobic FAN medium with new nonvented BacT/ALERT FA medium for culturing blood. *J. Clin. Microbiol.* 39:2098-2101.
 24. Morris, A. J., M. L. Wilson, S. Mirrett, and L. B. Reller. 1993. Rationale for selective use of anaerobic blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 31:2110-2113.
 25. Murray, P. R., P. Traynor, and D. Hopson. 1992. Critical assessment of blood culture techniques: analysis of recovery of obligate and facultative anaerobes, strict aerobic bacteria, and fungi in aerobic and anaerobic blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 30:1462-1468.
 26. Paisley, J. W., and B. A. Lauer. 1994. Pediatric blood cultures. *Clin. Lab. Med.* 14:17-30.
 27. Reller, L. B., P. R. Murray, and J. D. MacLowry. 1982. *Cumitech 1A, Blood cultures II*. Coordinating ed., J. A. Washington II. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 28. Rintala, L., Pollock, H.M. 1978. Effects of two blood culture anticoagulants on growth of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 7:332-336.
 29. Roberts, F. J., I. W. Geere, and A. Coldman. 1991. A three-year study of positive blood cultures, with emphasis on prognosis. *Rev. Infect. Dis.* 13:34-46.
 30. Rodriguez, F., Lorian, V. 1985. Antibacterial activity in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 21:262-263.
 31. Rohner, P., and R. Auckenthaler. 1993. Blood culture results of ambulatory versus hospitalized patients, abstr. C-231, p. 487. In *Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 32. Rohner, P., H. Burkardt, H. Dreismann, and R. Auckenthaler. 1991. Evaluation of the new improved BCB Release blood culture medium for the BCB Roche system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:620-624.
 33. Salonen, J. H., E. Eorola, and O. Meurman. 1998. Clinical significance and outcome of anaerobic bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 26:1413-1417.
 34. Sawhney, D., S. Hinder, D. Swaine, and E. Y. Bridson. 1986. Novel method for detecting microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Pathol.* 39:1259-1263.
 35. Sharp, S. E. 1991. Routine anaerobic blood cultures: still appropriate today? *Clin. Microbiol. News* 13:179-181.
 36. Sharp, S. E., J. C. McLaughlin, J. M. Goodman, J. Moore, S. M. Spanos, D. W. Keller III, and R. J. Poppiti, Jr. 1993. Clinical assessment of anaerobic isolates from blood cultures. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 17:19-22.
 37. Silva, C.H.P.M. 1999. *Bacteriologia, um texto ilustrado*. Livraria e Editora Eventos, Rio de Janeiro, RJ.
 38. Solomon, H. M., and D. Jackson. 1992. Rapid diagnosis of *Brucella melitensis* in blood: some operational characteristics of the BACT/ALERT. *J. Clin. Microbiol.* 30:222-224.
 39. Thorpe, T. C., M. L. Wilson, J. E. Turner, J. L. DiGuseppi, M. Willert, S. Mirrett, and L. B. Reller. 1990. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J. Clin. Microbiol.* 28:1608-1612.
 40. Wallis, C., Melnick, J.L., Wende, R.D., Riely, P.E. 1980. Rapid isolation of bacteria from septicemic patients by use of an antimicrobial agent removal device. *J. Clin. Microbiol.* 11:462-464.
 41. Weinberg, E., Shungu, D.L., Gadebusch, H.H. 1984. Effectiveness of the antimicrobial removal device, Bactec 16B medium, and Thiol broth in neutralizing antibacterial activities of imipenem, norfloxacin, and related agents. *J. Clin. Microbiol.* 19:207-209.
 42. Weinstein, M. P., L. B. Reller, J. R. Murphy, and K. A. Lichtenstein. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev. Infect. Dis.* 5:35-53.
 43. Weinstein, M. P., S. Mirrett, L. G. Reimer, M. L. Wilson, S. Smith-Elekes, C. R. Chuard, K. L. Joho, and L. B. Reller. 1995. Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia. *J. Clin. Microbiol.* 33:978-981.
 44. Weinstein, M. P., S. Mirrett, M. L. Wilson, L. G. Reimer, and L. B. Reller. 1994. Controlled evaluation of 5 versus 10 milliliters of blood cultured in aerobic BacT/Alert blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 32:2103-2106.
 45. Welby-Sellenriek, P. L., D. S. Keller, R. J. Ferrett, and G. A. Storch. 1997. Comparison of the BacT/Alert FAN aerobic and the Difco ESP 80A aerobic bottles for pediatric blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 35:1166-1171.
 46. Wilson, M. L., M. P. Weinstein, L. G. Reimer, S. Mirrett, and L. B. Reller. 1992. Controlled comparison of the BacT/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 30:323-329.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Carlos Henrique Pessôa de M. e Silva
Rua Lúcio Bacelar, 16/803 - Praia da Costa
CEP: 29101-030 Vila Velha - ES

Estudo do perfil de hemoglobinas em 9.189 testes realizados no Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas*

The Characteristic of 9,189 Tests of Hemoglobinopathy Diagnostic from the Alvaro Center of Clinical Chemistry and Research in the 2004 year

Cleiton Paulo Aigner^{1,2,3}; Fabiano Sandrini^{1,2}; Edmir Gonçalves Duarte^{1,2}; Mauricio Pacheco Andrade^{1,2}; Marco Antonio Largura^{1,2} & Alvaro Largura^{1,2}

RESUMO - As hemoglobinopatias são um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por alterações que envolvem genes estruturais e promovem a formação de moléculas de hemoglobinas com variações polimórficas características. Essas alterações, denominadas variantes, possuem frequências diversificadas, de acordo com distribuição geográfica e/ou étnica. Avaliou-se o perfil hemoglobínico dos testes realizados no Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas, durante o ano de 2004. Foram analisados 9189 testes, realizados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), provenientes de todas as regiões do Brasil. Das amostras analisadas, 81,02% apresentaram perfil hemoglobínico normal, enquanto foi observada alteração em 18,98%. Destas, os perfis hemoglobínicos identificados foram: Hb AS 9,11%; sugestivo de beta talassemia 5,50%; Hb AC 2,47%; Hb SS 0,76%; Hb SC 0,39%; Hb CC 0,20%; PHHF 0,19%; Hb AD 0,18%; e outras formas raras de hemoglobinas em 0,18%. Observou-se que houve predomínio da prevalência de Hb AS (traço falciforme) entre os testes com perfil hemoglobínico alterado. Ainda, houve uma frequência relativamente elevada de testes sugestivos de beta talassemia.

PALAVRAS-CHAVE - Hemoglobinopatias, perfil de hemoglobina.

SUMMARY - The hemoglobinopathies are a heterogeneous group of haemoglobin disturbs characterized by the structural genes mutations which results in polymorphic haemoglobin molecules. These abnormal hemoglobins are called "hemoglobin variants". Their frequencies vary accordingly to the geographic region and/or ethnic group distribution. Quantification of the various hemoglobin structures was performed in 9189 samples from all over Brazil. The variants hemoglobin frequency and beta-thalassemia were analyzed. The normal hemoglobin structure and its variants were detected by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). We found 7445 (81.02%) samples presenting normal hemoglobin structure, Hb AA; whereas 1744 (18.98%) samples revealed some abnormality. The following characteristics were observed among the abnormal hemoglobins: Hb AS (9.11%); suggestive of beta thalassemia (5.50%); Hb AC (2.47%); Hb SS (0.76%), Hb SC (0.39%); Hb CC (0.20%); Hb AD (0.18%); and some other rare hemoglobins (0.18%). From our study, we were able to identify a major prevalence of sickle cell trait (Hb AS) among the various haemoglobin variants. In addition to that, we were able to identify a higher relative frequency of suggestive of beta-thalassemia tests in this population.

KEYWORDS - hemoglobinopathy, abnormal haemoglobin, haemoglobin variants.

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias correspondem a um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por alterações, qualitativas ou quantitativas, que envolvem a síntese de genes estruturais e promovem a formação de moléculas de hemoglobinas com variações polimórficas características (1). Essas alterações, denominadas de variantes, possuem frequência variada, de acordo com distribuição geográfica e/ou étnica (17,18).

O tema hemoglobinopatias vem sendo muito estudado e está bem caracterizada na população brasileira, principalmente, sua prevalência e distribuição em regiões e grupos étnicos distintos (9). A distribuição das hemoglobinas anormais, que provem de formas variantes e talassemias, tem relação direta com as etnias formadoras da nossa população.

A maioria dos estudos sobre prevalência de hemoglobinas descritos no Brasil tem caráter regional, ao ser avaliado em doadores de banco de sangue ou realizados em triagem neonatal. Poucos são os estudos que envolvem a população proveniente de todas as regiões brasileiras. A avaliação re-

alizada em laboratório clínico pode retratar a frequência das variações de hemoglobina na população brasileira.

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil hemoglobínico dos exames realizados no Álvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas durante o ano de 2004.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma análise retrospectiva dos resultados de exames de perfil de hemoglobinas, realizados no período de janeiro a dezembro de 2004, na Unidade de Eletroforeses do Centro de Análises e Pesquisas Clínicas Álvaro, Cascavel, Paraná. Excluiu-se resultados de pacientes com menos de 6 meses de idade. A pesquisa de alfa talassemia não está presente nesta análise, pois esta é realizada somente com solicitação específica.

As amostras eram provenientes de laboratórios localizados em todos os estados do país. Os exames foram realizados utilizando amostras de sangue, colhidas com anticoagulante (EDTA). Todas as amostras foram avaliadas utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) associada à cromatografia de troca iônica no equipamento Variant II (BIO-RAD, Hercules, CA).

Recebido em 18/08/2005

Aprovado em 28/11/2005

*Trabalho realizado no Álvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas

¹Instituto de Investigação Científica do Paraná

²Álvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas

³Universidade Paranaense

Neste sistema, as hemoglobinas são diferenciadas pelos seus tempos de retenção. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. Tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina (Fig. 1).

As amostras que apresentaram a fração de hemoglobina A2 (Hb A2) elevada foram submetidas ao teste de Resistência Osmótica em solução de Cloreto de Sódio à 0,36% (16). Foram considerados como indicativos de indivíduos beta talassêmicos todos os indivíduos que apresentaram valores de hemoglobina A2 maiores que 3,5% e apresentaram teste de Resistência Osmótica, em solução de Cloreto de Sódio à 0,36% positivo.

RESULTADOS

Foram analisados 9189 resultados de testes realizados durante o ano de 2004 na Unidade de Eletroforeses do Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas. As amostras eram provenientes de todos os estados brasileiros.

Do total analisado, 7445 resultados (81,02%), apresentaram perfil hemoglobínico normal, Hb AA, enquanto que 1744 amostras (18,98%) demonstraram alguma alteração, qualitativa ou quantitativa (Fig. 2).

Entre os resultados alterados, os perfis hemoglobínicos identificados apresentaram grande diversidade genética, ficando assim distribuídos: Hb AS 9,11%, suspeita de beta talassemia 5,50%, Hb AC 2,47%, Hb SS 0,76%, Hb SC 0,39%, Hb CC 0,20%, PHHF (Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal) 0,19%, Hb AD 0,18% e Hemoglobinas raras 0,18%. A tabela 1 apresenta a distribuição dos genótipos encontrados.

A distribuição somente dos resultados que demonstraram alterações nas hemoglobinas está ilustrado na figura 3.

TABELA I
Distribuição das diferentes variantes de hemoglobinas observadas nas 9189 amostras avaliadas.

Genótipo	AA	AS	beta-tal	AC	SS	SC	CC	PHHF	AD	outras
n	7445	838	506	227	70	36	19	18	17	17
%	81,02	9,11	5,50	2,47	0,76	0,39	0,20	0,19	0,18	0,18

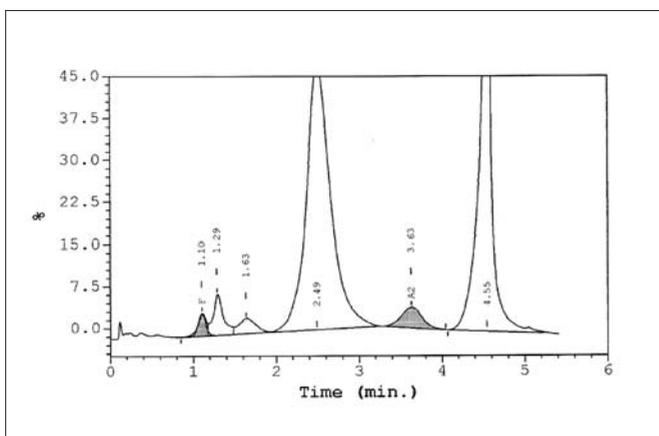


Figura 1 - Cromatograma de análise por HPLC. Os tempos de retenção apresentados sugerem "traço falciforme" (Hb AS).

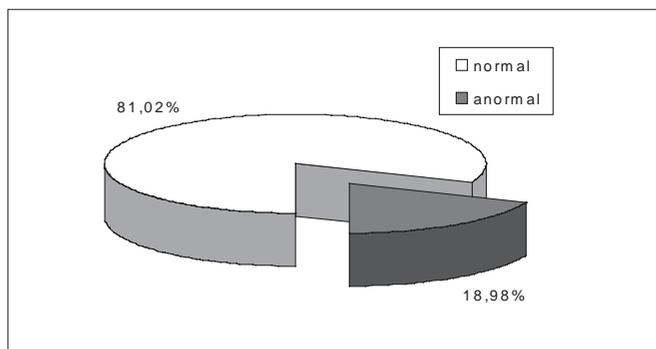


Figura 2 - Distribuição de resultados normais ou anormais das 9.189 amostras avaliadas.

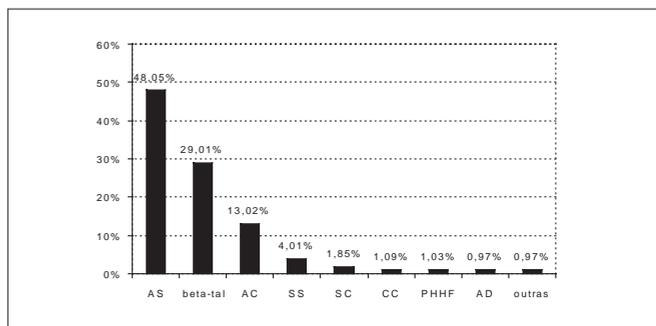


Figura 3 - Figura 3 - Frequência observada das diferentes variantes no grupo que compreende hemoglobinas anormais.

DISCUSSÃO

A distribuição das hemoglobinas anormais varia de acordo com as populações estudadas, tem-se descritas em torno de 750 hemoglobinas variantes e cerca de 300 tipos diferentes de talassemias (6,7). A miscigenação racial característica da população brasileira é um fator preponderante na dispersão de genes anormais característicos das doenças falciformes e talassemias (2).

Por tratar-se de um centro de apoio a laboratórios, o Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas recebe amostras de pacientes que já passaram por uma triagem prévia como também de pacientes com anemias a esclarecer e pacientes de rotina. Esse fato pode auxiliar na justificativa dos resultados encontrados, principalmente o número de hemoglobinas anormais e de sugestivos de beta talassemia, apresentar-se mais elevados que os encontrados em estudos anteriores realizados em diversas regiões do país (1,8,9,14,18).

As hemoglobinas variantes com maior frequência na população brasileira, não se diferenciando de nossa análise, são as hemoglobinas S (Hb S) e C (Hb C), as quais têm origem africana, fato que evidencia a participação intensa do negro africano na formação da população brasileira (15,18). No entanto, a miscigenação ocorrida no Brasil fez com que essas hemoglobinas deixassem de se restringir à população descendente de africanos, sendo encontradas também em outros grupos étnicos (1). A hemoglobina S é tida como a alteração hematológica hereditária mais frequente e conhecida no homem (11). Concordando com o resultado desta análise, a Hb S é a mais frequente hemoglobina variante encontrada; ela pode apresentar-se sobre a forma heterozigota, Hb AS (traço falciforme) ou sobre a forma homozigota Hb SS, forma que torna os indivíduos portadores de anemia falciforme (12).

A beta-talassemia está entre as 03 mais freqüentes hemoglobinopatias encontradas no Brasil (18). Indivíduos beta-talassêmicos podem apresentar anemia leve, que pode intensificar-se em determinadas situações, como na gravidez, situações de estresse e quando associada com outros processos patológicos. A imigração dos povos do mediterrâneo, principalmente italianos, contribuiu na formação da população, principalmente no Sul e Sudeste do Brasil; houve um grande fluxo de imigrantes italianos provenientes de determinadas regiões onde a freqüência de indivíduos beta-talassêmicos encontrada pode ter sido bastante elevada, variando de 0,4% a 20,0% (8). Diferenciando-se de outros estudos, o segundo perfil hemoglobínico em prevalência foi o de beta talassemia, apesar do mesmo não ter sido confirmado por investigações moleculares. Valores normais de Hb A2 unidos a valores limítrofes nos índices hematimétricos, demonstram alguns estudos, não são suficientes para excluir a possibilidade de beta talassemia (8). Muitos estudos tiveram como fonte de dados os bancos de sangue (1,9,13,14), outros foram realizados a partir da triagem neonatal (8,9,14), neste estudo foram utilizados resultados de pacientes provenientes de todas as regiões do país, que já passaram por uma triagem prévia ou pacientes com anemias a esclarecer ou ainda pacientes de rotina. Estas diferenças, nos grupos estudados, bem como as variações técnicas e a heterogeneidade étnica da população brasileira, podem justificar as diferenças obtidas relativas ao número e prevalência de resultados encontrados. Contudo, em nosso estudo e em diversos outros (3,13,18) a Hb S, principalmente em sua forma heterozigota, foi a que teve prevalência.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho nos permitem concluir que houve uma prevalência de Hb S (traço falciforme) entre os testes com perfil hemoglobínico alterado, resultado semelhante a vários trabalhos descritos na literatura. Observamos, também, uma freqüência elevada de suspeita de beta talassemia quando comparado com trabalhos anteriores.

REFERÊNCIAS

1. Bezerra, T.M.; Andrade S.R. Investigação sobre a prevalência de hemoglobinas anormais entre doadores de sangue. *Rev Bras Anal Clin.* 23:117-8. 1991.
2. Bonini-Domingos, C.R. Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil: diversidade genética e metodologia laboratorial. Tese (Doutorado em Ciências Bio-

lógicas) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP. 138 p. São José do Rio Preto, 1993.

3. Ducatti, R.P.; Teixeira, A.E.A.; Galão, H.A.; Bonini-Domingos, C.R.; Fett-Conte, A.C. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 23:23-9. 2001.
4. Fortova, H.; Slavikova, V.; Musil, F.; Suttner, J.; Brabec, V. Diagnosis of beta-thalassemia on the basis of Hb A2 determination. *Vnitr Lek.* 41:302-6. 1995.
5. Gasperini, D.; Cao, A.; Paderi, L.; Barella S, Paglietti E, Perseu L, et al. Normal individuals with high Hb A2 levels. *Br J Haematol.* 84:166-8. 1993.
6. International Hemoglobin Information Center. A Syllabus of Human Hemoglobin Variants. Hemoglobin. 1998
7. International Hemoglobin Information Center. A Syllabus of Thalassemia Mutations. 1997.
8. Lisot, C.L.A.; Silla, L.M.R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. *Cad. Saúde Pública.* vol.20, no.6, p.1595-1601. 2004.
9. Melo, S.M.A.; Arantes, S.C.F.; Botelho Filho, A.; Rocha, A.F.S. Prevalência de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia - MG. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 22 Suppl:51. 2000.
10. Metaxotou-Mavromati, A.; Kattamis, C.; Matathia, L.; Tzetzis, M.; Kanavakis, E. Clinical haematological and genetic studies of type 2 normal Hb A2 beta thalassemia. *J Med Genet.* 25:195-9. 1988.
11. Naoum, P.C. Eletroforese, Técnicas e Diagnósticos. 2.ed. São Paulo: Editora Santos, 1999.
12. Naoum, P.C. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Editora Sarvier, 1997.
13. Orlando, G.M.; Naoum, P.C.; Siqueira, F.A.M.; Bonini-Domingos C.R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 22:111-21. 2000.
14. Prudêncio, B.C.A.B.; Covas, D.T.; Bonini-Domingos, C.R. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 22: 99-109. 2000.
15. Salzano, F.M.; Tondo, C.V. Hemoglobin types in Brazilian populations. *Hemoglobin.* 6:85. 1982.
16. Silvestroni, E.; Bianco, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am. J. Human Genet.* 27: 198. 1975.
17. Tondo, C.V.; Salzano, F.M. Abnormal hemoglobins in a Brazilian negro population. *Am J Human Genet.* 14:401-9. 1962.
18. Zago, M.A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. *Rev Paul Med.* 104:300-4. 1986.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Álvaro Largura
Rua Gal. Osório, 3191 - Centro
CEP. 85801-110 Cascavel - PR
E-mail: alvaro@alvaro.com.br

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus**

Antimicrobial activity ‘in vitro’ of the ethanol extract *Punica granatum* against of *Staphylococcus aureus* strains

Catão, R. M. R.¹; Antunes, R. M. P.¹; Arruda, T. A.¹; Pereira, M. S. V.²; Higino, J. S.³; Alves, J. A.⁴; Passos, M.G.V.M.⁵ & Santos, V. L.¹

RESUMO - A utilização de plantas medicinais com indicação para processos infecciosos, respaldada por pesquisas etnofarmacobotânicas, impulsionam vários estudos farmacológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* (romã) e determinar sua concentração inibitória mínima (CIM) sobre amostras de *Staphylococcus aureus* de origem humana ambulatorial, avaliando-se o perfil de sensibilidade dessas cepas, frente aos antimicrobianos usados rotineiramente na clínica médica, como também, a detecção da produção de alguns fatores de virulência (coagulase, hemolisina e lipase). Determinou-se a CIM pelo método da diluição em placas e o antibiograma por disco-difusão, seguindo-se as recomendações do NCCLS (2002). Todas as cepas de *S.aureus* eram fermentadoras do manitol e hemolíticas, sendo que 10 (58,8%) apresentaram atividade lipolítica no Agar tween-cálcio. Todas as cepas mostraram-se sensíveis à vancomicina, tetraciclina e oxacilina. Enquanto que 11 (64,7%) apresentaram resistência à penicilina e à ampicilina. Observou-se também sensibilidade diminuída à clindamicina e à eritromicina em 10 (58,8%) das cepas. Concluiu-se que a CIM do extrato etanólico de *P.granatum* foi obtida na concentração de 10%, a qual, foi capaz de inibir 100% das cepas analisadas.

PALAVRAS-CHAVE - Atividade antimicrobiana, *S.aureus*, Extrato etanólico, *Punica granatum*, Romã.

SUMMARY - The use of medical plants with the indication to the infectious process, supported by ethnopharmacobotanic researches, impel various pharmacological studies. The purpose of this study was to evaluate the antibacterial ‘in vitro’ of the ethanol extract of *Punica granatum* (pomegranate) and to determine its minimum inhibit concentration (MIC) on strains of *Staphylococcus aureus* of human origin ambulatory evaluating also the sensibility profile of these strains, against the antimicrobial substance usually used in medicine after the verification of some virulence factor such as (coagulation, hemolysis e lipase). It was determined that a MIC by the method of dilution in plates and the antibiogram by disc diffusion, following the NCCLS (2002) recommendation. All the *Staphylococcus aureus* were mannitol and haemolytic producers, 10 (58,8%) presented lipolytic activity in the calcium Tween agar. All of the stains has shown to be sensitive to vancomycin, tetracycline and oxacillin. While 11 (64,7%) has presented resistance to penicillin and ampicillin. It has also been observed that diminished sensibility to clindamicin and to eritromycin in 10 (58,8%) of the samples. Concluding therefore, that a MIC of the ethanol extract of *Punica granatum* was taken in 10% concentration, which was able to inhibit in 100% of the strains analysed.

KEYWORDS - Antimicrobial activity, Ethanol extract, *S.aureus*, *Punica granatum*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um dos mais significantes agentes etiológicos de processos infecciosos adquiridos, tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes hospitalizados; é a espécie mais virulenta dos *Staphylococcus* spp., apresentando uma ampla variedade de fatores que contribuem para essa virulência, como as toxinas e enzimas que mediam a invasão tecidual e a sobrevivência no sítio da infecção (KRUSYNSKA *et al.*, 1997; BLATT & PIAZZA, 2004). As infecções causadas por *S.aureus* apresentam morbidade e mortalidade elevadas (BLATT & PIAZZA, 2004), sendo responsável por 20% das infecções bacterianas humanas (DEITOS *et al.*, 1999).

O surgimento, nos últimos anos de cepas de *S.aureus* multiresistentes, inclusive podendo ser isolados em materiais e equipamentos usados em ambiente hospitalar constituem num dos problemas mais relevantes no controle de infecções e na terapêutica antimicrobiana (ARAÚJO *et al.*, 2000). Dentre outros fatores, a multiresistência em *S. aureus* resulta da presença de plasmídeos, que permite a transferência desta resistência em grande frequência (FREITAS, 2003).

O aumento crescente da frequência de *S.aureus* resistentes

à oxacilina (ORSA), também conhecidos como resistentes à metilina (MRSA), e da possibilidade do aparecimento de linhagens resistentes também a vancomicina, tornam relevantes o desenvolvimento de novas drogas com atividade antiestafilocócicas (SADER, *et al.*, 1993).

Desde tempos remotos o homem busca, através das plantas medicinais, a cura ou o alívio das doenças. O conhecimento passado de geração para geração, no decorrer do tempo, é o responsável pela diversidade da medicina “folk” ou como conhecemos – Medicina Popular. Atualmente, diversos fitoconstituintes já são conhecidos e estudos feitos em modelos experimentais são empregados no sentido de entender suas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*. Dentre estes modelos se encontra o de resistência microbiana (MYIAKE *et al.*, 2004).

Uma das linhas de estudo dentro deste modelo, é a de utilização de plantas medicinais com indicações para processos infecciosos, cujo respaldo se dá por pesquisas etnofarmacobotânicas. No Brasil, é comum o uso de plantas medicinais no tratamento de diversas infecções (SEPTIMIO, 1994). Destacando-se, no vasto contexto etnográfico mundial, a utilização da Romã (fruto da *Punica granatum* L.) para o tratamento de processos infecciosos internos ou externos (LANSKY *et al.*, 2004).

Recebido em 05/11/2005

Aprovado em 14/11/2005

¹*CCBS/DF/UEPB-Campina Grande-PB; ²CCEN/DBM/UFPB-João Pessoa-PB; ³DCF/UFPE-Recife; ⁴UFPB/DZ-Areia-PB; ⁵DM/FF/UFBA – Salvador-BA

A romãzeira se apresenta como um grande arbusto ou árvore pequena, cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Seu fruto, comestível, é de odor agradável. A medicina popular recomenda tanto a casca do caule como o fruto para diversas doenças. A casca do caule é empregada como vermífugo, em especial para tênia. Do fruto, são utilizadas as cascas dessecadas ou frescas para o tratamento de diarreias, infecções de pele e mucosas e as sementes frescas, com seus envoltórios rosados e suculentos, para as afecções da boca e garganta (MATOS, 1989; LANSKY *et al.*, 2004; MYIAKE *et al.*, 2004).

Foi observado em testes para helmintos que extratos aquosos obtidos da casca dos frutos de *P. granatum*, em doses elevadas e repetidas, produzem a remoção de oxiúros. Em ensaios clínicos foi observada a expulsão de tênia em pacientes tratados com o extrato da romã. A presença dos alcalóides peletierina, isopeletierina e metilpeletierina são responsáveis pela atividade tenicida (MATOS, 1989; DINIZ *et al.*, 1997; LANSKY *et al.*, 2004).

O extrato da casca do fruto apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cândida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Nocardia asteroides*. Foram observadas, ainda, atividades contra cocos Gram positivos e leveduras (DINIZ *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2000; HOLETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Toda a planta contém, entre os seus princípios ativos, tanino em grande quantidade (em torno de 22% a 25% de ácido punicotânico). Seus alcalóides possuem propriedades digestiva, espasmolítica, anti-diarreica e anti-helmíntica e a pelietierina possui ação tóxica específica contra a tênia. Os alcalóides pelietierina e isopelietierina estão presentes de 0,3% a 0,9% nas cascas da raiz e do fruto. A casca do fruto também contém tanino e alcalóides, além de substâncias com ação antibiótica. Possui também atividade anti-séptica, antiviral e adstringente. É empregada popularmente no tratamento de dores de garganta, rouquidão, inflamação da boca. Do pericarpo, rico em taninos, foram isoladas granatinas A e B, punicalagina e punicalina, sendo estes os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (DINIZ *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2000; HOLETZ *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Navarro *et al.* (1996), realizaram um trabalho de atividade antimicrobiana "in vitro" de uma série de plantas, a fim de fazer uma triagem de plantas potencialmente ativas contra microrganismos, entre eles, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. O trabalho registrou que a *Punica granatum* possui um efeito antimicrobiano contra todas as linhagens microbianas testadas, em concentrações iguais ou inferiores a 10mg/mL.

Machado *et al.* (2002), avaliando a atividade antimicrobiana da punicalagina (250 µg), pelo método de disco difusão, observou a produção de halos de inibição de crescimento de 20 mm em todas as cepas de *S.aureus* testadas.

Vários são os seus modos de utilização; entretanto, deve-se ressaltar a toxicidade do alcalóide peletierina, devendo-se portanto evitar seu uso em gestantes e em hipoglicêmicos, uma vez que foi detectada ação hipoglicêmica em animais experimentais pela ação do penta-o-galoi-glicose. Deve-se, também, evitar o uso das folhas em pessoas anêmicas, pois apresentaram teste hemolítico positivo. O extrato etanólico da casca do fruto, *in vitro*, mostrou uma DL50 de 280mg/Kg (DINIZ *et al.*, 1997).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum*

(romã), determinar sua concentração inibitória mínima (CIM) sobre amostras de *S. aureus* de origem humana ambulatória, avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos usados rotineiramente frente aos *S. aureus*, na clínica médica e verificar a presença de fatores de virulência nas cepas analisadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extrato Etanólico a 95% de *Punica granatum* Linn. (Romã) O extrato foi obtido a partir da casca do fruto da romã, identificado botanicamente no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal de Pernambuco. O método de extração empregado foi a lixiviação ou percolação em fluxo contínuo, à temperatura ambiente.

Amostras bacterianas

Foram utilizadas 17 amostras de *S.aureus*. Sendo uma amostra ATCC e 16 amostras de origem humana, obtidas de diferentes processos infecciosos, de pacientes ambulatoriais, em Campina Grande-PB, das quais, 4 foram enviadas pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Estas cepas foram identificadas por meio de coloração de Gram, provas de catalase, coagulase e fermentação do manitol. Foram caracterizadas fenotipicamente como sensíveis e resistentes à penicilina.

Determinação da CIM

As soluções de extrato de romã foram preparadas em água destilada esterilizada na proporção de 1:1 e, a partir daí, foram preparadas as diluições subseqüentes.

Os níveis de resistência foram determinados pelo método de diluição em placas usando-se concentrações decrescentes do extrato de romã, que variaram de 10% até 0,01%.

Uma série de 10 placas foi preparada no dia do uso e em cada uma delas verteu-se uma quantidade adequada (20mL) de meio de cultivo (Agar Mueller Hinton – DIFCO), mantido à 50°C, acrescido de 1mL da solução diluída do extrato. Foi preparada uma placa para cada uma das diferentes concentrações. Após solidificação do meio, as placas foram mantidas entreabertas em estufa à 37°C por aproximadamente 30 minutos, para se tornarem devidamente secas.

As amostras em estudo foram cultivadas em caldo nutritivo (Brain Heart Infusion – BBL) e incubadas à 37°C/24h. A partir desse crescimento, foram realizadas diluições a 10⁻² em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e inoculadas em placas com auxílio de uma multialça (17 amostras por placa). Estas placas foram então incubadas à 37°C/24h. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano.

Para controle da viabilidade das amostras, foi utilizada uma placa contendo apenas o meio de cultura (Agar Mueller Hinton - DIFCO) e como controle da atividade dos antimicrobianos foi empregada a linhagem *S. aureus* ATCC 29213.

Determinação do perfil de sensibilidade

Antibiograma (disco-difusão) – Usou-se o método descrito por Kirby-Bauer (1966), seguindo-se às recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS* (2002). A padronização do inóculo foi feita com uma suspensão bacteriana com turvação conforme a escala 0,5 de McFarland e os discos de antimicrobianos (CEFAR) utilizados foram: eritromicina, ampicilina, penicilina, vancomicina, clidamicina, cloranfenicol, tetraciclina e oxacilina.

Determinação dos fatores de virulência: coagulase, hemólise e lipase

Para detecção da produção de lipase foi utilizado o agar tween-cálcio (FREITAS, 2000). O tween-80 é um éster de

ácido oléico, substrato para lipase. Ao redor das colônias com atividade lipolítica, observa-se um halo constituído de cristais de sal de cálcio do ácido graxo liberado por lipólise. Foram utilizadas as linhagens 319U e 233FN, respectivamente, como controles positivo e negativo para produção de lipase em *S. aureus*. Estas cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Genética da UFPA.

As amostras estudadas foram inicialmente semeadas em Blood Agar Base - DIFCO (5% de sangue de carneiro desfibrinado) e incubadas à 37°C/24h. Após o crescimento bacteriano, uma colônia isolada foi repicada com alça em agar tween-cálcio e incubada à 37°C/48h. A leitura foi efetuada considerando-se como positiva as linhagens que apresentaram halo ao redor do crescimento bacteriano.

A verificação da produção de hemólise, foi observada através da reação lítica sobre as hemácias contidas no meio de cultivo (Blood Agar Base - DIFCO), após incubação à 37°C/24-48h.

A detecção da produção da coagulase livre e ligada foi realizada usando-se "pool" de plasma humano citratado, na diluição de 1:4 (SANTOS-FILHO, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de *S. aureus* foram avaliadas frente às diferentes concentrações do extrato etanólico de *P. granatum* (romã), observando-se nesse estudo que todas as 17(100%) cepas apresentaram sensibilidade ao extrato, na concentração de 10%, e que a sensibilidade decaía à medida que aumentava a diluição do extrato. De modo que, o extrato de romã a 5% foi capaz de inibir 16 (94,1%), a 2,5% inibiu 15 (88,2%), a 1,25% inibiu 13 (76,5%) e a 0,62% inibiu 5 (29,4%) das cepas testadas (Tabela 1).

Os tamanhos dos halos de inibição de crescimento bacteriano, variaram bastante sendo o menor igual a 8mm e o maior igual a 30mm. Segundo Diniz *et al.* (1997), num estudo com extrato da casca do fruto (romã), ficou constatada sua ação contra diversos microrganismos, sendo o halo de inibição para *S. aureus* em torno de 16mm.

TABELA I
Concentração Inibitória Mínima do Extrato Etanólico de *Punica granatum* (Romã) frente a cepas de *S. aureus* de origem humana

Amostras	Concentração es das placas (%)											
	Nº cepas	Controle de via bilidade	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,07	0,03	0,01
1	+	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
2	+	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
3	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
4	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
5	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
6	+	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
8	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
9	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
10	+	-	-	±	±	±	±	±	+	+	+	+
11	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
12	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
13	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
14	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
15	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
16	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
17	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
*ATCC	+	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
Nº total e (%) de amostras inibidas	17	16	15	13	5	0	0	0	0	0	0	0
	(100%)	(94,1%)	(88,2%)	(76,5%)	(0,62%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

Legenda: - Ausência de crescimento bacteriano. ± Pouco crescimento bacteriano. + Crescimento confluinte.
*ATCC 29213.

Todas as cepas de *S. aureus* analisadas foram hemolíticas e fermentadoras do manitol (Manitol Salt Agar – BBL). Em relação à lipase, 10 (58,8%) das cepas identificadas apresentaram reação lipolítica no Agar tween-cálcio, estando esses dados em concordância com os relatos de outros autores (PEREIRA, 2000; FREITAS, 2003).

Todas as cepas analisadas foram sensíveis à tetraciclina e

oxacilina; também, não se observou em nenhuma das amostras analisadas, resistência à vancomicina (representante dos glicopeptídeos), estando estes dados de acordo com os citados por Mendes *et al.*, (2003). Entretanto, 11(64,7%) das amostras, apresentaram resistência à penicilina e à ampicilina, 2(11,8%) à clindamicina e à eritromicina (Figura 1).

A ocorrência dos determinantes aos β-lactâmicos (penicilina G e ampicilina) e a outras classes de antimicrobianos foi observada entre as cepas estudadas. Detectou-se apenas 1(5,9%) cepa sensível a todos os antimicrobianos utilizados nesse estudo. Com relação aos macrolídeos representados pela eritromicina, observou-se sensibilidade diminuída em 10(58,8%) das cepas. Esses achados estão em concordância com outras publicações (BLATT & PIAZZA, 2004).

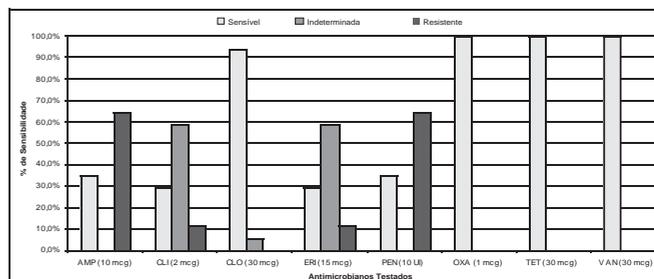


Figura 1: Perfil de Sensibilidade das Cepas de *S. aureus*, Frente a Antimicrobianos

A Tabela 2 mostra a ocorrência de *S. aureus* portadores de multiresistência à várias classes de antimicrobianos, totalizando 11(64,7%) cepas. A maioria 10(58,8%) das cepas isoladas apresentou resistência a 2 antimicrobianos (penicilina e ampicilina), embora, também, se tenha observado a presença de 1(5,8%) cepa com resistência a 4 antimicrobianos (penicilina, ampicilina, clindamicina e eritromicina). Detectou-se 14(88,0%) cepas com sensibilidade diminuída a um ou mais antimicrobianos. Resultados semelhantes a esses também foram relatados por Deitos *et al.* (1999).

TABELA II
Ocorrência de cepas de *S. aureus* multiresistentes

Resistência múltipla (classe dos antimicrobianos)	Nº e % de cepas multiresistentes
PEN-AMP-CLI-ERI	1 (5,8%)
PEN-AMP	10 (58,8%)
Total de cepas com múltipla resistência	11 (64,6%)
Sensibilidade diminuída (classe dos antimicrobianos)	Nº e % de cepas
CLI-ERI	8 (47,0%)
ERI	3 (17,6%)
CLI	3 (17,6%)
CLO	1 (5,8%)
Total de cepas com sensibilidade diminuída	14 (88,0%)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados apresentados, concluiu-se que a resistência à penicilina e ampicilina nas cepas de *S. aureus* analisadas, é significativa e que ocorre também uma resistência a outros grupos de antimicrobianos. É preocupante o elevado número de cepas apresentando múltipla resistência e/ou sensibilidade diminuída aos antimicrobianos. Deve-se avaliar também a sensibilidade aos aminoglicosídeos, uma vez que esses antimicrobianos poderão ser utilizados em associação com β-lactâmicos ou glicopeptídeos como a vanomicina, para o tratamento de infecções graves.

Concluiu-se que o extrato etanólico de *P.granatum* (romã) a 10%, possui atividade antimicrobiana satisfatória contra todas as cepas de *S.aureus* analisadas, o que pode ser uma excelente forma de tratamento alternativo. Entretanto, estudos toxicológicos adequados deverão ser realizados para verificar a possibilidade do seu uso efetivo, no combate a esses microrganismos.

REFERÊNCIAS

- 1 - ARAUJO, B. A. C.; OLIVEIRA, A. L.; SANTOS FILHO, L. Isolamento de amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus* em estetoscópios usados no ambiente hospitalar. *RBAC*, 32(4): 285-288, 2000.
 - 2 - BLATT, J. M.; PIAZZA, C. E. Perfil de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* isolados em pacientes internados. *RBAC*, 36(2): 129-131, 2004.
 - 3 - CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; SPESOTO, M. A.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three miconia species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(4):339-340. 2003.
 - 4 - DEITOS, D.; MAGALHÃES, F.; BOGES, V. T.; GRANJO, C. A. Perfil de sensibilidade de cepas de *S. aureus* isoladas de crianças em creche. *RBAC*, 31(4): 183-185, 1999.
 - 5 - DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MEDEIROS, A. C. D.; MALTA-JUNIOR, A. Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Universitária/UFPB, 1997, p. 148-153.
 - 6 - FREITAS, D.B. Atividade antimicrobiana de fluorquinolonas e ação sobre plasmídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* humanas e bovinas. Dissertação de mestrado - CCEN/UFPB. João Pessoa. 85p, 2003.
 - 7 - HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(7): 1027-1031,2002.
 - 8 - KRUSZNSKA, E.; BIALEK, M.; JANICKA et al., Susceptibility to antibiotics of *Staphylococcus aureus* strains. *Med. Dosw. Microbiol.*,49:141-144, 1997.
 - 9 - LANSKY, E.; SHUBERT, S.; NEEMAN I. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. *Israel: CIHEAM-Options Mediterraneennes*, 231-235, 2004.
 - 10 - MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R.; AMARAL, A. C. F.; SANTOS, K. R. N.; SILVA, M. G.; KUSTER, R. M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits, *J. Braz. Chem. Soc.*,13(5): 606-610, 2002.
 - 11 - MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: IOCE, 1989, 2v, p74-5.
 - 12- MENDES, C.; HSIUNG, A.; DENCER, C.; FELMINGHAM, D.; ROSSI,F; SEGURA, A. J. A.; ZACCOLI, C. M.; SADER, H.; MIMICA, I. Infecções do trato respiratório: Principais agentes bacterianos e padrões de resistência. Dados brasileiros do estudo internacional PROTEKT. Artigo original. 2003.
 - 13 - MIYAKE, M. A.; CANIELLO, M.; BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Inquérito, sobre uso de plantas medicinais para tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital pública terciário. São Paulo: Caderno de Debates da RBORL,70: 43-55, 2004.
 - 14 - National Committee for clinical Laboratory Standards - NCCLS. Performance Standards for antimicrobial susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement M100-S12, vol.22, Nº 1. Wayne, Pennsylvania, 2002
 - 15 - NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *J. Braz. Microb*, 31: 247-256, 2000.
 - 16 - NAVARRO, V.; VILLARREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol*. 53(3): 143-7, 1996,
 - 17 - PEREIRA, M. S. V. Atividade in vitro de fluorquinolonas e ação sobre plasmídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* humanas e bovinas. 2000.135f.Tese (Doutorado em Microbiologia). UFPe.
 - 18 - SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; HOLLINS, R. J.; LEME, I.; JONES, R. N. Oxacilin and quinolone resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infec Control Hosp Epidemiol.*, 14:260-264, 1993.
- SANTOS-FILHO, L. Manual de Microbiologia. 3ªed. João Pessoa: Ed. Universitária.UFPB.2003.314p.
- 19 - SEPTIMIO, L. R. Fitoterapia baseada em ervas medicinais do cerrado.SIPE. Ministério da Agricultura, Brasília, 1994.
 - 20 - VASCONCELOS, L. C. S.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; HIGINO, J. S. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses*, 46: 192-196, 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Raissa Mayer R. Catão
Rua Benedito Mota, 702 - Alto Brava
CEP. 58102-520 - Campina Grande - PB
E-mail: raissacatao@uol.com.br

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Prevalência de Teníase no Município de Pedra Branca Estado do Ceará, Brasil

Prevalence of taeniasis in municipal district Pedra Branca of Ceará State, Brazil

Oliveira, M.F.¹; Sousa, F.C.S.³; Pereira, A.C.G.²; Alencar, A. M.⁴; Bezerra, F.S.M.¹; Martins, D.A.⁴ & Teles, R, M.A.⁴

RESUMO - A teníase é reconhecida como importante problema de saúde pública em regiões onde as condições sanitárias são precárias e em países industrializados que recebem imigrantes de regiões onde a infecção é endêmica. O homem, responsável pela manutenção do ciclo parasitário, é o único hospedeiro da forma adulta dos parasitos *Taenia solium* e *Taenia saginata*. Apesar da importância do porco no ciclo de vida da *Taenia solium*, pouca atenção é dada em relação à infecção suína e humana. Estudo epidemiológico realizado no município de Pedra Branca no período de 1997 a 1998 demonstrou alto índice de carne de porco com cisticercose. O objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência de teníase na população de Pedra Branca a fim de identificar os casos de teníase. Para isso empregou-se o método de Kato modificado por Katz por ser de fácil execução e de nos fornecer preparações quase permanentes. Nesse estudo, foram analisadas 831 amostras, de indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária de 02 a 70 anos, com 54 (6,5%) de positivas. Os resultados mostraram a prevalência de diferentes espécies de helmintos, onde a maior frequência foi de *Ascaris lumbricoides* 19 (2,30%), seguido de ancilostomídeos 12 (1,44%) e em terceiro de *Taenia sp* 10 (1,20%). A prevalência de teníase foi bastante significativa levando-se em consideração que o método utilizado não é específico para o diagnóstico de teníase.

PALAVRAS-CHAVE - teníase, prevalência, *Taenia sp*

SUMMARY - *Taeniasis* are recognized as important public health problem in many developed countries for regions with bad sanitary conditions as well as for industrial countries in the cases of emigration from the regions with endemic infection. Human intestine is responsible for realization of the parasite cycle and is unique accommodation for adult parasite form: *Taenia solium* and *Taenia saginata*. In spite of importance of pigs in the life cycle of *Taenia solium*, it was small attention to relation between human and pig infection. Epidemiological study accomplished in Pedra Branca in the period 1997-1998 demonstrated the high index of cysticercosis contamination of pork. The purpose of the present study was for measuring the prevalence of human taeniasis on the Pedra Branca population. For this it was used the Kato method, modified by Katz in order to be easy in use and to supply the preparations quasi permanent. In this study were analyzed 831 samples of stool of persons of both sexes between 2 and 70 year, with 54 (6.5%) of positives. The results show prevalent of different types of helminths, where *Ascaris lumbricoides* 19 (2.30%) has the biggest index, second was ancilostomídeos 12 (1.44%) and third *Taenia sp* 10 (1.20%). The prevalence of taeniasis was significant considering that the used method was not specific for it diagnostic.

KEYWORDS - *Taeniasis*, prevalence, *Taenia sp*

INTRODUÇÃO

A teníase é encontrada em todas as partes do mundo em que a população tem o hábito de comer carne de porco ou boi, crua ou mal cozida, com cisticercos viáveis. Quando o indivíduo é acometido pela teníase, ele alberga normalmente um único exemplar, por isso essa doença é conhecida vulgarmente como solitária. Os bovinos e os suínos são os únicos hospedeiros intermediários das tênias do homem com significação para sua epidemiologia.^{1,2,5,6,8}

Homens, animais domésticos e solos contaminados por material fecal de portadores de teníases são os principais elementos do ecossistema que assegura a manutenção desta parasitose.^{20,15}

Ainda que o homem não seja um hospedeiro normal das larvas (por não assegurar o futuro de sua evolução), pode ser infectado pelos ovos de *T. solium*, apresentando, em consequência, os quadros clínicos da cisticercose que constituem as formas mais graves do parasitismo humano, devido às localizações preferenciais dos cisticercos no sistema nervoso e no globo ocular. Portanto, a profilaxia da teníase é de fundamental importância na prevenção da cisticercose.^{8,9,10,12,15}

No Brasil, a cisticercose é encontrada com elevada frequência nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás. A prevalência populacional é conhecida pela notificação

compulsória da doença (Fundação Nacional de Saúde-1996)⁴. Em Ribeirão Preto -SP, o coeficiente de prevalência, baseado na notificação compulsória, é de 67 casos para cada 100.000 habitantes (Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto-1998)¹⁹. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o complexo teníase/cisticercose afeta 50.000.000 de indivíduos e 50.000 falecem a cada ano.⁹

Os porcos, por terem hábitos coprófagos, absorvem cargas maciças de parasitas ao ingerir proglotes inteiros, com dezenas de milhares de ovos, expulsos nas fezes do homem. Por isso, é comum no porco, a cisticercose generalizada.^{20,21,14,12}

No Brasil apesar de existir registros de casos, em várias Unidades Federativas, apenas o Estado do Paraná já possui um Programa implantado⁴. A Organização Pan-Americana de Saúde realizou no mês de março/94, na cidade de Curitiba, o *I Encontro do Cone Sul de Teníase e Cisticercose*, onde foi discutido o grave problema e a urgente necessidade de um levantamento de diagnóstico da situação, para dar base a implantação de um Programa de Controle, nos referidos países. No Brasil, o Ministério da Saúde, selecionou para início destes trabalhos 10 Unidades Federativas, dentre as quais se inclui o Ceará.^{19,4} O presente trabalho tem como objetivo determinar a prevalência de teníase na população de Pedra Branca e identificar os principais fatores de risco associado com a transmissão.

Recebido em 04/04/2005

Aprovado em 14/11/2005

¹Professor (a) de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC- fatimaufc@hotmail.com

²Coordenador do Departamento de Vigilância Sanitária e Zoonoses do Município de Pedra Branca (Médico Veterinário).

³Farmacêutico de Habilitação em Análises Clínicas DACT/FFOE/ UFC.

⁴Alunas do curso de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

Espaço geográfico

A cidade de Pedra Branca foi escolhida para realizar este inquérito epidemiológico de teníase baseada em dados anteriores, os quais indicam que a cisticercose suína é prevalente nessa cidade. O município de Pedra Branca localiza-se na mesorregião dos sertões cearenses, a 285 km da capital (Fortaleza), tem uma área de 1.197 km² e segundo dados do IBGE (1997) apresenta uma população estimada em 40.884 habitantes. Pedra Branca divide-se em 4 distritos: a sede do município, Minerolândia, Riachão do Banabuiú e Tróia.

Coleta de Amostras de Fezes

Na primeira visita às casas, os funcionários da Secretaria de Saúde, juntamente com a Fundação Nacional de Saúde (FNS), esclareceram alguns pontos básicos do nosso trabalho e a gravidade da teníase para a comunidade de Pedra Branca. Os recipientes plásticos foram entregues para a coleta das fezes e um questionário do inquérito coproparasitológico.

Exame Coprológico

Para analisar as amostras de fezes, utilizamos o Kite (Kato-Katz) comercializado e gentilmente cedido pela FNS à Secretaria de Saúde do município de Pedra Branca, para realização deste trabalho.^{8,10} As amostras foram processadas pelos os funcionários da FNS e da Secretaria de Saúde de Pedra Branca. As lâminas preparadas foram enviadas ao laboratório de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (DACT/UFC), para serem analisadas. Foram analisadas 831 amostras de fezes de indivíduos de ambos os sexos, com faixa etária compreendida entre 2-70 anos, da comunidade de Pedra Branca durante o período de 12/04 a 01/11/1999.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O complexo teníase/cisticercose é um grave problema de saúde pública em várias regiões da Ásia, África e América Latina, particularmente nos países em desenvolvimento. Nestes, a precariedade das condições sanitárias e o baixo nível sócio-econômico-cultural da população aliam-se na persistência de sua disseminação.^{13,11,20}

O método de Kato-Katz empregado nesse inquérito foi escolhido por ser de fácil execução e de nos fornecer preparações quase permanente que podem ser examinadas até 4 meses depois. No entanto, o mesmo não é específico para o diagnóstico de teníase e nem indicado para identificar protozoários intestinais. Inquéritos epidemiológicos relativos à teníase são difíceis, em vista da inadequação dos exames de fezes, da semelhança dos ovos das duas tênias e das reduzidas manifestações clínicas, quando não há cisticercose.

No presente estudo nós incluímos 2% (831) do total de 40.884 habitantes, de ambos os sexos na faixa etária de 2 a 70 anos, de Pedra Branca. Das 831 amostras analisadas, 54 (6,5%) foram positivas para um ou mais helmintos intestinais. Os resultados mostram que a faixa etária mais parasitada foi de 02 a 15 anos com 26 (8,6%), seguida da faixa etária de 16 a 30 anos 13 (7,3%). Tabelas 1 e 3.

TABELA I

Freqüência total (%) de helmintos nas 831 amostras de fezes analisadas na população de Pedra Branca, segundo a faixa etária.

Faixa etária (anos)	Nº de amostras examinadas	Nº de amostra positivas
02-15	303 (91,40%)	26 (8,60%)
16-30	178 (92,70%)	13 (7,30%)
31-45	152 (96,70%)	05 (3,28%)
46-60	104 (95,20%)	05 (4,80%)
Acima de 61	94 (94,78%)	05 (5,31%)
Total	831 (93,50%)	54 (6,50%)

Os ovos de *Taenia sp.* foram detectados em 10 indivíduos no intervalo de faixa etária de 12 a 30 anos. O helminto de maior prevalência nesse estudo foi o *Ascaris lumbricoides* com 19 (2,30%), seguido de ancilostomídeos 12 (1,44%) e *Trichuris trichiura* 08 (0,96%). O helminto encontrado em menor freqüência foi *Hymenolepis nana* (Tabela 2). A alta prevalência de teníase encontrada na população de Pedra Branca foi atribuída ao hábito da população comer carne de porco no mínimo 2 vezes por semana (crua ou mal cozida), visto que a população vive da criação de porcos e da agricultura. É importante ressaltar que a maioria dos porcos foi criado soltos e a media de porcos /habitante (3:1). Os resultados apresentados na tabela 2 mostram a prevalência das diferentes espécies de helmintos, onde o ovo de *Taenia sp.* aparece em terceiro lugar.

TABELA II

Freqüência (%) de espécies helmintos intestinais nas 54 amostras de fezes positivas da população de Pedra Branca

Espécies de helmintos	Nº de amostras	%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	19	2,30
ancilostomídeos	12	1,44
<i>Trichuris trichiura</i>	08	0,96
<i>Taenia sp.</i>	10	1,20
<i>Hymenolepis nana</i>	05	0,60
Total	54	6,5

Tabela III

Grau de poliparasitismo intestinal de helmintos nas 54 amostras de fezes positivas, segundo a faixa etária.

faixa etária (anos)	Nº de indivíduos parasitados Com 01 helminto	Nº de indivíduos parasitados Com 02 ou mais helmintos
02-15	16	10
16-30	10	03
31-45	03	02
46-60	03	02
Acima de 61	03	02
Total	35	19

No ano 1998, O Setor de Vigilância Sanitária e Zoonose do município de Pedra Branca realizou inspeção em 26 frigoríficos e 2 matadouros, onde foram abatidos 1.015 suínos. Destes 36 (3,5%) apresentavam cisticercose e os meses de maior prevalência foram janeiro e fevereiro. As estatísticas dos matadouros, quando se conhece a procedência dos animais, fornecem importantes indicações sanitárias, que permitem identificar áreas de maiores ou menores endemicidade da doença (dados apresentados por nós no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas).

No passado, por falta de medicamentos adequados, os planos de controle das teníases e da cisticercose foram baseados essencialmente na prevenção da contaminação do solo e na inspeção da carne nos matadouros. As novas técnicas de criação de animais, sobretudo para os porcos, tiveram grande impacto sobre a prevenção da transmissão. Desta forma, foram obtidos grandes êxitos na Europa Ocidental e nos EUA, reduzindo-se drasticamente a prevalência da teníase. Na URSS, o tratamento em massa com as novas drogas disponíveis reduziu a taxa de infecção dos porcos de 0,16%, em 1960, para 0,005% em 1975.^{8,9,10}

Um inquérito epidemiológico realizado na comunidade de Honduras, de 328 amostras de fezes analisadas, mostrou uma prevalência de 3 (0,91%) para *Taenia sp.*¹¹ Enquanto que no México a prevalência de teníase foi de 5 (0,60%) de um total de 828 amostras de fezes.¹³ A prevalência de teníase na comunidade de Pedra Branca foi superior (1,20%) às encontradas em Honduras e México. Considerando que o método utilizado não é específico para o diagnóstico da *Taenia sp* acredita-se que a prevalência seja bem maior.

No Brasil, 937 casos de óbitos por cisticercose foram relatados no período de 1980 a 1989.⁴ Em Ribeirão Preto –SP, a prevalência de cisticercose baseada na notificação compulsória, no período de 1992 a 1995, foi de 54 casos /100.000 habitantes.²¹ Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil o número de casos de cisticercose diagnosticados vem crescendo. Entretanto, no Norte e Nordeste a prevalência do complexo teníase/cisticercose é baixa, podendo ser explicado pela falta de notificação.⁴ No Brasil, apesar de existir registros de casos em várias Unidades Federativas, apenas o Estado do Paraná já possui um Programa implantado.¹ A Organização Pan-Americana de Saúde realizou no mês de março/94, na cidade de Curitiba, o *I Encontro do Cone Sul de Teníase e Cisticercose*, onde foi discutido o grave problema e a urgente necessidade de um levantamento de diagnóstico da situação, para dar base a implantação de um Programa de Controle, nos referidos países. No Brasil, o Ministério da Saúde selecionou para início destes trabalhos 10 Unidades Federativas, dentre as quais se incluí o Ceará.^{4,9}

O principal fator de risco associado com à transmissão da teníase no município de Pedra Branca é a falta de uma educação sanitária: Apesar da maioria das casas terem latrina, algumas pessoas ainda defecam no meio ambiente em torno das casas. Um outro fator é o grande número de porcos criados soltos na cidade e o hábito da população comer carne de porco, pelo menos 2 vezes na semana. No final desse estudo, todos os casos de helmintíase diagnosticados foram enviados à secretaria de saúde de Pedra Branca para serem tratados, ressaltando os casos de teníase. No momento da visita às casas, a população foi informada como se prevenir do complexo teníase/cisticercose humana, além de deixar bem claro que não é necessário deixar de comer carne de porco, o que não pode é comer carne crua ou mal assada/cozida. Essa notificação permite o mapeamento das residências dos pacientes para melhor direcionar as medidas de prevenção. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a região é endêmica para teníase e provavelmente para cisticercose. Esse trabalho contribuiu para o melhor conhecimento da infecção nessa região, alertando para o controle e medidas de prevenção que podem ser tomadas em nível de assistência primário a saúde nos serviços públicos.

CONCLUSÕES

Diante do elevado índice de teníase encontrado no município de Pedra Branca concluímos:

1) A população de Pedra Branca desconhece a forma de adquirir a teníase.

2) Desconhece que o homem com teníase é o responsável pelo surgimento dos casos neurocisticercose, doença de repercussão grave.

3) A população necessita de receber informações na forma de palestras educativas nas escolas, na rádio local ou mesmo nas igrejas no sentido de conhecer as medidas preventivas para minimizar esse problema.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Nacional de Saúde/FNS por ter nos cedido o Kit (Kato-Katz) para realização deste trabalho e à Secretaria de Saúde do município de Pedra Branca pela valiosa contribuição na coleta das amostras.

REFERÊNCIAS

- 1) Camargo, N.J. Epidemiological status of the taeniasis/cysticercosis in the state of Paraná (south region of Brazil) and the control strategies. In: PAHO/WHO. Taeniasis/cysticercosis complex: future trends toward its control, 1995.
- 2) Cruz, M.; Davis, A.; Dixon, H.; Pawlowski, Z.S & Proano, J. Operational studies on the control of *Taenia solium* taeniasis-cysticercosis in Ecuador. Bull WHO 67:401-407, 1989
- 3) Diaz-Camacho, S. P.; Ruiz, A.C.; Peraza, V.S, Ramos, M.L.Z, Medina, M.F, Lozano, R & Willms, K. Epidemiologic and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. Am J Trop Med Hyg. 45: 522-53, 1991.
- 4) Fundação Nacional de Saúde – Ministério da Saúde – Projeto para o controle do complexo teníase /cisticercose no Brasil. Brasília –DF pg 53, 1996.
- 5) Garcia-Noval, J.; Allan, J.C.; Fletes, C.; Moreno, E.; DeMata, F.; Torres-Alvarez, R.; Soto de Alfaro, H.; Yurrita, P.; Higueros-Morales, H.; Mencos, F.; & Craig, P.S. Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities Am J Trop Med Hyg 55: 282-289, 1996.
- 6) Gonzales, L.E.; Situação atual do complexo teníase-cisticercose nas Américas. Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. v.8, n. 2, p. 223-226, 1984.
- 7) Mazzotti, L. Observaciones en 10 individuos parasitado com *Taenia saginata*: presencia de huevecillos in la region perianal y en otras regiones cutaneas. Revista del Instituto de salubridad y Enfermedades Tropicales , Mexico, 5,207-213, 1944b.
- 8) Neves, David Pereira. Parasitologia Humana. 8ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000
- 9) Pan-American Health Organization – Epidemiologia y control de la teniasis-cisticercose en América Latina Versión 3.0. PAHO, Washington DC. 1994.
- 10) REY, Luis. Bases da Parasitologia Médica. 2ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1991.
- 11) Sánchez, A.L.; Medina, M.T & Ljungstrom, I. Prevalence of taeniasis and cysticercosis in a population of urban residence in Honduras. Acta Tropica, 69:141-149, 1998
- 12) Sánchez, A.L.; Lindback, J.; Schantz, P.M.; Cruz, I.; Sone, M.; Sakai, H.; Medina, M.T & Ljungstrom, I. A population-based, case-control study of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. Ann. Trop. Med. Parasitol 93: 247-258, 1999.
- 13) Sarti, E.; Schantz, P.M.; plancarte, A.; Wilson, M.; Guitierrez, I.O.; Aguilera, J.; Roberts, J & Flisser, A.. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene . 88:49-52,1994.
- 14) Sarti-Gutierrez, E.; Schantz, P.M.; Aguilera, J. & Lopez, A.S. Epidemiologic study of porcine cysticercosis in a rural community of Michoacan state, Mexico. Veterinary Parasitology, 41,195-201,1992a.
- 15) Sarti, E.; Schantz, P.M.; plancarte, A.; Wilson, M.; Guitierrez, I.O.; Lopez, A.S.; Roberts, J & Flisser, A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, México. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 46,677-684,1992b.
- 16) Sarti-Gutierrez, E. Schantz, P.M., Lara-Aguilera, R., Gomez-Dandoy, H. & Flisser, A. *Taenia solium* taeniasis y cysticercosis in a Mexican village. Tropical Medicine and Parasitology, 39,194-198, 1988.
- 17) Schantz, P.M & Sarti, E. Diagnostic methods and epidemiological surveillance of *Taenia solium* infection. Acta Leidensia, 57,153-163 1989.
- 18) Sciutto, E.; Fragoso, G.; Fleury, A. et al – *Taenia solium* disease in humans and pigs: na ancient parasitosis disease reloaded in developing countries and emerging as a major healthproblem of global dimensions. Microbes Infect 2: 1875-1890 2000
- 19) Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto. Informativo epidemiológico de Ribeirão Preto. Ano II, nº 2, fevereiro de 1998.
- 20) Silva-Vergara, M.L.; Prata, A.; Silveira Netto, H.V. et al – Risk factors associated with taeniasis- cysticercosis in Lagamar, Minas Gerais State, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 31: 65-71, 1998.
- 21) Takayanagui, O.M. Aspectos Clínicos da neurocisticercose: análise de 500 casos . Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 1980.
- 22) Tsang, V.C.W & Wilson, M. *Taenia solium*: na under recognized but serious public health problem. Parasitol Today 11: 124-127,1995.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dra. Maria de Fátima Oliveira
Av. Bezerra de Menezes, 2500/204, Bloco 1 - São Geraldo
CEP. 60325-002 Fortaleza - CE

O uso do corante urucum (*Bixa orellana* L.) na técnica de coloração histológica*

The use of stain urucum (*Bixa orellana* L.) in the techniques histological staining

Dayana Cardozo Rohde¹, Sergio Oliveira Silveira² & Vera Regina Andrade Vargas³

RESUMO - A técnica de coloração histológica é uma etapa importante na confecção de lâminas para a visualização em microscópio óptico. Entretanto, a maioria dos corantes histológicos é sintética. O uso desses encarece o processo de coloração, pois são produtos importados, com altos custos. No presente estudo, uma nova associação de corantes, naturais, foi empregada. A principal inovação desta técnica é o uso da bixina, pigmento encontrado na planta *Bixa orellana* L. (urucum), como corante histológico, dissolvido em álcool etílico 96°C. O uso desta solução alcoólica a base de urucum demonstrou ótima fixação nos tecidos, permitindo a visualização das estruturas celulares. Além disso, a substituição de corantes importados por corantes nacionais constitui uma alternativa para este processo em laboratório.

PALAVRAS-CHAVE - bixina; histologia; inovação; coloração.

SUMMARY - The techniques histological staining is an important stage in the confection of glass slides for the visualization in light microscope. However, the major is synthetic histological stain. This use are expensive the staining process, because is imported products, with high costs. In the present study, was used a new association of natural stain. The main innovation of this technique is the use of the bixina, pigment found in the plant *Bixa orellana* L. (urucum), as histological stain, dissolved in ethylic alcohol 96°C. The use of this alcoholic solution of urucum demonstrated to excellent fixed in tissue, allowing the visualization of the cellular structures. Moreover, the substitution of stains imported for national stains constitutes an alternative for this process in laboratory.

KEYWORDS - bixina; histological staining; innovation.

INTRODUÇÃO

As colorações biológicas são utilizadas, em microscopia óptica, para aumentar o contraste visual entre os elementos dos tecidos. Esse procedimento consiste em uma etapa indispensável no processo de confecção de lâminas histológicas. O processo consiste em corar as diversas estruturas dos cortes histológicos, previamente incolores, com diferentes cores. As técnicas de colorações histológicas já eram utilizadas desde o início do século XVIII, neste caso, empregando o corante Açafrão. Porém, foi só a partir do século XIX que a coloração de células passou a ser mais empregada. Atualmente, foram desenvolvidos diferentes corantes para os diferentes componentes das células e dos tecidos. (GARTNER & HIATT, 1999; GENESER, 2003; SALAS *et al.*, 2004).

Os corantes podem ser agrupados em três classes: corantes que coram os componentes ácidos e básicos da célula; corantes especializados e os sais metálicos. Na coloração histológica, os corantes mais utilizados são a hematoxilina (corante básico) e a eosina (corante ácido), onde o corante básico reage com os componentes ácidos do núcleo e o corante ácido reage com os componentes básicos citoplasmático, corando-os (ROSS & ROMRELL, 1993; GARTNER & HIATT, 1999; GENESER, 2003).

Atualmente, os corantes utilizados, com exceção da hematoxilina e do carmim, são sintéticos. O uso desses encarece o processo de coloração, pois são produtos importados, com altos custos. A substituição de corantes importados por corantes nacionais constitui uma alternativa para a viabilização desse processo em laboratório.

O Brasil apresenta uma diversidade em espécies vegetais que poderiam ser fonte para a extração de corantes. Exem-

plo disso é o urucum já conhecido e utilizado pelos índios brasileiros, quando da época do descobrimento. Os índios brasileiros fazem uso, ainda hoje, da tintura vermelha extraída do urucum para pinturas do corpo. Essa semente é rica em bixina, principal corante, que dá a coloração vermelho-alaranjada. Este pigmento já vem sendo amplamente utilizado como corante em diversos setores industriais, tais como: alimentícia, para uniformizar ou dar cor aos alimentos originalmente incolores; farmacêutica; têxtil e cosmética (NOGUEIRA-CARVALHO, 1999; MERCADANTE & PFANDER, 2001; TOCCHINI & MERCADANTE, 2001; FILGUEIRAS & PEIXOTO, 2002; TOLEDO *et al.*, 2004).

O urucum é um corante vermelho-alaranjado obtido da *Bixa orellana* L. (Bixaceae), uma árvore nativa das florestas tropicais da América do Sul, América Central e Ásia. A *Bixa orellana* L. é conhecida por diversos nomes como achiote, terra orellana, bixa orellana e annatto. No Brasil, o annatto é conhecido como urucum ou urucu, palavra de origem da língua Tupi-Guarani. Essa planta pode atingir de 3 a 6 metros de altura, dependendo das condições ecológicas e da sua idade. Seus frutos são ovóides, tipo cápsula, dependendo da variedade, e apresentam um denso revestimento de espinhos moles e inofensivos de até 0,5 cm de comprimento. As cápsulas são chamadas de "cachopas", variando de 360 a 4.900 por planta, comportam em seu interior uma média de 54 sementes, envoltas por uns arilos vermelhos que lhes dá a cor característica (NOGUEIRA-CARVALHO, 1999; DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2004).

O corante do urucum é extraído a partir da polpa da semente da *Bixa orellana* L. (Bixaceae), constituída de fina camada resinosa, possui coloração vermelho-alaranjado e corresponde, aproximadamente, a 4% do grão integral. Esse corante apresenta-se convencionalmente de duas for-

Recebido em 10/02/2005

Aprovado em 14/11/2005

*URI – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Santo Ângelo, Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, CEP: 98802-470 e UFSM – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Fonte financiadora: PIIC-URI.

¹Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da URI – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Santo Ângelo, dayana.rohde@bol.com.br

²Histotécnico do laboratório de Histologia e Embriologia da UFSM – Universidade Federal de Santa Maria, silveira@base.ufsm.br

³Professora do Curso de Farmácia da URI – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Santo Ângelo, vvargas@urisan.tche.br

mas: a bixina lipossolúvel e a norbixina, que é hidrossolúvel. A bixina é o principal corante dessa Bixaceae, pertence à classe dos carotenóides e está presente na semente entre 70 a 80%, sendo o restante um pigmento ainda não caracterizado, de cor amarela, em pequenas quantidades, cujas estruturas estão relacionadas com a bixina, incluindo a norbixina. O principal aspecto tecnológico do urucum é a capacidade deste corante se aderir às proteínas (LIMA *et al.*, 2001; De-OLIVEIRA, 2003; TOLEDO *et al.*, 2004).

Os carotenóides bixina e norbixina apresentam duas configurações estereoquímicas, isto é, *cis* e *trans*. Nos extratos em condições normais predomina a *cis*-bixina ou *cis*-norbixina mais instáveis. A *cis*-bixina ou *cis*-norbixina em solução sob aquecimento é parcialmente transformada para a configuração *trans*, mais estável, conhecida como isobixina e isonorbixina. Os carotenóides são, na sua maioria, tetraterpenos (com 40 carbonos), formados por oito unidades de isopreno (C₅H₈). Uma vez que estas unidades são ligadas "cabeça-cauda" com exceção da posição central em que a ligação é do tipo "cauda-cauda", a estrutura é simétrica, com reversão do plano de simetria no centro da molécula. Sua característica cromófora é dada pela presença de uma série de duplas ligações conjugadas. Para atuar como precursor de vitamina A, um carotenóide deve ser dotado de um grupo B-ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica de pelo menos 11 carbonos, não presente, portanto, na estrutura química da bixina. Além disso, é possível obterem-se com o uso de emulsificantes formulações solúveis tanto em água como em óleo (De-OLIVEIRA *et al.*, 2003). Na busca de novas opções para colorações histológicas, o presente projeto pretende utilizar corantes nativos, visando obter um resultado igualmente satisfatório aos corantes convencionais ou importados e, ainda, valorizar a matéria-prima de nosso país além de reduzir os custos dessas colorações no laboratório de microtécnica. O objetivo desse estudo foi desenvolver uma nova associação de colorantes histológicos com o pigmento encontrado na planta *Bixa orellana* L. (Urucum).

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra, para o corante histológico, foi constituída de pó de essência de *Bixa Orellana* L., adquiridas no comércio local de Santo Ângelo, Rio Grande do Sul. As amostras histológicas, que foram empregadas para os testes de coloração, foram obtidas de peças de necropsia de camundongos. Foram avaliadas as amostras histológicas das fibras musculares esqueléticas, de glândulas serosas e mucosas, de tecido nervoso e de alguns tecidos epiteliais corados com solução de hematoxilina, para corar o núcleo e após, com solução alcoólica de urucum para corar o citoplasma. A coloração histológica foi realizada com a Hematoxilina, para corar o núcleo, e uma solução preparada com 5g de Urucum em pó, dissolvidos em 100ml de álcool etílico que posteriormente foi filtrada, para coloração do citoplasma. Após o preparo dos corantes foi necessário distender os cortes em água, à temperatura ambiente, e secar os mesmos em uma estufa. Após esse procedimento, os cortes histológicos foram imersos em xilol por 5 minutos; álcool 70%, álcool 60% e álcool 40%, 1 minuto cada; água destilada por 1 minuto; Hematoxilina por 2 minutos; água corrente por 5 minutos; solução alcoólica de Urucum por 15 minutos;

água corrente por 1 minuto. Terminado o processo de coloração, foram colocadas lamínulas sobre as lâminas com preparações histológicas coradas, com uma substância adesiva (Entelan), e observadas ao microscópio óptico. Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da URI (COBE/URI), protocolo número 025-4/PIA/04.

RESULTADOS

PREPARO DO CORANTE

Foi preparada uma solução com 5g de pó de urucum solubilizado em 100 ml de álcool etílico 96°C que, posteriormente, foi filtrada em papel filtro. Após, foram utilizados 10 g de pó de urucum em 100 ml de álcool etílico 96°, também filtrados em papel filtro, para o preparo da solução. Em seguida, substituímos o álcool etílico 96° por água destilada, e misturamos com 10g de urucum.

TESTES DE COLORAÇÃO

Com diferentes quantidades de urucum, solventes, tempo e temperatura

Na tabela I estão apresentados os testes de coloração que foram realizados com diferentes quantidades de urucum, solventes, tempo e temperatura. Foram realizados os testes com a solução alcoólica preparada com 5g de urucum em pó durante 10 minutos e 20 minutos, em temperatura ambiente, sendo que nenhuma delas mostrou uma definição clara das estruturas celulares e histológicas. Foram realizados testes de coloração com a solução alcoólica de 10g de urucum durante 10 minutos e 20 minutos, em temperatura ambiente. A coloração que melhor evidenciou as estruturas celulares foi aquela em que foi utilizado o tempo de 20 minutos. Após, foram realizados testes, com a mesma concentração de corante, porém em estufa a 60° Celsius, durante o tempo de 10 e 20 minutos, mostrando uma diferença visual com as colorações realizadas em temperatura ambiente (Fig. 1). Os mesmos testes foram realizados com solução aquosa de urucum.

Com diferentes soluções de lavagens

Após a coloração com a hematoxilina e o urucum, as lâminas foram lavadas com ácido acético, álcool e água. As lâminas lavadas com ácido acético apresentaram o melhor resultado.

TABELA I

Testes de coloração com diferentes quantidades de urucum, solventes, tempo e temperatura.

	Solução alcoólica de urucum		Solução aquosa de urucum	
	5 gr	10 gr	5 gr	10 gr
Temperatura ambiente 10 min	+	++	-	-
Temperatura ambiente 20 min	++	+++	-	-
Temperatura 60°C (estufa) 10 min	+	++	-	-
Temperatura 60°C (estufa) 20 min	++	++++	-	-

Legenda:

- = fixação insuficiente.

+= fixação fraca, não permite a visualização das estruturas celulares.

++ = fixação regular, permite pouca visualização das estruturas celulares.

+++ = fixação boa, permite a visualização das estruturas celulares.

++++ = fixação ótima, permite a nítida visualização das estruturas celulares.

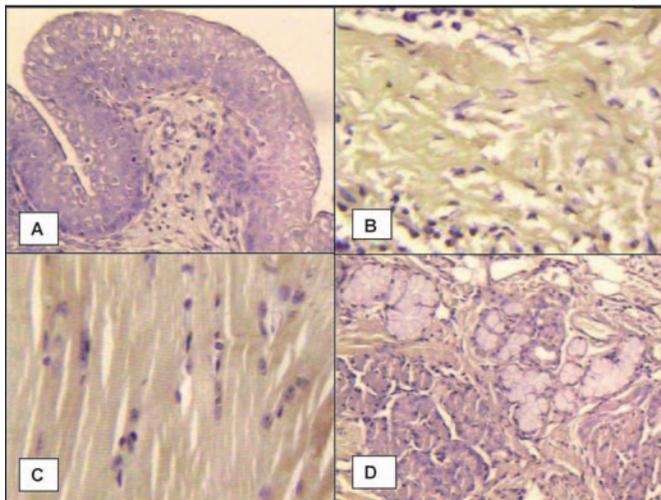


Figura 1: Fotomicrografias de cortes histológicos, em A - tecido epitelial de transição, corado com Hematoxilina e Urucum (HU), tempo de 20 minutos, estufa a 60° C, lavado com álcool; B - tecido conjuntivo, corado com HU, tempo de 20 minutos, estufa a 60° C, lavado com ácido acético; C - tecido muscular estriado esquelético, corado com HU, tempo de 20 minutos, estufa a 60° C, lavado com ácido acético e em D - Glândulas serosas e mucosas, corado com HU, tempo de 20 minutos, estufa a 60° C, lavado com ácido acético.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato do uso do pigmento bixina (urucum) em colorações histológicas.

A bixina é um corante natural extraído da planta *Bixa orellana* L. (urucum), facilmente encontrada na flora de nosso país. A associação desta com a hematoxilina representa uma nova técnica de coloração histológica que demonstra resultados igualmente satisfatórios aos das técnicas convencionais. Esta similaridade é devida à característica de corante ácido da bixina, que reage com os componentes básicos citoplasmáticos, corando-os, permitindo assim a substituição da eosina por aquele pigmento. A coloração de fibras musculares estriadas, com a técnica hematoxilina-urucum (HU), apresentou ótima definição das estrias assim como JUNQUEIRA E CARNEIRO utilizando a técnica hematoxilina-eosina (HE). Esta mesma semelhança foi percebida na diferenciação de ácinos serosos e mucosos. No tecido conjuntivo, a técnica HU demonstrou grande afinidade com as fibras desse tecido, os componentes básicos,

evidenciando assim os núcleos dos fibroblastos. Desta forma, essa associação vem como uma alternativa frente à substituição dos corantes importados por corantes nativos, pois é um corante natural de fácil utilização e não apresenta toxicidade, oferecendo maior segurança aos profissionais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PIIC/ URI pela bolsa de Iniciação científica ao primeiro autor; às instituições envolvidas: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI - campus de Santo Ângelo) e a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. De-OLIVEIRA, A.C.A.X.; SILVA, I.B.; MANHÃES-ROCHA, D.A.; PAUMGARTEN, F.J.R. Induction of liver monooxygenases by anatto and bixin in females rats. *Braz. J. Med. Biol. Res*; 113-118; 2003.
2. FILGUEIRAS, T.S. PEIXOTO, A.L. Flora e vegetação do Brasil na carta de Caminha. *Acta Bot. Brás*; 16:263-272, 2002.
3. GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia em cores. 1ª edição. Rio de Janeiro, RJ. Editora: GUANABARA KOOGAN S.A. 1999.
4. GENESER, R.J. Histologia. 3ª edição. Rio de Janeiro, RJ. Editora: GUANABARA KOOGAN S.A. 2003.
5. LIMA, L.R.P., OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C., TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, norbixina, quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Braz. J. Vet. Anim. Sci*; 38:196-200, 2001.
6. MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. *Ciênc. Tenol. Aliment*; 21:193-196, 2001.
7. NOGUEIRA-CARVALHO, P.R. Urucum - avanços tecnológicos e perspectivas. *Arch. Latino Am. Nutri*; 49:71S-73S, 1999.
8. ROSS, M.H., ROMRELL, L.J. Histologia texto e Atlas. 2ª ed. São Paulo, SP Editora Médica-Panamericana, 1993.
9. SALAS, V. W., et al. Utilidad de técnicas histológicas para el diagnóstico de infección en piezas anatómicas. *Rev. Cubana Med. Milit*; 33(2), 2004.
10. TOCCHINI, L; MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. *Ciênc. Tenol. Aliment*; 21:310-313, 2001.
11. TOLEDO, T. O., et al. Propriedades biológicas de los tintes naturales. *Ars Pharmaceutica*; 45:1, 5-20, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Vera Regina Andrade Vargas
Rua Barão de Santo Ângelo, 1305
CEP: 98801-740 - Santo Ângelo, RS
E-mail: vvargas@urisan.tche.br

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Perfil de Resistência de *Acinetobacter baumannii* a Antimicrobianos nas Unidades de Terapia Intensiva e Semi-Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza*

Profile of resistance of *Acinetobacter baumannii* to antimicrobial in the Semi-Intensive and Intensive Care Units of the General Hospital of Fortaleza.

Vânia Maria Oliveira de Pontes¹; Everardo Albuquerque Menezes¹; Francisco Afrânio Cunha¹; Maria Rozellê Ferreira Ângelo²; Maria Núbia Cavalcante Salviano² & Inácio Régis Nascimento Oliveira²

RESUMO - As infecções hospitalares são as mais freqüentes complicações do tratamento médico nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e Semi - Intensiva (SI). As bactérias do gênero *Acinetobacter*, especialmente *Acinetobacter baumannii*, vêm ganhando importância nos últimos anos devido à maior participação em infecções graves e à selecionada resistência aos antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi verificar o perfil de resistência das cepas de *Acinetobacter baumannii*, isoladas de amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Geral de Fortaleza (HGF). As bactérias foram isoladas em meios de cultura apropriados. A identificação e o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados através do aparelho de automação MicroScan®. 62 (14%) das 437 amostras positivas provenientes das UTIs e SI, no período de janeiro a julho de 2004, foram positivas para *A. baumannii*. As topografias com maior número de isolados foram aspirado traqueal (49%) e sangue (29%). Em relação ao perfil de resistência foi observado que as cepas de *A. baumannii* isoladas de cateter foram resistentes a quase todos os antimicrobianos, com exceção das quinolonas e imipenem (UTI-1). Conclui-se que existem cepas de *A. baumannii* multirresistentes aos antimicrobianos, inclusive ao imipenem, e que o aspirado traqueal foi o mais prevalente sítio de infecção por este patógeno.

PALAVRAS-CHAVE - *Acinetobacter baumannii*, Antimicrobianos, Resistência

SUMMARY - The nosocomial infections are the most frequent complications of the medical handling in the Intensive Care Units (ICU) and Semi - Intensive Care Unit (SI). Bacteria of the genus *Acinetobacter*, specially *Acinetobacter baumannii*, have become important in the last years due to a great participation in grave infections and to the selected resistance to the antimicrobial. The objective of this study was to verify the profile of resistance of the strains of *Acinetobacter baumannii*, isolated from clinical samples of patients interned in the General Hospital of Fortaleza (HGF). The bacteria were isolated in appropriate culture. The identification and test of sensitivity to the antimicrobial were made in the system MicroScan® automation. 62 (14%) of the 437 positive samples originating from the ICU and SI, in the period of January to July of 2004, were positive for *A. baumannii*. The topography with bigger number of isolated was tracheal aspirate (49%) and blood (29%). Regarding the profile of resistance, it was observed that the strains of *A. baumannii* isolated from cateter were resistant to barely all of the antimicrobials, with exception of the quinolonas and imipenem. We concluded that there are strains of *A. baumannii* multiresistant to the antimicrobials, including imipenem, and that the tracheal aspirate was the most prevalent site of infection by this pathogen.

KEYWORDS - *Acinetobacter baumannii*, antimicrobials, resistant

INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares podem ser definidas como aquelas adquiridas após a admissão do paciente e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando puderem ser relacionadas com a internação ou procedimentos hospitalares².

A unidade de terapia intensiva (UTI) concentra os pacientes clínicos ou cirúrgicos mais graves da clientela hospitalar. Quase todos apresentam doenças ou condições clínicas predisponentes à infecções, muitos já se encontram infectados ao serem admitidos na UTI e, quase todos, são submetidos a procedimentos invasivos ou imunossupressivos, com finalidade diagnóstica e terapêutica, alguns deles, realizados em condições de emergência, violando os tradicionais princípios de assepsia e antisepsia¹⁹.

As infecções mais comumente adquiridas em UTIs incluem infecção da corrente sanguínea, pneumonia e infecção do trato urinário. As taxas de mortalidade em UTIs chegam aproximadamente a 40% e as infecções hospitalares contribuem decisivamente para esta taxa⁷. Mais de 20% dos pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva euro-

péias (UTIs) desenvolvem uma infecção adquirida na UTI⁵. Vosylus *et al.*¹⁷, em 2003, observaram que a taxa de mortalidade de pacientes que desenvolveram infecções adquiridas na UTI foi significativamente mais alta em comparação com aqueles que não adquiriram estas infecções.

Acinetobacter baumannii é a espécie mais comum do gênero isolado de amostras clínicas e de ambiente hospitalar. No passado foi considerado de baixa virulência mas, agora, é reconhecido como um importante patógeno hospitalar, mais freqüentemente afetando pacientes criticamente doentes em unidades de tratamento intensivo (UTIs)¹. *A. baumannii* é capaz de sobreviver por longos períodos em superfícies secas⁸ e esta habilidade para tolerar dissecação, bem como desenvolver resistência a múltiplas drogas, pode contribuir para sua persistência no cenário hospitalar¹². *A. baumannii* é uma bactéria que parece ter uma propensão para desenvolvimento de resistência antimicrobiana extremamente rápida. Práticas em UTIs contribuem para o desenvolvimento da resistência da *A. baumannii* porque o uso de antimicrobianos por paciente e por área de superfície são significativamente mais altas nesta parte do hospital³.

Recebido em 08/03/2005

Aprovado em 28/11/2005

*Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza.

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

²Farmacêutico Bioquímico do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza

Em 1990 as infecções por *A. baumannii* começaram a disseminar rapidamente. Foi o oitavo patógeno mais frequentemente isolado na Espanha, de pacientes admitidos em UTIs, com a prevalência de 3,7%; 2 anos depois ele tinha alcançado o terceiro lugar, com uma prevalência de 8,2%¹⁵. Diante do que foi exposto anteriormente e devido à grande preocupação existente nos dias atuais sobre o desenvolvimento de multirresistência bacteriana, incluindo as bactérias do gênero *Acinetobacter*, surgiu o interesse de se realizar um estudo sobre o perfil de resistência destes microrganismos aos antimicrobianos utilizados no Hospital Geral de Fortaleza.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram pesquisadas 437 culturas, de pacientes internados nas unidades de terapia intensiva e semi-intensiva, do Hospital Geral de Fortaleza, no período de 1º de janeiro a 30 de junho de 2004, no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza. O isolamento das bactérias foi realizado através dos meios de cultura apropriados para cada tipo de amostra. As Bactérias isoladas foram identificadas com base nas provas bioquímicas realizadas pelo aparelho de automação MicroScan®.

Os antimicrobianos utilizados no painel MicroScan® Neg Combo 20 foram amicacina, ampicilina/sulbactam, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, piperacilina, ofloxacina, ticarcilina/ ácido clavulônico e sulfametoxazol/ trimetoprim para bacilos Gram-negativos.

Os antimicrobianos utilizados no painel MicroScan® Neg Combo U 21 foram amicacina, ampicilina/sulbactam, ceftriaxona, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, tetraciclina, piperacilina, levofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e ticarcilina/ ácido clavulônico para bacilos Gram-negativos.

RESULTADOS

No período de janeiro a junho do ano de 2004, foram coletadas 1110 amostras clínicas com suspeitas de infecções hospitalares, provenientes das unidades de terapia intensiva e semi-intensiva. Foram positivas 437 (39%) e o número de cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas destas amostras positivas foi de n = 62 (14%).

Os sítios de infecção analisados foram: aspirado traqueal, cateter, sangue e urina.

A unidade que apresentou mais casos de infecção por *Acinetobacter baumannii* foi a UTI - 1 (42%).

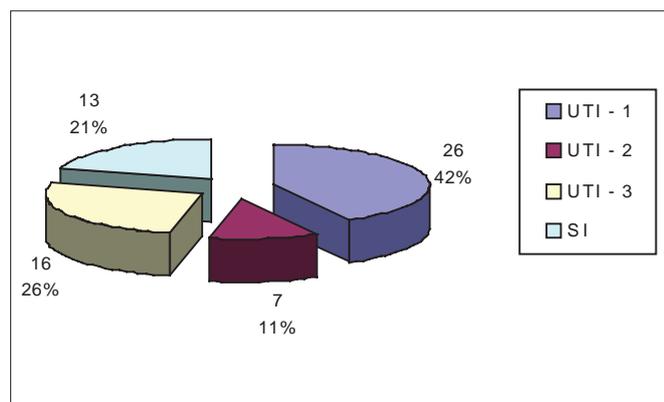


Figura 1: Frequência de *Acinetobacter baumannii* nas amostras clínicas provenientes das UTIs e SI do Hospital Geral de Fortaleza.

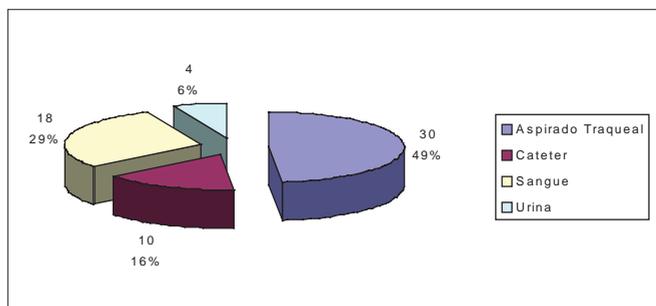


Figura 2: Frequência de *Acinetobacter baumannii* por tipo de amostra clínica analisada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza.

A figura 2 relaciona os tipos de amostras dos sítios de infecção analisadas e a frequência de *Acinetobacter baumannii* isoladas.

Podemos observar que o sítio de infecção de onde foi isolada a maioria das cepas foi aspirado traqueal (49%)

A tabela 1 mostra o perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas nas amostras clínicas da UTI- 1, onde houve o maior número de isolamentos. Foi observado que as cepas de *Acinetobacter baumannii* foram mais resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos e mais sensíveis às quinolonas e Imipenem.

TABELA I

Perfil de resistência (%) de *Acinetobacter baumannii* na UTI - 1 do Hospital Geral de Fortaleza.

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Amostras			
	Aspirado traqueal	Cateter	Hemocultura	Urina
Amicacina	100	100	100	0
Ampicilina/sulbactam	100	100	100	-
Cefepime	100	100	100	-
Cefotaxima	100	100	100	-
Ceftazidima	78	100	100	100
Ceftriaxona	89	100	100	100
Ciprofloxacina	78	50	0	100
Gentamicina	100	100	100	100
Imipenem	89	100	100	-
Ofloxacina	78	50	0	100
Piperacilina	100	100	100	100
Ticarcilina/clavulato	100	100	100	100
Sulfametoxazol/trimetoprim	100	100	100	-
Tetraciclina	-	-	-	0

DISCUSSÃO

A unidade de tratamento intensivo (UTI) concentra os pacientes clínicos e cirúrgicos mais graves da clientela hospitalar. Quase todos apresentam doenças ou condições clínicas predisponentes a infecções¹⁹.

Acinetobacter baumannii é uma bactéria que tem uma propensão para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana extremamente rápida. Ainda mais, a resistência é múltipla, causando sérios problemas terapêuticos. Práticas em UTIs contribuem para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana¹. No Hospital Geral de Fortaleza verificou-se maior prevalência de *Acinetobacter baumannii* na UTI -1 (42%).

Na UTI confluem os fatores de risco para *A. baumannii* como em nenhum outro sítio: a UTI tem maior densidade de pacientes e de profissionais de saúde do hospital, nela se realizam o maior número de procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos por paciente e há a maior utilização de antimicrobianos por metro quadrado da superfície do hospital⁴. O uso de agentes antimicrobianos é considerado ser um fator de predisposição para a emergência de bactérias resistentes¹⁶.

Wu *et al.*¹⁸, 2002 verificaram que o patógeno mais freqüente em infecções pulmonares associadas com a ventilação era *Acinetobacter baumannii* com freqüência de 27%, todos de aspirado traqueal. Neste trabalho encontramos 49%, sendo compatível com os nossos resultados.

As distribuições das infecções nosocomiais por topografia diferem entre as UTIs, na mesma UTI ao longo do tempo e de outras unidades no mesmo hospital⁶. No Hospital Geral de Fortaleza (HGF) verificou-se que a principal topografia de infecções por *Acinetobacter baumannii* nas UTIs e semi-intensiva foi aspirado traqueal com 30 casos (49%), cateter com 10 casos (16%), sangue com 18 casos (29%) e urina com 4 casos (6%).

Martins *et al.*¹¹, em 2004, observaram em seu estudo que houve mudança na ordem de aparecimento das principais infecções hospitalares, com pneumonia sendo a mais freqüente nos períodos estudados, seguida de infecções da corrente sanguínea no primeiro período e infecção do trato urinário no segundo. Em um outro estudo observou-se que as bacteremias representaram 4% das amostras clínicas positivas para *A. baumannii*, muito atrás das amostras respiratórias (40%), mas foram importantes por sua elevada morbimortalidade⁴. No nosso estudo no primeiro semestre do ano de 2004, as infecções respiratórias por *Acinetobacter baumannii* foram as mais freqüentes, seguidas de infecções na corrente sanguínea.

A susceptibilidade do *A. baumannii* a antimicrobianos é consideravelmente diferente entre países, centros e até setores de um hospital. As diferenças de padrões de resistência em amostras enfatizam a importância de investigações locais para determinar a terapia mais adequada, para infecções por *A. baumannii*¹. Neste estudo foram observadas essas diferenças entre as unidades e entre sítios de infecção quanto à susceptibilidade a antimicrobianos.

No Brasil, infelizmente, a resistência à amicacina observada em bacilos Gram-negativos hospitalares vem aumentando em vários centros médicos do país. Considerando que, com progressiva freqüência os bacilos Gram-negativos hospitalares adquiriram resistência aos aminoglicosídeos, a amicacina passou a ser mais utilizada na terapêutica de infecções hospitalares por estes microrganismos e no tratamento de infecções no hospedeiro imunocomprometido. Os elevados níveis de resistência dos bacilos Gram-negativos à amicacina, observados em hospitais brasileiros, possivelmente estão relacionados ao maior uso deste antibiótico¹⁴. Neste estudo, verificou-se que a maioria das cepas de *Acinetobacter baumannii* foi resistente à amicacina, sendo encontradas algumas cepas sensíveis em isolados de hemoculturas.

Marques *et al.*¹⁰, em 1997, observaram que 20% dos isolamentos de *Acinetobacter baumannii* foram resistentes a, pelo menos duas, penicilinas de espectro estendido e dois aminoglicosídeos, mas que o imipenem e um aminoglicosídeo resultaram em sinergia total em 21% dos isolamentos e sinergia parcial em 79% dos isolamentos altamente resistentes. Seifert *et al.*¹³, em 1993, mostraram que *A. baumannii* foi mais sensível à amicacina, ciprofloxacina e imipenem.

Neste estudo, a maioria dos *A. baumannii* foi resistente às penicilinas de espectro estendido e aos aminoglicosídeos, sendo mais sensíveis à ciprofloxacina e imipenem.

Estudos têm demonstrado sinergia ou sinergia parcial com a combinação de antimicrobianos como A/S (ampicilina/sulbactam), T/C (ticarcilina/clavulanato), P/T (piperacilina/tazobactam) e aminoglicosídeos em concentrações plasmáticas terapêuticas, embora um ou ambos agentes fossem inativos quando testado isoladamente *in vitro* para *A. baumannii*¹⁰. Neste estudo, a maioria das cepas de *A. baumannii* foi resistente às combinações ampicilina/sulbactam e Ticarcilina/clavulanato, não tendo sido analisada a combinação piperacilina/tazobactam.

Em um estudo feito por Karsligil *et al.*⁹, em 2004, verificou-se que *Acinetobacter baumannii* foi sensível ao imipenem (90,4%), norfloxacina (84,5%) e ciprofloxacina (65,4%). Neste estudo, verificou-se que os *A. baumannii* isoladas em hemoculturas na UTI e SI foram sensíveis ao imipenem (100% e 33%) e à ciprofloxacina (100% e 33%).

CONCLUSÃO

- O total de *Acinetobacter baumannii* isolada de amostras clínicas de pacientes das unidades de terapia intensiva e semi-intensiva do Hospital Geral de Fortaleza foi de 62, ou seja, 14% das culturas foram positivas.

- O perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* isoladas em hemoculturas mostrou a existência de cepas multirresistentes na UTI-1, com susceptibilidade apenas para ciprofloxacina.

- O perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* isoladas de culturas de aspirado traqueal mostrou a existência de cepas com resistência total aos antimicrobianos, na UTI-2.

- O perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* em culturas de cateteres mostrou a existência de cepas multirresistentes, nas unidades semi-intensiva e UTI-1, com susceptibilidade apenas para ciprofloxacina (50%) e imipenem (50%). Também, mostrou a existência de cepas totalmente resistentes aos antimicrobianos utilizados na UTI-3.

- O perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* em urinoculturas de pacientes das UTIs e semi-intensiva mostrou multirresistência, sendo as cepas susceptíveis apenas aos aminoglicosídeos (100%) e tetraciclina (100%).

REFERÊNCIAS

1. Bergogne – Bérézin, E.; Towner, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. 9 (2): 148-165, 1996.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 2616 de 12/05/98. Diário Oficial da União, 15/05/98.
3. Cisneros, J.M.; Bãno, J.R. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clinical Microbiology & Infection*, 8 (11): 687, 2002.
4. Cisneros, J.M.; Pachón, J. *Acinetobacter baumannii*: nosocomial pathogen difficult to control. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21 (5): 221-223, 2003.
5. Febré, N.; Silva, V.; Medeiros, E.A.S.; Wey, S.B.; Colombo, A.L.; Fischman, O. Microbiological Characteristics of Yeasts Isolated from Urinary Tracts of Intensive Care Unit Patients Undergoing Urinary Catheterization. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(5): 1584-1586, 1999.
6. Fernandes, A.T.; Fernandes, M.O.V.; Filho, NR. Infecção Hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu, 2000.
7. Fridkin, S.K.; Welbel, S.F.; Weinstein, R.A. Magnitude and prevention of nosocomial infections in the intensive care unit.

Infect Dis Clin North Am. 11 (2): 479-96, 1997.

8. Jawad, A.; Seifert, H.; Snelling, A.M.; Heritage, J.; Hawkey, P.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (7): 1938-1941, 1998.
9. Karsligil, T.; Balci, I.; Zer, Y. Antibacterial sensitivity of *Acinetobacter* strains isolated from nosocomial infections. *J. Int. Med. Res.* 32 (4): 436-441, 2004.
10. Marques, M.B.; Brookings, E.S.; Moser, S.A. et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41 (5): 881-885, 1997.
11. Martins, S.T.; Moreira, M.; Furtado, G.H.C. et al. Application of control measures for infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria in intensive care unit patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 99 (3): 331-334, 2004.
12. Roberts, S.A.; Findlay, R.; Lang, S.D.R. Investigation of an outbreak of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burn unit. *J. Hosp. Infect.* 48: 228-32, 2001.
13. Seifert, H.; Baginski, R. et al. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37 (4): 750-753, 1993.
14. Tavares, W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos*. 3ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2001.
15. Vaqué, J.; Rosselló, J.; Trilla, A.; Monge, V.; Garcia-Caballero, J.; Arribas,

J.L. et al. Nosocomial infections in Spain: results of five nationwide serial prevalence surveys (EPINE Project, 1990 to 1994). *Nosocomial Infections Prevalence Study in Spain*. *Infect Control HospEpidemiol.* 17(5):293-7, 1996.

16. Villers, D.; Burel, M.C.; Giauffret, F; et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med.* 129 (3): 182-189, 1998.
17. Vosylus, S.; Sipylatte, J. et al. Intensive care unit acquired infection: a prevalence and impact on morbidity and mortality. *Acta Anesthesiol. Scand.* 47: 1132-1137, 2003.
18. Wu, C.L.; Yang, D.I. et al. Quantitative culture of endotracheal aspirates in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia in patients with treatment failure. *Chest*. 122 (2): 662-668, 2002.
19. Zanon, U; Neves, J. et al. *Infecções Hospitalares – prevenção, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: MEDSI; 1987.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Everardo Albuquerque Menezes
Rua Juazeiro do Norte, 199/302 Meireles
CEP. 60165-110 Fortaleza - CE



IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
XXXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
VIII Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Prevalência da tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeiros em Porto Alegre, RS

Prevalence of trichomonosis among women resident in the Papeiros Slum in Porto Alegre, RS

Rafael V. Michel¹, Fernanda P. Borges¹, Renata C. M. Wiltuschnig¹, Francine G. Neves¹, Juliana Ribeiro¹, Renata C. Vieiro¹, Patrícia B. Vieira¹, Gabriela R. Bohns¹, Tiana Tasca^{1,2} & Geraldo A. De Carli¹

RESUMO - *Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado parasito do trato urogenital humano. A tricomonose é a doença sexualmente transmissível (DST) não-viral mais comum do mundo. Na mulher, a infecção tem sido associada a sérias seqüelas, como doença inflamatória pélvica, câncer cervical, parto prematuro e baixo peso de bebês nascidos de mães infectadas. A infecção pelo *T. vaginalis* aumenta a transmissão e aquisição do HIV. Considerando o impacto da tricomonose na saúde pública, estudos epidemiológicos são fundamentais para o controle da doença. Neste estudo foi estabelecida a prevalência da tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeiros, em Porto Alegre, RS. Os procedimentos de diagnóstico usados no inquérito socioepidemiológico foram exames direto a fresco e cultural. A prevalência do *T. vaginalis* entre as 75 mulheres examinadas foi de 20,0%. O perfil socioepidemiológico da população feminina estudada demonstra que a prevalência da tricomonose foi maior em mulheres casadas, negras, fumantes, de baixo nível educacional, desprovidas de acesso à higiene e saneamento básico e que não faziam uso de contraceptivos. Os dados demonstram a necessidade urgente de prover atendimento de saúde e educação preventiva à população da Vila dos Papeiros.

PALAVRAS-CHAVE - *Trichomonas vaginalis*, prevalência, doença sexualmente transmissível, epidemiologia

SUMMARY - *Trichomonas vaginalis* is a flagellated protozoan that parasitizes the human urogenital tract. Trichomonosis is the most common non-viral sexual transmitted disease in the world. In women the infection has been associated with pelvic inflammatory disease, cervical cancer, premature birth and low weight of babies born from infected mothers. The *T. vaginalis* infection increases the transmission and acquisition of HIV. Considering the serious impact of trichomonosis on public health, epidemiologic studies are essential to control the disease. In this study we established the prevalence for trichomonosis among women resident in the Papeiros Slum, Porto Alegre, RS. The diagnostic methods utilized in the epidemiologic survey were wet mount and culture. The prevalence of *T. vaginalis* among 75 examined women was 20%. The profile of the female population demonstrates that the prevalence of trichomonosis was high among married, black, smokers and illiterate women, among those without basic hygiene and among women that did not use condoms. Data demonstrate the urgent need of health care and health education to Papeiros Slum population.

KEYWORDS - *Trichomonas vaginalis*, prevalence, sexually transmitted disease, epidemiology

INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não-viral mais comum do mundo¹⁴ com 250 a 350 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano^{37,39}. Na mulher a apresentação clínica varia desde infecção assintomática até severa vaginite. No homem, a tricomonose é geralmente assintomática, mas pode variar de um estado agudo, caracterizado por uretrite purulenta abundante a doença assintomática leve, clinicamente indistinguível de outras uretrites³¹. Estudos recentes indicam que o impacto da tricomonose não está limitado à vaginite e uretrite. Na mulher, a infecção pelo *T. vaginalis* pode causar sérias conseqüências, como doença inflamatória pélvica¹⁶, câncer cervical^{15,20,40}, parto prematuro e baixo peso de bebês nascidos de mães infectadas⁵. Entre outras seqüelas, causadas pela tricomonose, estão recém-nascidos com doença pulmonar crônica adquirida durante o parto de mãe infectada¹⁸ e co-infecção pelo *T. vaginalis* e *Pneumocystis carinii* em um paciente com AIDS¹². A tricomonose está associada ao aumento da transmissão do HIV¹³. Homens HIV-positivos com tricomonose têm elevados números de partículas virais no sêmen, facilitando a transmissão do HIV¹⁷. A infecção pelo *T. vaginalis* expande a porta de saída em pacientes HIV-positivos

e expande a porta de entrada para pacientes HIV-negativos³⁵. Estima-se que 24% das infecções pelo HIV são diretamente atribuíveis a infecções pelo *T. vaginalis*. Portanto, o controle desta DST pode ser um dos meios mais eficazes para o manejo do risco de transmissão do HIV mundialmente. Considerando o sério impacto da tricomonose na saúde pública, estudos epidemiológicos são fundamentais para o controle da doença.

O diagnóstico da tricomonose não pode ser realizado baseado somente na apresentação clínica pois a infecção poderia ser confundida com outras DSTs. Se a clínica fosse utilizada isoladamente para o diagnóstico, 88% das mulheres infectadas não seriam diagnosticadas e 29% das não infectadas seriam falsamente indicadas como tendo infecção³¹. A investigação laboratorial é necessária e essencial para o diagnóstico da tricomonose uma vez que leva ao tratamento apropriado e facilita o controle da propagação da infecção³¹. Muitos estudos têm utilizado freqüentemente técnicas com baixa sensibilidade, como o exame direto a fresco e preparações coradas, conseqüentemente à prevalência de infecção por *T. vaginalis* pode ser subestimada³⁵. O método de cultura é o padrão-ouro para o diagnóstico porque é simples de interpretar e requer somente 300-500 tricomonas/mL de inóculo para iniciar o crescimento. No entanto, são necessários alguns dias para a identificação do parasito, tempo durante o qual os pacientes infectados po-

Recebido em 08/07/2005

Aprovado em 09/03/2006

¹Laboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil.

²Centro Universitário Metodista IPA, Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80, Rio Branco 90420-060, Porto Alegre, RS, Brasil.

dem continuar a transmitir a infecção^{8,9,31,33}. Neste estudo foi determinada a prevalência da tricomonose entre mulheres residentes na Vila dos Papeleiros, em Porto Alegre, RS. Paralelamente, foi investigado o perfil socioepidemiológico da população estudada. Como método diagnóstico, foi usada a combinação triagem pelo exame direto a fresco e cultura das amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Área estudada: A vila dos Papeleiros foi construída sem planejamento, não seguindo regras de urbanização. Este conjunto de casebres foi implantado no perímetro urbano (situado entre a Rua Voluntários da Pátria e Avenida Castelo Branco). As moradias não são padronizadas, construídas em madeira, com um ou dois cômodos (cozinha e quarto), teto simples (madeira, plástico e/ou papelão) e piso de terra batida. Os casebres não possuem latrina, esgoto, cisterna e/ou reservatório para água e somente alguns são servidos pela rede municipal de água. Entretanto, os casebres são abastecidos de energia elétrica. Os dejetos humanos são jogados no solo ou recolhidos próximos às moradias. Existem 21 banheiros públicos sem condições de uso. O lixo é deixado exposto em monturos sobre o solo. As ruas não são pavimentadas e ocorre grande acúmulo de lixo e água da chuva. As casas não possuem jardins e/ou hortas. Animais como cães, gatos e cavalos são mantidos na vila sem qualquer condição de higiene. Com frequência, acidentes com mordidas de ratos principalmente vitimando crianças, são reportados às voluntárias que prestam assistência básica a população da vila.

População: Os habitantes são de etnia branca, negra e mulata, de ambos os sexos e a maioria (em torno de 70%) têm como profissão a reciclagem de papel. Durante o período de junho a julho de 2003, foi realizado um estudo socioepidemiológico para o diagnóstico da tricomonose entre as mulheres residentes na Vila dos Papeleiros. Um total de 75 mulheres sexualmente ativas apresentou-se espontaneamente. Por razões éticas, virgens foram excluídas do exame ginecológico. As pacientes foram questionadas no dia da colheita da amostra quanto a idade, etnia, estado civil, número de filhos, atividade sexual, tipo de unidade sanitária na moradia, *status* de fumante, uso de contraceptivos, escolaridade e profissão. O grau de promiscuidade sexual da população estudada não pode ser caracterizado. Os resultados do inquérito socioepidemiológico são apresentados na Tabela I.

Colheita da amostra: As secreções vaginais foram colhidas imediatamente após o inquérito socioepidemiológico. Todas as mulheres foram orientadas para não realizar a higiene vaginal, durante um período de 18 a 24 horas antes da colheita do material, e para não fazer uso de medicamentos tricomonocidas, tanto vaginais (gel e cremes) como orais por 15 dias. O material foi colhido na vagina com *swab* de algodão não absorvente, com auxílio de um espectro não lubrificado. Foram colhidos dois *swabs* de cada paciente, para facilitar os exames direto e cultural⁸.

Exame direto a fresco: Devido à falta de infra-estrutura da vila para a realização imediata do exame microscópico, as amostras foram temporariamente preservadas em 1,0 mL de solução salina isotônica glicosada a 2%, tépida e temperatura aproximada de 30°C, até serem transportadas ao laboratório. Esta solução mantém os organismos viáveis por aproximadamente 6 horas à temperatura aproximada de 37°C⁸. As amostras foram observadas ao microscópio óptico em um período máximo de 2 horas.

Exame cultural: Neste estudo foi usado o meio de cultura *trypticase-yeast extract-maltose* (TYM) descrito por Diamond¹⁰, suplementado com 10% de soro bovino estéril e inativado, 1.000 UI/mL de penicilina e 1 mg/mL de sulfato de estreptomicina. O pH do meio foi ajustado para 6,0. Os swabs contendo as secreções vaginais colhidas das pacientes foram vigorosamente agitados no meio de cultura e incubados à 37°C. O controle de qualidade foi realizado inoculando-se paralelamente às amostras das pacientes um isolado de *T. vaginalis* padrão, ATCC 30236, da American Type Culture Collection. Os resultados não foram relatados como negativos antes de 96 horas de incubação⁸.

Análise estatística: Os dados foram analisados pelo Teste *t* de Student, considerando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as 75 mulheres residentes na Vila dos Papeleiros, 20,0% (15) estavam infectadas pelo *T. vaginalis*. De Carli e Machado⁶ estudaram 500 mulheres procedentes de clínicas privadas, ambulatórios, centros de saúde e de hospitais de Porto Alegre, RS, encontrando uma prevalência igual a 29,4%. Em um estudo posterior, De Carli *et al.*⁷ mostraram índices de infecção iguais a 37,5% em 200 mulheres sexualmente ativas que compareceram espontaneamente a Divisão de Controle de Doenças Venéreas em Porto Alegre, RS. A comparação entre o índice de infecção encontrado neste trabalho e nos trabalhos anteriormente realizados em Porto Alegre revela uma diferença estatisticamente significativa ($P = 0,012$)^{6,7}. Entretanto, a prevalência da tricomonose encontrada em mulheres na Vila dos Papeleiros se aproxima da média nacional. Miranda *et al.*^{27,28} estudando 121 mulheres presidiárias do presídio estadual de Vitória, Espírito Santo encontraram uma prevalência para o *T. vaginalis* igual a 30,0%. Adad *et al.*¹ estudaram a frequência da tricomonose em um total de 20.356 amostras de pacientes atendidas na Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Os índices de prevalência foram 10,0%, 17,3%, 9,8% e 3,4% nos anos de 1968, 1978, 1988 e 1998, respectivamente. Simões-Barbosa *et al.*³⁴ examinaram 142.158 pacientes em diferentes Hospitais de Brasília durante um período de seis anos. Os resultados variaram de 4,9 a 10,0% na população estudada. Diferenças nos valores encontrados para a prevalência da infecção pelo *T. vaginalis* são atribuídas a diferentes populações que deram origem às amostras e ao emprego de diferentes métodos diagnósticos, alguns com baixa sensibilidade, como o método de Papanicolau^{1,25,27,28,34}. A coloração de Papanicolau é vastamente empregada no diagnóstico da tricomonose porque é rotineiramente usada nos exames ginecológicos para triagem de anormalidades citológicas, particularmente em populações com uma alta prevalência de DSTs^{3,23,36}. Entretanto, Perl³⁰ relatou um erro de 48,4% no diagnóstico devido a achados falso-positivos e falso-negativos quando o método de Papanicolau foi usado como único critério para o diagnóstico da tricomonose. As técnicas de coloração são limitadas, visto que o parasito frequentemente não aparece na típica forma piriforme com flagelos, mas em formas redondas semelhantes a leucócitos, o que dificulta a identificação³⁰. O exame direto a fresco é rápido, de fácil execução e de baixo custo. Entretanto, a sensibilidade é baixa, variando de 50 a 80% quando comparado ao método cultural, visto que a detecção do *T. vaginalis* é baseada na observação microscópica dos organismos móveis³⁸. Neste estudo foi combinada a triagem pelo exame direto a fresco e o exame cultural, considerado padrão-ouro para o diagnóstico da tricomonose²¹.

A Tabela I mostra os resultados da prevalência da infecção

em relação à idade, etnia, estado civil, número de filhos, atividade sexual, tipo de unidade sanitária na moradia, *status* de fumante, uso de contraceptivos, escolaridade e profissão. Os dados mostram que a prevalência da tricomonose é maior em mulheres negras, o que está de acordo com estudos realizados nos Estados Unidos, onde as taxas de tricomonose também são mais elevadas em mulheres negras do que em mulheres brancas³¹. Entretanto, não são conhecidas razões biológicas que expliquem como a etnia poderia alterar o risco de aquisição da tricomonose²². Em relação ao estado matrimonial, as mulheres casadas apresentaram números mais elevados de infecção (12,0%) quando comparadas a mulheres solteiras (5,3%), divorciadas (2,6%) e nenhuma viúva. Nossos dados diferem de estudos previamente realizados, que mostram que a frequência da tricomonose é menor em mulheres casadas, quase o dobro em viúvas e solteiras e três vezes maior em mulheres divorciadas e separadas¹⁹. A maior prevalência em mulheres casadas sugere a ocorrência de relações sexuais com diferentes parceiros associada ao desuso do preservativo masculino, por parte de ambos os cônjuges, o que foi confirmado pela alta prevalência do protozoário (10,6%) encontrada entre as mulheres que não usavam qualquer método contraceptivo. Em um estudo recente, Drumright *et al.*¹¹ mostraram que a ocorrência de DSTs está associada a múltiplos parceiros sexuais e ao desconhecimento do comportamento sexual do parceiro.

Condições de higiene precárias e baixo nível de escolaridade também estão associados a uma maior prevalência da infecção. A frequência de atividade sexual é muitas vezes um fator difícil de ser analisado devido a questões culturais. Curiosamente, nosso inquérito mostra que as mulheres que mantinham relações sexuais até uma vez por semana apresentaram prevalência mais elevada (8,0%) em comparação a mulheres com maior atividade sexual, de 2 a 4 vezes por semana (4,0%) a mais de 5 vezes por semana (1,3%). Porém, 40,0% das mulheres entrevistadas não informaram a frequência de atividade sexual e apresentaram prevalência da tricomonose igual a 6,6%. As mulheres fumantes também apresentaram maiores números de infecção pelo *T. vaginalis* (13,3%), embora não exista nenhuma correlação direta com a transmissão do parasito.

A prevalência mundial anual da tricomonose é de 250 a 350 milhões de novos casos^{37,39} e na Europa o *T. vaginalis* é responsável por 41,0% dos casos de vaginite¹⁹. A frequência de infecções pelo *T. vaginalis* nos Estados Unidos é de 8 milhões de novos casos anualmente⁴. Durante os últimos seis anos estudos em mulheres de diferentes clínicas americanas demonstraram índices de prevalência que variaram de 8,6% a 47,0% e entre os homens de 2,8% a 17,0%⁴. A baixa escolaridade, a pobreza e as condições sanitárias precárias facilitam a disseminação da DST em mulheres². A incidência da infecção depende de vários fatores incluindo idade, atividade sexual, número de parceiros sexuais, outras DSTs, fase do ciclo menstrual, técnicas de diagnóstico e condições sócio-econômicas³¹. As diferenças no padrão de vida, nível educacional e higiene pessoal também são fatores que influenciam na incidência da infecção. A prevalência é alta entre os grupos de nível socioeconômico baixo, entre as pacientes de clínicas ginecológicas, pré-natais e em serviços de doenças sexualmente transmissíveis (DST)¹⁹. Quando analisada sob o ponto de vista de saúde pública, o controle da tricomonose pode representar um dos mais eficazes meios de redução da transmissão do HIV. O controle da infecção pelo *T. vaginalis* é constituído das mesmas medidas preventivas que são tomadas no combate às outras DST. Convém salientar que a presença de uma DST é fator

de risco para outra. As estratégias de prevenção à tricomonose são comuns às outras DSTs: 1) prática do sexo seguro, que inclui aconselhamentos que auxiliam a população a fazer as escolhas sexuais mais apropriadas para a redução do risco de contaminação com os agentes infecciosos; 2) uso de preservativos; 3) abstinência de contatos sexuais com pessoas infectadas e 4) limitação das complicações patológicas mediante a administração de um tratamento imediato e eficaz, tanto para os casos sintomáticos como para os assintomáticos, ou seja, tratamento do casal, mesmo que a doença tenha sido diagnosticada em apenas um dos cônjuges^{24,26,29,32}. A prevalência da tricomonose encontrada entre as mulheres na Vila dos Papeleiros revela a urgente necessidade de atenção médica e educação profilática àquela população.

TABELA I
Prevalência da tricomonose versus perfil socioepidemiológico, na Vila dos Papeleiros, Porto Alegre, RS, no ano de 2003 (n = 75)

	Total	Positivas	Porcentagem
Etnia			
Branca	26	3	4,0
Mulata	19	5	6,6
Negra	30	7	9,3
Idade			
Até 20 anos	29	5	6,6
21-30 anos	17	3	4,0
31-40 anos	16	2	2,6
Acima de 41 anos	13	5	6,6
Estado Civil			
Solteira	22	4	5,3
Casada ^a	47	9	12,0
Divorciada	4	2	2,6
Viúva	2	0	0,0
Número de Filhos			
Até 3 filhos	50	9	12,0
Mais de 4 filhos	25	6	8,0
Atividade Sexual			
Pouco frequente (0-1 vez/semana)	21	6	8,0
Frequente (2-4 vezes/semana)	18	3	4,0
Muito frequente (>5 vezes/semana)	6	1	1,3
Não informa	30	5	6,6
Tipo de Contraceptivo			
Anticoncepcional injetável	5	0	0,0
Preservativo masculino	14	2	2,6
Pílula anticoncepcional	21	3	4,0
Ligadura de trompas	5	2	2,6
Não usa/não informa	34	8	10,6
Tipo de Unidade Sanitária			
Própria	31	5	6,6
Não-própria	40	10	13,3
Improvisada ^b	4	0	0,0
Status de Fumante			
Fumante	38	10	13,3
Não-fumante	35	5	6,6
Não informa	2	0	0,0
Escolaridade			
Ensino fundamental incompleto	67	13	17,3
Ensino fundamental completo	7	2	2,6
Ensino médio	1	0	0,0
Profissão			
Auxiliar de serviços gerais	1	1	1,3
Comerciante	1	0	0,0
Cozinheira	1	0	0,0
Desempregada	5	1	1,3
Doméstica	3	0	0,0
Dona de casa	20	4	5,3
Estudante	10	0	0,0
Recicladora	34	9	12,0

(a) Incluem-se mulheres com união formal ou informal. (b) Uso de baldes para necessidades fisiológicas e despejo pela janela

REFERÊNCIAS

1. Adad, S. J.; de Lima, R. V.; Sawan, Z. T. et al. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp. and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. São Paulo Med. J., 119:200-205, 2001.
2. Behets, F.; Andriamiadana, J.; Rasamilalao et al. Sexually transmitted infections and associated socio-demographic and behavioral factors in women seeking primary care suggest Madagascar's vulnerability to rapid HIV spread. Trop. Med. Int. Health, 6: 202-211, 2001.
3. Berggren, O. Association of carcinoma of the uterine cervix and *Trichomonas vaginalis* infestations. Frequency of *Trichomonas vaginalis* in preinvasive and invasive cervical carcinoma. Am. J. Obstet. Gynecol., 105: 166-168, 1969.
4. Cates Jr W. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. Sex. Transm. Dis., 26:52-57, 1999.
5. Cotch, M. F.; Pastorek II, J. G.; Nugent, R. P. et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study Group. Sex. Transm. Dis., 24: 353-60, 1997.
6. De Carli, G. A.; Machado, B. Epidemiologia e diagnóstico laboratorial de *Trichomonas vaginalis*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 4: 33-36, 1973.
7. De Carli, G. A.; Bertchinger, B.; Saraiva, P. J.; Miron, C. F. Laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis* among women attending a venereal diseases control division. First report. Rev. Lat.-amer. Microbiol., 29:301-303, 1987.
8. De Carli, G. A.; Tasca, T. *Trichomonas vaginalis*. In: De Carli, G. A. Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. São Paulo: Atheneu, 2001, p. 453-467.
9. De Carli, G. A.; Tasca, T. *Trichomonas*. In: Neves D.P. Parasitologia Humana. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 494p.
10. Diamond, L. J. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J. Parasitol., 43: 488-490, 1957.
11. Drumright, L. N., Gorbach, P. M., Holmes, K. K. Do people really know their sex partners? Concurrency, knowledge of partner behavior, and sexually transmitted infections within partnerships. Sex. Transm. Dis., 31: 437-42, 2004.
12. Duboucher C. et al. Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis* sp. as a novel manifestation of AIDS. Human Pathol. 34:508-511.
13. Fleming, D. T.; Wasserheit J. N. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. Sex. Transm. Inf., 75: 3-17, 1999.
14. Gerbase, A. C., Rowley, J. T., Berkley, S. F. D., Piot, P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. Sex. Transm. Inf., 74: S12-S16, 1998.
15. Gram, I. T.; Macaluso, M.; Churchill, J. et al. *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. Cancer Causes Control, 3: 231-236, 1992.
16. Heine, P.; McGregor J. A. *Trichomonas vaginalis*: a re-emerging pathogen. Clin. Obstet. Gynecol., 36: 137-144, 1993.
17. Hobbs, M. M.; Kzembe, P., Reed, A. W., Miller, et al. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. Sex. Transm. Dis., 26: 381-7, 1999.
18. Hoffman, D. J., Brown, G. D.; Wirth, F. H. et al. Urinary tract infection with *Trichomonas vaginalis* in a premature newborn infant and the development of chronic lung disease. J. Perinatol., 23: 59-61, 2003.
19. Hogniberg, B.M.; Burgess, E. Trichomonads of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis*. In: Kreier, J.P. Parasitic Protozoa. 2 ed. v.9. San Diego: Academic Press., 1994, p.1-57.
20. Kharsany, A. B.; Hoosen, A. A.; Moodley, J. et al. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. Genitourin. Med., 69: 357-360, 1993.
21. Lawing, L. F.; Hedges, S. R.; Schwabke, J. R. Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. J. Clin. Microbiol., 38: 3585-3588, 2000.
22. Leherker, M. W.; Alderete J. F. Biology of trichomoniasis. Curr. Opin. Infect. Dis., 13: 37-45, 2000.
23. Levvet, P. N. A comparison of five methods for the detection of *Trichomonas vaginalis* in clinical specimens. Med. Lab. Sci., 37: 85-88, 1980.
24. Lima, A.L.M. et al. Perguntas e Respostas HIV/AIDS. São Paulo: Atheneu, p.67, 1996.
25. Lobo, T. T.; Feijó, G.; Carvalho, S. E. et al. A comparative evaluation of the Papanicolaou test for the diagnosis of trichomoniasis. Sex. Transm. Dis., 30:694-969, 2003.
26. Maciel, G. P.; Tasca T.; De Carli, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. J. Brás. Patol. Med. Lab., 40: 153-161, 2004.
27. Miranda, A. E.; Vargas, P.; Michael, St. L. et al. Sexually transmitted diseases among female prisoners in Brazil: prevalence and risk factors. Sex. Transm. Dis., 27: 491-495, 2000.
28. Miranda, A. E.; Merçon-Vargas, P. R.; Viana, M. C. Saúde sexual e reprodutiva em penitenciária feminina, Espírito Santo, Brasil. Rev. Saúde Pública, 38: 255-260, 2004.
29. OMS - Organización Mundial De La Salud. Lucha contra las Enfermedades de Transmision Sexual. Ginebra, p.23, 1985.
30. Perl, G. Errors in the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infections as observed among 1199 patients. Obstet. Gynecol., 39: 7-9, 1972.
31. Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R. et al. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin. Microbiol. Rev., 11:300-317, 1998.
32. Robert, J. Saúde Pública, AIDS e Prostituição. In: Naud, P. et al. Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1993, p. 287-288.
33. Robertson, D. H., Lumsden, W. H., Fraser, K. F. et al. Simultaneous isolation of *Trichomonas vaginalis* and collection of vaginal exudate. Br. J. Vener. Dis., 45: 42-43, 1969.
34. Simões-Barbosa, A.; Coutinho Feijó, G.; da Silva, J. et al. A six-year follow-up survey of sexually transmitted diseases in Brasília, the capital of Brazil. Bras. J. Infect. Dis., 6:110-117, 2002.
35. Sorvillo, F.; Smith, L.; Kerndt, P. et al. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. Emerg. Infect. Dis., 7: 927-932, 2001.
36. Spence, M. R.; Hollander, D. H.; Smith, J. et al. The clinical and laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. Sex. Transm. Dis., 7: 168-71, 1980.
37. Weinstock, H.; Berman, S.; Cates, W. Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. Perspect Sex. Reprod. Health, 36: 6-10, 2004.
38. Wendel, K. A.; Erbelding, E. J., Gaydos, C. A. et al. *Trichomonas vaginalis* polymerase chain reaction compared with standard diagnostic and therapeutic protocols for detection and treatment of vaginal trichomoniasis. Clin. Infect. Dis., 35: 576-580, 2002.
39. WHO. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and estimates. pp. 27-29, 2001.
40. Zhang, Z.F.; Begg, C.B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. Int. J. Epidemiol., 23: 682-690, 1994.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Dr. Geraldo Atílio De Carli
Laboratório de Parasitologia Clínica,
Faculdade de Farmácia,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),
CEP. 90619-900 Porto Alegre, RS
e-mail: gdecarli@portoweb.com.br