

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino..... <i>Carla Filippin; Larissa Duarte Chistofolletti; Maria Cecilia Menks Ribeiro & Cidônia de Lourdes Vituri</i> Determination of number of nucleolar organizers regions in lesions of the uterine cervical epithelium	133
Diagnóstico laboratorial das micobactérias isoladas na urina: comparação entre métodos convencionais e a reação em cadeia da polimerase (PCR)..... <i>Antonio Jorge Alves de Lima; Cristiane Cunha Frota; José Gomes Bezerra Filho & José Luciano Bezerra Moreira</i> Laboratorial diagnosis of the micobacterias isolated in the urine: comparison between conventional methods and the polymerase chain reaction (PCR)	141
Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria..... <i>Rosmarj Hörner; Rubia Vissotto; Aline Mastella; Adenilde Salla; Bettina Meneghetti; Nara L. Frasson Dal Forno; Roselene Alves Righi & Loiva O. de Oliveira</i> Prevalence of the microorganisms in urinary tract infections of patients attended in the Hospital Universitário de Santa Maria	147
Avaliação de testes de diagnósticos rápidos na detecção de infecção assintomática do líquido amniótico em mulheres gestantes..... <i>Roxane Martins; Carlos Augusto Alencar Júnior; Marly Maria Lopes Vieira Peixoto; Josias Martins Vale & José Luciano Bezerra Moreira</i> Evaluation of rapids diagnosis tests in detection of amniotic fluid asymptomatic infection in pregnant women	151
Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará..... <i>Everardo Albuquerque Menezes; Adriano Coutinho Alcanfor & Francisco Afrânio Cunha</i> Airborne fungi in the periodics room of the library of health science of the University Federal of Ceará	155
Avaliação da intervenção multiprofissional e interdisciplinar na evolução do quadro clínico de pacientes com alto risco de doença arterial coronariana..... <i>Geny Aparecida Cantos; Claudia de Souza Marques da Silva; Carmen Dolores de Araujo Waltrick; Elizabeth M. Hermes; Albertina Bonetti; Manoela Bagestam & Cláudia Cavalett</i> Evaluation of multiprofessional and interdisciplinary intervention in the clinical evolution of patients at high risk for coronary artery disease	159
Interferência do consumo de Chimarrão nos níveis de ácido hipúrico urinário..... <i>Estefânia Perin Fonseca; Ingrid Johann; Ana Paula Alegretti & Flavia Valladao Thiesen</i> "Chimarrão" consumption interference and hippuric acid urine levels	163
Estudo da função tireoidiana de pacientes do sexo feminino da unidade básica de saúde da cidade de Campo Bom/ RS..... <i>Gustavo Müller Lara & Fernanda Deitos</i> Study of the thyroid function in patients' of the feminine sex of the basic unit of health of the city of Campo Bom/RS	167
Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) - Revisão..... <i>Eduardo Monguilhott Dalmarco; Solange Lúcia Blatt & Caio Maurício Mendes de Córdova</i> Laboratory Identification of Extended-Spectrum β -lactamases - A review	171
Susceptibilidade antimicrobiana de <i>Moraxella catarrhalis</i> isolada de infecções do trato respiratório..... <i>Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva</i> Antibiotic-susceptibility of <i>Moraxella catarrhalis</i> isolated from respiratory tract infections	179
Caracterização e correlação do fenômeno pró-zona com títulos de sororeatividade do VDRL e reação de imunofluorescência indireta em soros de pacientes com sífilis..... <i>Luciana Karla Araújo de Azevedo; Paulo Sergio Gomes Fernandes; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva (MSc); Manoel Josué Batista Neto; Maria Gorete Lins de Queiroz; Valéria Cristina Ribeiro Dantas (MSc); Valéria Soraya de Farias Sales (MD, MSc, PhD) & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc, PhD)</i> Characterization and correlation of prozone phenomenon whit seroreactivity and indirect immunofluorescence in sero from patients with syphilis	183
Cromoblastomicose: Doença presente na realidade populacional brasileira..... <i>Evandro Leão Ribeiro; Ailton José Soares; Wesley Magno Ferreira; Clever Gomes Cardoso; Plínio Lázaro Faleiro Naves & Sueli Meira da Silva Dias</i> Chromoblastomycosis: present disease in brazilian population reality	189
Parasitismo intestinal em índios da reserva indígena Rio das Cobras..... <i>Josimara Gilio; Sônia de Lucena Mioranza & Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa</i> Intestinal parasitism in indians of the reservation indigenous Rio das Cobras	193
Uso do teste com cloridrato de trifênol tetrazólio (CTT) para detecção de bacteriúria sintomática e assintomática..... <i>Tatiana Zampiero Ramos; Elisabeth Loshchagin Pizzolitto & Antonio Carlos Pizzolitto</i> Use of the triphenil tetrazolium chloride (TTC) test to detect symptomatic and asymptomatic bacteriuria	197
Avaliação da dosagem de interleucina-5 e imunoglobulina e em pacientes com giardíase com ou sem eosinofilia..... <i>Ana Lúcia A. Fontenele; Paulo Germano de Carvalho; Cláudio H. de A. Ferreira; Alísio B. Girão; Maria Jânia Teixeira; José Ajax Nogueira Queiroz & Yacy M. Almeida</i> Evaluation of dosage of interleucina-5 and immunoglobulin e in patients with giardiasis with or without eosinophilia	201
Características da microbiota subgingival em pacientes com periodontite..... <i>Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva</i> Microbiological characteristics of subgingival microbiota in patients with periodontitis	207

3

VOLUME 38

2006

Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino

Determination of number of nucleolar organizers regions in lesions of the uterine cervical epithelium

Carla Filippin¹; Larissa Duarte Chistofolletti²; Maria Cecília Menks Ribeiro³ & Cidônia de Lourdes Vituri⁴.

RESUMO - A Técnica de AgNOR é um método histoquímico que evidencia as Regiões organizadoras de nucléolo (NORs), sendo considerado um bom marcador de proliferação celular e conseqüentemente pode ser usado para avaliar malignidade. O Câncer de colo uterino pode ser detectado através do exame preventivo do câncer, através do Método de Papanicolaou, possibilitando o tratamento precoce. Os casos sugestivos bem como os inconclusivos devem ser confirmados pela histologia e/ou colposcopia, o que pode acarretar evasão das pacientes dos Serviços de Saúde. Os teste moleculares, quando apresentam resultados positivos para vírus oncogênicos, não determinam necessariamente o desenvolvimento de uma displasia, sendo necessário outros fatores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica de AgNOR aplicada em esfregaços de material cervical uterino e analisar a sua associação com o diagnóstico citológico e histológico em lesões do epitélio cervical uterino. Foram estudadas 85 pacientes na faixa etária de 18 a 65 anos de idade. Amostras citológicas de material cervical foram submetidas à coloração de AgNOR e Papanicolaou e a biópsia à coloração de HE. As lâminas coradas com AgNOR foram submetidas a análises microscópicas e computadorizadas. Os resultados demonstraram associação, entre a técnica de AgNOR e o diagnóstico citológico e histológico com correlação positiva para número dos pontos de AgNOR (r de Spearman: 0,8468 e 0,8441 respectivamente). Portanto, conclui-se que a Técnica de AgNOR é eficiente, e que pode ser empregada em material cervical citológico nos casos inconclusivos.

PALAVRAS-CHAVE - AgNOR, cervical, displasia, câncer uterino, Papanicolaou, citologia, colposcopia, histologia.

SUMMARY - Technique of AgNOR, is a histochemical method that evidences the Regions organizers of nucleolus (NORs), being considered a good marker of cellular proliferation consequently can be used to evaluate progress of the malignant transformation. The uterine col cancer can be detected through the preventive examination of the cancer, with the cytopathologic exam, making possible the precocious treatment. The suggestive cases as well as the inconclusive must be confirmed by the histological and/or colposcopic, what it can cause evasion of the patients of the Services of Health. The test molecular, when they present resulted positive for oncogenic viruses, necessarily does not determine the development of a dysplasia, being necessary other factors. The objective of this work was to evaluate the technique of AgNOR applied in smears of uterine cervical material and to analyze its association with the cytological and histological diagnosis in injuries of the uterine cervical epithelium. The eighty and five samples of cytological cervical from different patients between 18 and 65 years old were examined. Cytological samples of cervical material had been submitted to the coloration of AgNOR and Papanicolaou and the biopsy to the HE coloration. You plate them proceeded with AgNOR had been submitted the microscopic and computer analyses. Os results had demonstrated association; enter the technique of AgNOR and the cytological and histological diagnosis with positive correlation for number of the points of AgNOR (r of Spearman: 0,8468 and 0,8441 respectively). Finally, concludes that the Technique of AgNOR is efficient, and that it can be used in cytological cervical material in the inconclusive cases.

KEYWORDS - AgNOR, cervical, dysplasia, uterine cancer, Papanicolaou, cytology, colposcopy, histology.

INTRODUÇÃO

O trabalho pioneiro de Papanicolaou introduziu o exame colpocitológico na pesquisa diagnóstica de prevenção e tratamento do câncer de colo uterino. Mais tarde, pelos avanços tecnológicos em citologia esfregativa, demonstrou-se que este exame pode apontar para a solução de um enorme problema de Saúde Pública. Sendo o útero anatomicamente um órgão de fácil acesso, permite a realização da coleta de material para o exame citopatológico sem acarretar grandes transtornos à mulher e realizar a importante tarefa de prevenção do câncer.

Para a determinação do câncer de colo de útero, o uso das técnicas atuais, como o teste de citopatológico, apesar de serem subjetivos e confiáveis, apresentam baixos índices de reprodutibilidade. Os testes moleculares, quando apresentam resultados positivos para tipos virais altamente oncogênicos, não determinam necessariamente o desenvolvimento de uma displasia, sendo necessários vários outros fatores concomitantes. Portanto, novas técnicas citológicas de análises preditivas, confiáveis e reprodutíveis devem

ser admitidas. Entretanto, a histologia ainda é considerada a base para o tratamento e seguimento de alterações identificadas pela citologia, além de representar o teste de certeza nos estudos de patologia cervical (CARNEIRO *et al.*, 2004), embora seja uma técnica invasiva.

Marcadores biológicos de proliferação celular podem ser utilizados para elucidar casos de difícil diagnóstico. Um desses métodos é o método histoquímico pela técnica de AgNOR, o qual trazem novas perspectivas para a compreensão do crescimento tumoral, com conseqüentes repercussões para o prognóstico e a terapêutica dessas lesões (NEVILLE *et al.*, 1998).

A técnica de AgNOR marca as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) que foram descritas primeiramente por Heintz (1931) e por McClintock (1934) (DERENZINI, 2000), como sendo as regiões marcadas de cromatina em torno da qual, no fim da telofase, o nucléolo é reformado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula. Estas regiões correspondem aos constituintes secundários de cromossomas da metafase (HOWELL, 1982). As NORs podem ser facilmente identificadas em microscópio convenci-

Recebido em 30/09/2005

Aprovado em 01/07/2006

Trabalho Vencedor do Prêmio CFF 2005

¹Aluna de mestrado do programa de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina; ²Aluna do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina; ³Professora da Universidade Federal de Santa Catarina – BEG-CCB. ⁴Professora da Universidade Federal de Santa Catarina – ACL-CCS

onal mediante a impregnação por prata coloidal (AgNOR). Portanto estas regiões organizadoras de nucléolo (NOR) são fitas de DNA presentes no núcleo da célula e que possuem genes de RNA ribossômico, organizando assim como os nucléolos. Os NORs são produzidos por proteínas nucleolares facilmente identificáveis pela impregnação por prata e visualizados em regiões secundárias dos cromossomos (EGAN, 1988; CROKER & EGAN, 1988; SOOMRO, *et al.*, 1991). PLOTON e colaboradores (1986) descreveram uma técnica modificada para a demonstração das NORs (Regiões organizadoras nucleolares) que foi aplicada em seções histológicas. Esta técnica ficou conhecida como AgNOR, onde é possível visualizar NORs, na microscopia de luz como estruturas redondas intranucleares de cor marrom-café.

OBJETIVOS

Este estudo tem por base analisar a associação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Citológico de lesões do epitélio cervical uterino conforme as Classificações de Richart, 1967 e Bethesda, 2001; e, o Diagnóstico Histológico do epitélio cervical uterino conforme a Classificação de Richart, 1967; Verificar a variação do número de AgNOR entre os diferentes graus de lesão de acordo com diagnóstico citológico e histológico.

METODOLOGIA

Este trabalho é parte integrante da dissertação de mestrado intitulada "Estudos citomorfológicos de lesões do colo uterino – análise comparativa de diversas metodologias", que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Maternidade Carmela Dutra, e ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, aprovado em ambos comitês. Este estudo foi prospectivo em humanos com procedimentos experimentais *in vitro* com amostras de raspado celular de colo uterino.

Foram realizadas coletas de material cervical uterino de pacientes atendidas no Serviço de Residência Médica de Patologia Cervical da Maternidade Carmela Dutra. Optou-se por realizar o estudo neste serviço por ser um Centro de Referência do Estado de Santa Catarina em assistência de Patologia Cervical. A rotina assistencial deste Serviço mantém atendimento em ginecologia e recebe pacientes que foram encaminhadas de outros serviços públicos e particulares. As pacientes foram primeiramente esclarecidas quanto ao objetivo da pesquisa, formas de condução (sigilo e privacidade), os métodos aplicados e os benefícios que o projeto poderia trazer. Após os esclarecimentos, as pacientes foram convidadas a participar da pesquisa, e, havendo interesse, foi obtido seu consentimento por escrito.

Coleta de Material

Durante o atendimento médico, foram coletadas amostras de material cervical com auxílio da espátula de Ayre. Foi confeccionado esfregaço em duas lâminas que foram imersas imediatamente em álcool 96°GL e encaminhadas ao laboratório onde foram submetidas à rotina de coloração por AgNOR e Papanicolaou, unitariamente. Quando considerado necessário foi coletado material para biópsia e encaminhado ao laboratório conveniado.

Grupo controle

Foram considerados grupos controle neste estudo: Pacientes submetidas a exames de rotina, com resultado clínico e histológico normal. Pacientes com resultado citológico normal ou inflamatório discreto com alterações reativas discre-

tas, presença de agentes da flora vaginal normal e discreto infiltrado inflamatório; portanto, pacientes classificadas como NILM - Negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna.

Foram incluídas neste trabalho pacientes que apresentavam histórico de exame anterior alterado, entre estes foram considerados: exame clínico, história de infecção pelo Papiloma Vírus Humano, exame citológico prévio e histológico. Um segundo critério de seleção foi a adequação da qualidade dos esfregaços, cujas lâminas deveriam conter no mínimo 100 células viáveis, com características citológicas suficientes para que pudessem ser classificadas.

Foram excluídas desta pesquisa as pacientes menores de 18 anos, gestantes, e em tratamento ginecológico (quimioterapia, radioterapia, cauterização, cirurgia e tratamento local com ácido tricloroacético (TCA), e outros medicamentos).

Um segundo critério de exclusão foram as pacientes que tiveram esfregaços que apresentavam número escasso de células viáveis. Os esfregaços contendo células metaplásicas foram agrupados separadamente, para análise estatística, por considerar que uma célula em transformação pode apresentar uma atividade celular alterada.

Técnica de AgNOR

Preparou-se a solução aquosa de gelatina (solução coloidal) com dissolução de 0,5g de gelatina e 25ml de água deionizada, em meio aquecido e depois de resfriada acrescentou-se 0,25ml de ácido fórmico (SIGMA) a 1% em água deionizada (solução reveladora).

Solução de nitrato de prata foi preparada pela dissolução de 1g de cristais de nitrato de prata (MERCK) em 2ml água ultra pura, filtrada e acondicionada em frasco escuro, para evitar a oxidação do nitrato de prata. A preparação deve ocorrer no momento da coloração.

As duas soluções foram utilizadas na proporção de 1:2 respectivamente no momento da coloração.

Para o procedimento de coloração retiraram-se as lâminas com material cervical do frasco, e deixou-se secar ao ar.

A seguir, foram adicionadas ao esfregaço gotas das soluções na proporção de 1:2 respectivamente, até cobrir o esfregaço. Em seguida, as lâminas foram colocadas em banho-maria a 62°C por 7 minutos, sobre suporte de maneira que não tocassem a água; até obtenção de coloração marrom-dourado na superfície do esfregaço. As lâminas foram enxaguadas em água destilada e seca ao ar. Depois de coradas as lâminas permaneceram ao abrigo da luz até o momento da microscopia (HOWELL & BLACK, 1982) (fig. 1).

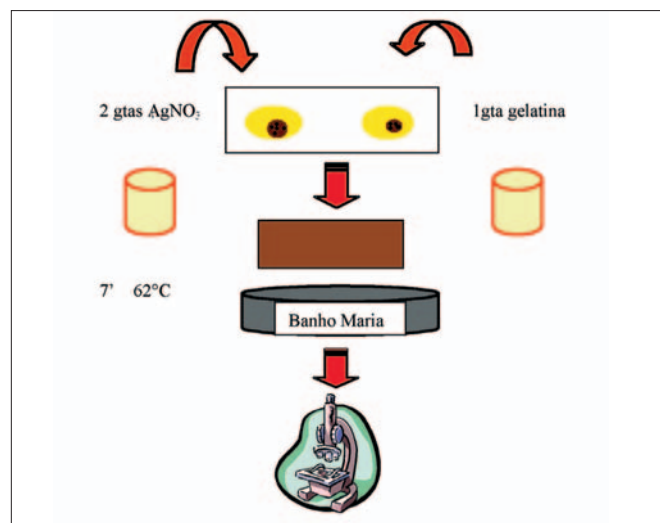


Figura 1: Esquema do protocolo experimental.

Técnica Citopatológica

As lâminas com material cervical foram retiradas do frasco e colocadas em berço próprio para coloração em cubas de vidro. As lâminas com material fixado em álcool passaram por um processo de hidratação em concentrações alcoólicas decrescentes, 96%, 80%, 70% e 50%. Em seguida foram mergulhadas 10 vezes em cada solução alcoólica. Após foram colocadas em cubas com corante de hematoxilina de Harris, por 2 minutos e 30 segundos, coloração dos núcleos, lavadas em álcool 96% por 2 vezes durante 2 e 3 minutos respectivamente. Em seguida, foram colocadas em cubas com corante orange G por 12 segundos, coloração dos nucléolos, queratina e glicogênio. Foram lavadas novamente em álcool 96% por 2 vezes durante 2 e 3 minutos respectivamente. Em seguida, foram colocadas em cubas com corante EA 50 por 1 minuto, coloração do citoplasma, novamente repetiu-se o processo de lavagem em álcool em 2 etapas durante 2 e 3 minutos respectivamente. Posteriormente foram desidratadas em álcool absoluto por 3 minutos, clarificadas em xilol por 2 minutos e, fixadas e montadas com Entelan (GOMPEL & KOSS, 1997).

Aquisição das Imagens

A aquisição das imagens foi executada utilizando-se Software Image Pro Plus 4.0. As células selecionadas foram digitalizadas através de um sistema composto por fotomicroscópio óptico Olympus BX41 com iluminação halógena, um adaptador para câmera de vídeo Olympus U-PMTVC com uma fotoculor PE 3,3 x 125 Olympus (determinando um aumento visual de 330 vezes em combinação com a objetiva), conectado a uma câmera de vídeo digital color CCD Sony Exwave HAD, modelo SCC-DC54A. Esta câmera apresenta alta sensibilidade. A imagem foi transmitida a um computador Pentium III. As lâminas coradas pelo método de AgNOR foram analisadas utilizando-se a objetiva de 100X. O processamento da imagem foi iniciado com seu congelamento no monitor, e em seguida capturada e gravada para posterior análise no programa Sacci, Scion Image (Fig 2).

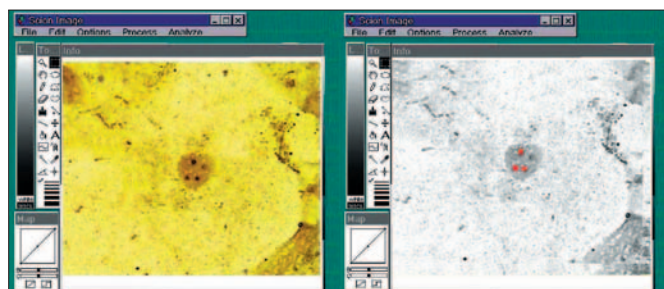


Figura 2: Análise computadorizada do número de AgNOR. As AgNOR coradas pela prata (quadro à esquerda) foram marcadas através do programa sacci (à direita), e automaticamente determinados

Imagens de boa qualidade refletem um instrumento importante em morfologia, com potencial a ser usado para definir casos de difícil discernimento pela citologia, histologia. Para cada lâmina corada pela técnica de AgNOR foram analisadas 25 células escamosas representativas da área de lesão, células com alterações citológicas e selecionados seus núcleos.

Para as análises, os núcleos extraídos das imagens digitalizadas foram marcados, onde o sistema operacional Scion Image e o programa Sacci onde foram realizadas as contagens dos pontos de AgNOR por núcleo.

Crítérios morfológicos pré-estabelecidos foram determinados para análise citológica pela coloração de Papanicolaou,

e analisados unitariamente. Os critérios foram aqueles descritos por Gompel e Koss (1997) e adaptados por FILIPPIN, *et al.*, 2000 com algumas modificações.

Alteração da relação núcleo/citoplasma; hiperchromasia; irregularidade da membrana nuclear; espessamento da membrana nuclear; irregularidade da cromatina; presença de nucléolo; alterações coilocitóticas.

Para o diagnóstico citológico foi adotada a Classificação de Richard, 1967 e complementada com a Classificação de Bethesda 2001, com algumas modificações, descritas a seguir. Foram estabelecidos os seguintes graus de lesão:

Normal = citologia normal e/ou com discretos sinais de inflação HPV = Citologia com alterações citopáticas do HPV, presença de coilócito e/ou no mínimo cinco critérios secundários do HPV, com ausência dos critérios referidos para displasia; **ASCUS**; **NIC I**; **NIC II**; **NIC III**; **carcinoma escamoso invasivo**.

A proposta deste trabalho foi avaliar a método de AgNOR aplicado a amostras citológicas devido facilidade de obtenção de material que é conseguido juntamente com a coleta de rotina da citologia. Os trabalhos encontrados na literatura foram realizados em sua maioria em biópsia cervical uterina ou amostras citológicas de líquidos cavitários (KRUGER, *et al.*, 2000).

Esta técnica baseia-se na suposição de que todos os corpos argerofílicos são AgNORs e seu número esteja positivamente relacionado à atividade dos genes que codificam RNA e a proliferação celular e ploidia (VIDAL *et al.*, 1994). Portanto tem sido sugerido que o número de AgNOR por célula pode ser uma marca de atividade celular incluindo malignidade, e seu estudo quantitativo viável no campo oncológico, citológico e histológico, sendo que o número, tamanho e posição dos AgNORs podem fornecer dados morfológicos como critérios de malignidade (REEVES, *et al.*, 1982; CORTES-GUTIERREZ, *et al.*, 2001).

Estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se o programa INSTAT-2. A verificação dos níveis de significância foi por meio do teste não-paramétrico de Mann-Withney, onde foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

A análise da correlação foi verificada com o teste não-paramétrico de Sperman r , onde $r > 0,80$ foi considerado como bom índice de correlação.

RESULTADOS

Foram estudadas 85 pacientes na faixa etária de 18 a 65 anos de idade, avaliadas pelo especialista em Patologia Cervical e submetidas ao exame clínico; coleta para exame citológico e coleta de fragmento de colo uterino para realização de exame histológico. A distribuição da avaliação citológica, de acordo com a classificação de Richart complementada pelo Sistema Bethesda, está apresentada na Figura 3.

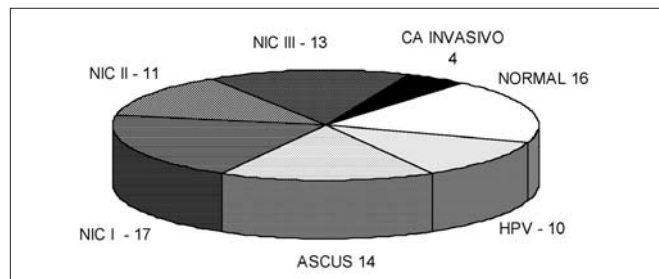


Figura 3: Frequência de cada quadro citológico entre as lâminas de material cervical uterino analisado (n = 85 casos).

Aspectos Morfológicos da Coloração de AgNOR

Com a técnica de coloração de AgNOR as células apresentam coloração amarelada com núcleos em castanho e os NORs observados com microscópio comum e objetiva de imersão, como estruturas pequenas e irregulares intranucleares de cor marrom-café a negro. Os números de pontos NORs e sua localização variam com a gravidade da lesão; onde se observam pontos ligeiramente centrais, arredondados, em quantidade de até quatro e menores que o nucléolo em células normais. Entretanto em células onde se observam alterações morfológicas de pré-malignidade e malignidade os pontos variam em número, e localização no interior do núcleo (Fig 4).

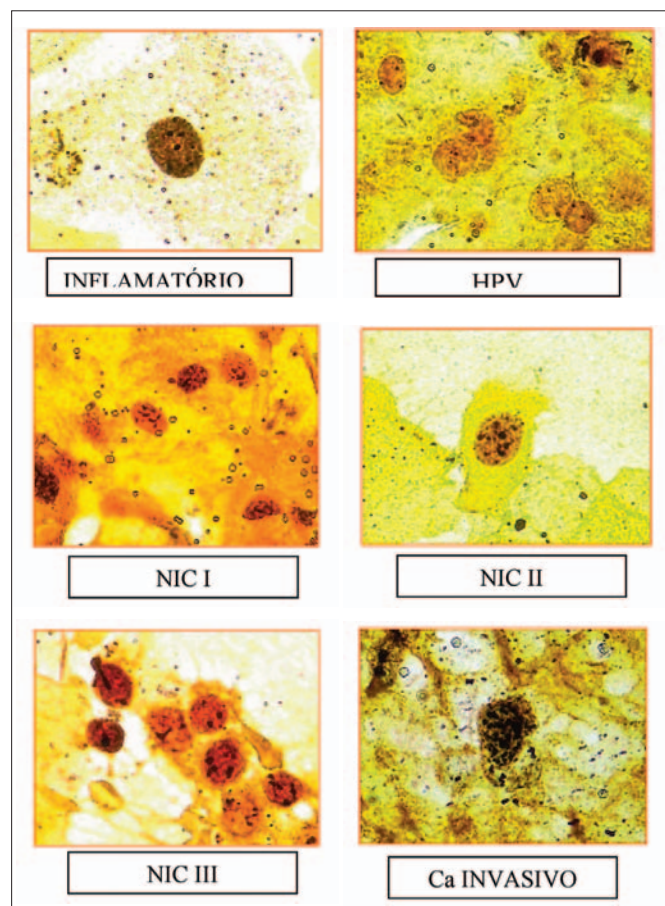


Figura 4: Amostras citológicas de epitélio cervical uterino corado pela prata. O número de pontos AgNOR corados em marrom café em número crescente conforme a gravidade da lesão.

Correlação Entre Número de AgNOR e Resultados Citológicos

Apresenta-se na figura 5 os resultados obtidos através da média do número de AgNORs em relação à classificação citológica. Observa-se uma tendência crescente do número de pontos conforme a gravidade da lesão, mostrando acentuado índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Citológico (Coeficiente de Spearman $r = 0,8468$).

Correlação Entre Número de AgNOR e Resultados Histológicos

Na figura 6 são apresentados os resultados obtidos através da média do número de AgNORs em relação à classificação histológica. Nesta associação também se observa uma tendência crescente do número de pontos conforme a gravidade da lesão, mostrando acentuado índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Histológico (Coeficiente de Spearman $r = 0,8441$).

lação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Histológico (Coeficiente de Spearman $r = 0,8441$).

Índice de Variação do Número de AgNOR no Diagnóstico Citológico e Histológico

Todos os casos estudados pelo método de AgNOR, tiveram seus pontos contados analisados estatisticamente entre os diferentes graus de lesão pelo Teste não paramétrico de Mann-Whitney, obtendo-se os dados conforme tabelas 1 e 2. No diagnóstico citológico encontramos diferenças significativas entre ASCUS e NIC I; NIC I e NIC II; NIC III e carcinoma escamoso invasivo, para $p < 0,05$.

No diagnóstico histológico encontramos diferenças significativas entre HPV e NIC I; NIC I e NIC II; NIC II e NIC III, para $p < 0,05$.

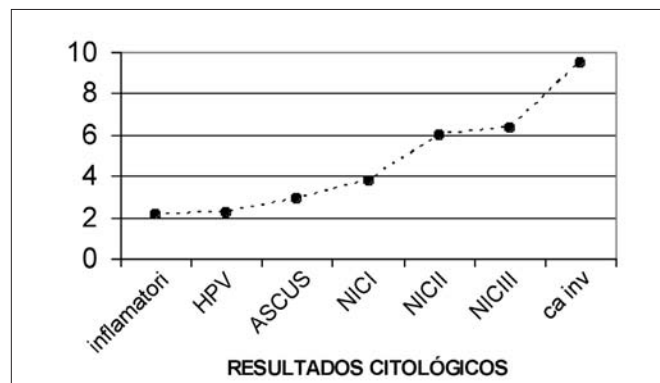


Figura 5: Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação citológica segundo classificação de Richart e Sistema Bethesda, valor de $n=85$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman $r = 0,8468$.

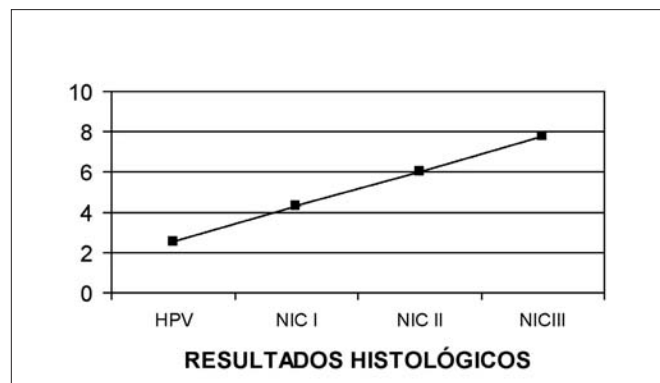


Figura 6: Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação histológica, valor de $n=48$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman $r = 0,8441$.

TABELA I

Número de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão Segundo a Classificação de Richart e Sistema Bethesda estabelecidos em Citologia Cérvico Vaginal. Valores de "p": $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

classe	inflamatório	HPV	ASCUS	NIC I	NIC II	NIC III	Ca invasivo
N	16	10	14	17	11	13	4
X ± SE	2,15±0,17	2,26±0,19	2,88±0,25	3,74±0,24	5,97±0,40	6,31±0,43	9,47±0,69
Mínimo	1,00	1,25	1,00	2,30	3,00	4,20	7,90
Máximo	3,20	3,30	4,00	6,20	7,80	9,50	11,20
Val de p	0,736	0,084	0,04*	0,0003***	0,60	0,0059**	

Valores de "p": $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

TABELA II
Número de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão nas diferentes classificações histológicas. Valores de "p": p < 0,05 (*), p < 0,01 () e p < 0,001 (***).**

classe	HPV	NIC I	NIC II	NIC III
N	16	12	12	7
X ± SE	2,59±0,19	4,39±0,38	6,02±0,36	7,74±0,59
Mínimo	1,25	2,00	4,20	5,20
Máximo	4,20	6,45	7,80	9,80
Val de p	0,0004 ***	0,0056 **	0,0221 *	

Valores de "p": p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) e p < 0,001 (***).

DISCUSSÃO

A realização do exame citopatológico tem sido reconhecida mundialmente como uma estratégia segura e eficiente para a detecção precoce da maioria dos casos de câncer do colo do útero. Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS, chega-se a reduzir em 80% os casos de câncer de colo uterino quando o diagnóstico é realizado dentro dos padrões de qualidade (BRASIL, 2003).

Entretanto, alguns casos são de difícil conclusão e necessitam de acompanhamento e realização de novos exames citológicos, em intervalo de tempo que variam conforme a gravidade (INCA, 2002), com isso, dificultando o tratamento e muitas vezes a perda da paciente. Desta forma, apesar dos procedimentos padrão serem executados de maneira efetiva, dificuldades diagnósticas são relatadas, e para estes casos o emprego de outras técnicas auxiliares é indispensável. Atualmente, vários trabalhos descrevem o emprego da técnica de AgNOR e sua aplicação em morfometria quantitativa, como método auxiliar na distinção entre células benignas e malignas, em diversos tecidos (MAKINEN, *et al.*, 1993; KRUGER, *et al.*, 2000).

Nesta pesquisa observou-se variação no número de AgNOR, demonstrando alteração significativa deste parâmetro de acordo com a avaliação citológica das pacientes. O número de AgNOR variou consideravelmente nos diferentes níveis de alteração cervical. Nos casos normais e/ou inflamatórios encontrou-se valores médios de número de 2,1; em HPV o número médio foi de 2,2; para ASCUS valores número médio foi de 2,8; enquanto que em NIC I (LSIL) o número médio foi de 3,7; em NIC II (HSIL) o número médio foi de 5,9; em NIC III (HSIL) o número médio foi de 6,3 e em carcinoma número médio foi de 9,4.

Verificou-se nesta pesquisa que o número de AgNOR nas pacientes diagnosticadas como inflamatório, que constitui o nosso grupo controle, abaixo de 4 pontos como refere à literatura, os quais são considerados como normais (SAKAI, *et al.*, 2001).

Nas pacientes que apresentaram alterações citológicas compatíveis para o vírus HPV, embora sem alterações citológicas características para NIC I, como aumento relação núcleo/citoplasma, hiper cromasia, alteração de cromatina entre outros, mostrou um discreto aumento do número de AgNOR (Figura 4), em relação ao grupo controle, sem diferenças significativas; demonstrando que a invasão celular pelo vírus que ainda/ou que não apresentou alterações celulares não faculta um aumento de atividade celular, sugerindo que esta invasão celular possa ser eliminada ou tornar-se possivelmente latente. Observa-se assim, que a presença do vírus HPV não necessariamente determina que a paciente venha a desenvolver uma displasia. Para que isto venha a ocorrer é necessário à presença de vários fatores concomitante como: presença de vírus altamente

oncogênico, alta carga viral, baixa imunidade da paciente, e principalmente a presença de áreas metaplásicas que favorecem a invasão do vírus, propiciando assim o desenvolvimento das displasias. Segundo EIFEL & LEVENBACK (2005), a infecção por HPV é frequentemente transitória, e a história da infecção pelo vírus HPV não foi ainda completamente compreendida.

A alteração dos AgNORs no ASCUS, (figura 4) quando comparados com os inflamatórios mostram que as discretas diferenças, no número indicam que a célula está reativa. A diferença entre o número de AgNOR dos casos de ASCUS e NIC I foi considerada significativa (tabela 1), demonstrando que ASCUS apesar de apresentar uma atividade celular mais intensa não qualifica suas células como uma lesão incipiente pré-maligna. Portanto considera-se ASCUS como classificação de difícil diagnóstico e prognóstico como refere à literatura, onde estas devem ser acompanhadas clínica e laboratorialmente (MORIN, 2000).

Em nosso trabalho nos casos de lesão de baixo grau (NIC I) observou-se um valor mais elevado no número de AgNOR que o grupo controle (normal/inflamatório discreto). CALORE e colaboradores (1997) encontraram diferença entre os graus de displasia, embora não tenha encontrado diferenças entre cervicite e NIC I. No entanto os autores referidos trabalharam com cortes histológicos e as análises deste trabalho foram realizadas em esfregaços citológicos.

Encontramos nesta pesquisa, uma diferença extremamente significativa entre os valores de número de AgNOR entre NIC I e NIC II (tabela 1). No entanto, ROWLANDS (1988), não encontrou diferenças significantes no número de AgNOR entre NIC I e NIC II, e encontrou diferenças significantes entre NIC II e NIC III, em corte histológico. Em nosso trabalho, os casos de lesão de alto grau, mostram valores mais expressivos, entretanto, a diferença do número de AgNOR entre os diagnósticos de NIC II e NIC III não são significantes, (tabela 1). A não significância observada entre os diagnósticos NIC II e NIC III favorecem realmente a unificação destas duas classificações em HSIL como ocorre na classificação de Bethesda. E NIC I em LSIL segundo Bethesda em um grau isolado.

Contudo os valores observados nas lesões para carcinoma escamoso invasivo são extremamente elevados em relação a número de AgNOR se comparados com os observados nos casos de lesão de alto grau. Esses dados são correspondentes com os da literatura que expressam valores de número de AgNOR crescentes de acordo com a gravidade da lesão (EGAN, *et al.*, 1988; EGAN, *et al.*, 1990).

Outros dados também são relatados, onde segundo YOKOYAMA e colaboradores (1990) e SAKAI (2001), os pontos de AgNOR são significativamente mais elevados nos casos de lesão de alto grau quando comparados com pacientes normais e refere que nos casos de displasia que progrediram os pontos são significativamente mais elevados que os casos que regrediram.

Os valores apresentados para o número AgNOR, em todos os casos analisados, refletem uma tendência progressiva desse parâmetro, demonstrando ser esta Técnica um método válido e útil como auxílio diagnóstico, nas lesões de colo uterino. Em uma segunda análise reorganizamos os dados das pacientes, de acordo com o resultado histológico, preconizando como diagnóstico de certeza. Verificamos que o número dos pontos AgNOR em material citológico aumenta de maneira crescente a produzir uma reta linear, onde o maior número de pontos são observados nos casos de lesão de maior gravidade, segundo diagnóstico histológico. Estes resultados podem ser observados nas figura 6.

Verifica-se que os pontos de número de AgNOR em pacientes com resultados de HPV pela histologia (Tabela 2) correspondem aos mesmos dados observados nos casos de pacientes de HPV pela citologia, onde o número de AgNOR não se apresenta elevado, sugerindo que não há uma desestruturação a nível celular com aumento da atividade celular, mas somente uma invasão da célula pelo vírus que subseqüentemente pode ser eliminado ou tornar-se latente sem provocar doença.

Segundo PLOTON *et al.*, (1984); GIRI *et al.*, (1989); DERENZINI *et al.*, (1990), DONG (1997) a relação entre atividade proliferativa celular e AgNOR, é assim demonstrada através dos pontos AgNOR, sendo portanto esta técnica útil como uma chave da atividade celular e seu controle.

Observa-se (Tabela 2) que em pacientes diagnosticadas como NIC I pela histologia, onde se tem material celular com alterações significativas e, portanto maior atividade celular o número de pontos de AgNOR supera o valor para células normais que é de 4 pontos, segundo literatura e, considerado extremamente significante quando comparados com os casos HPV e muito significantes quando comparados com NIC II (tabela 2).

Nos pacientes diagnosticados como NIC III pela histologia, observa-se valores elevados para o número de AgNOR. Estes valores são significantes quando comparados com NIC II (Tabelas 2), estes dados estão condizentes com os achados de ROWLANDS (1988) em corte histológico.

Portanto o uso adicional deste método seria de valia no estudo de lesões pré-malignas cervicais, pois de acordo com o Primeiro Consenso Brasileiro de HPV (2000), marcadores como o de AgNOR estão sendo estudados para sinalizar a tendência evolutiva das lesões neoplásicas intra-epiteliais (CARVALHO & OYAKAWA, 2000).

Segundo CALORE *et al.*, (1997); ROCHER (2002), significativas diferenças são encontradas em epitélio escamosos normais, inflamatórios e cada grau de displasia, onde concluiu que a técnica de AgNOR pode ser útil na distinção de lesões mais agressivas. O mesmo comportamento nós observamos nessa pesquisa em material citológico. Portanto, esta técnica pode ser empregada na histologia e citologia cervical onde a contagem de AgNORs é útil para diferenciar graus de displasia em esfregaços vaginais. Diante destes dados sugerimos que, se após minuciosa análise do material cervical uterino, através da técnica citológica, a conclusão diagnóstica for duvidosa, pode-se empregar a técnica de AgNOR como método auxiliar mais objetivo.

A técnica de AgNOR é técnica de citologia básica, que em décadas anteriores foi bastante empregada em material histológico, atualmente vem sendo aprimorada e emprega também em outros tecidos. Neste trabalho foi aplicada em esfregaços citológicos cervicais, o que pode abrir possibilidades para sua aplicação em laboratórios de rotina, pela facilidade na obtenção da amostra e pelo baixo custo do experimento. Atualmente, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de melhorar a acurácia do exame citopatológico, destacando-se entre elas a citologia em meio líquido ou citologia em camada delgada, que diminui a sobreposição celular, obtendo-se uma amostra mais uniforme, facilitando o emprego de outras técnicas diagnósticas (EIFEL & LEVENBACK, 2005).

Maiores estudos nessa área são necessários, para melhor otimizar a técnica de AgNOR, e no momento estamos desenvolvendo em nosso laboratório um programa para dimensionar os pontos de AgNOR.

CONCLUSÃO

A Técnica de AgNOR em material citológico do epitélio cervical uterino mostrou índices de correlação positiva, associadas às metodologias de Diagnóstico Citológico e Diagnóstico Histológico. Considerando-se a progressão das lesões, demonstrou ser útil na diferenciação entre:

Diagnóstico Citológico

ASCUS e NIC I; NIC I e NIC II; NIC III e carcinoma escamoso invasivo.

Diagnóstico Histológico

HPV e NIC I; NIC I e NIC II; NIC II e NIC III.

Portanto, conclui-se que a Técnica de AgNOR é eficiente, e que apresenta resultados que propicia uma melhor análise do material cervical uterino e que pode ser empregada com maior ênfase naqueles casos onde os demais exames possam gerar dúvidas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro, 2003.
- CALORE, E. E.; SHIRATA, N. K.; SHIH, L. W.; CAVALIERE, M. J.; DE SIQUEIRA, M. Silver staining method for nucleolar organizer regions in cervical smears. *Diagnostic Cytopathology*, 16(6): 497-499, 1997.
- CARNEIRO, S. S.; MOREIRA, M. A. R.; ALMEIDA NETTO, J. C. HPV e câncer do colo uterino. *Revista de Patologia Tropical*, 33(1): 01-20, 2004.
- CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. I Consenso Brasileiro de HPV. 1 ed. BG Cultural. São Paulo, 2000.
- CORTES-GUTIERREZ, E. I.; LEAL-ELIZONDO, E.; CERDA-FLORES, R. M.; LEAL GARZA, C. H. Polymorphism of AgNORs in cervical smears from women with cervical cancer. *Anal Quant Cytol Histol*. 23(1): 9-14, 2001.
- CROCKER, J.; EGAN, M. J. Correlation between NOR sizes and numbers in on Hodgkins lymphomas. *J.Pathol.*, 156: 23-29, 1988.
- DERENZINI, M. The AgNORs. *Micron*, 31: 117-120, 2000.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERÉ, D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in câncer cells. *Lab Invest.*, 63(1): 137-140, 1990.
- DONG, D. Morphometric determination of AgNORs in ovarian cancer cells. *Bronx High Scholl of Science*. 1997. Disponível em [http:// oak.cc.conno-coll.edu/~ddon/bion.htm](http://oak.cc.conno-coll.edu/~ddon/bion.htm). Acesso em: 07 de novembro de 2003.
- EGAN, M.; FREETH, M.; CROCKER, J. Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervical and the size and number of nucleolar organizer regions. *Gynecol Oncol*, 36: 30-33, 1990.
- EGAN, M.J.; RAAFAT F.; CROCKER, J.; SMITH, K. Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. *J. Clin. Pathol.*, 41: 31-33, 1988.
- EGAN, M.J.; CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J.Pathol*, 154: 247-253, 1988.
- EIFEL, P.; LEVENBACK, C. Câncer do trato genital inferior feminino. *Revinter*. Rio de Janeiro. 2005.
- FILIPPIN, C.; FELIPE, L. M. B.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Estudos sobre a variação interobservadores em citologia cérvico-vaginal. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 32(4): 239-242, 2000.
- GIRI, D. D.; NOTTINGHAM, J. F.; LAWRY, J.; DUNGAS, S. A.; UNDERWOOD, J. C. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J. Pathol.*, 157: 307-313, 1989.
- GOMPEL, C.; KOSS, L. Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas. Manole. São Paulo, 1997.
- HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins with RNA-r transcribed from oocyte chromosomes. *Chormossoma*, 62: 361-367, 1982.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experimentia*, 62:

- 361-367, 1982.
- INCA-Instituto Nacional do Câncer. Periodicidade de realização do exame preventivo do câncer de colo uterino. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(1): 13-15, 2002.
- KRUGER, S.; STAHLHUT, M.; MULLER, H. Cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol.*, 22(5): 358-363, 2000.
- MAKINEN, K.; ESKELINEM, M.; LIPPONEN P.; NUUTINEN, P.; MARIN, S.; ALHAVA, E. Ag-NORs related to flow cytometry, morphometry and prognosis in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res.*, 13(1): 157-160, 1993.
- MORIN, C.; BAIRAT, I.; BOUCHARD, C.; FORTIER, M.; ROY, M.; MOORE, L.; MEISEL, A. Cytologic Predictors of cervical intraepithelial neoplasia in women with an ASCUS pap smear. *Acta Cytol.*, 44(4), 2000.
- NEVILLE, D. W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C. M. *Patologia epithelial in Patologia oral & maxilofacial*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1998.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNETT, J. J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.*, 18: 5-14, 1986.
- PLOTON, D.; MANEGER, M.; ADNET, J. Simultaneous high resolution localization of Ag-NOR proteins and nucleoproteins in interphase and mitotic nuclei. *Histochem J.*, 16: 897-906, 1984.
- REEVES, B. R.; CASEY, G.; HARRIS, H. Variations in the activity of nucleolar organizer in different tissues, demons by silver staining of human normal and leukemic cells cancer gent. *Cytogenet.*, 6: 223-230, 1982.
- ROWLANDS, D. C. Nucleolar organizing regions in cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol.*, 41: 1200-1202, 1988.
- SAKAI, Y. I.; SAKAI, A. T.; ISOTANI, S.; CAVALIERI, M. J., DE ALMEIDA, L. V.; CALORE, E. E. Morphometric evaluation of nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Res. Pract.*, 197: 189-192, 2001.
- SOOMRO, I.; PATEL, N.; WHIMSTER, W. F. Distribution and estimation of nucleolar organizer regions in various human lung tumours. *Pathol. Res. Pract.*, 187: 6872, 1991.
- VIDAL, B. C.; PLANDING, W.; MELLO, M. L.; SCHENCK, U. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high-resolution image cytometry. *Anal Cell Pathol*, 7(1): 27-41, 1994.
- YOKOYAMA, Y., SEDAR, D.; NIWA, K.; TAMAYA, T.; Nucleolar organizer regions in malignant transformations of uterine cervix. *Gynecol oncol.*, 39: 309-313, 1990.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Cidônia de Lourdes Vituri
Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Catarina.
88010-970 Florianópolis, Santa Catarina, Brasil
Fax (048) 331 95 42
E-mail: cids@ccs.ufsc.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Diagnóstico laboratorial das micobactérias isoladas na urina: comparação entre métodos convencionais e a reação em cadeia da polimerase (PCR)

Laboratorial diagnosis of the micobacterias isolated in the urine: comparison between conventional methods and the polymerase chain reaction (PCR)

Antonio Jorge Alves de Lima¹, Cristiane Cunha Frota², José Gomes Bezerra Filho³ & José Luciano Bezerra Moreira⁴.

RESUMO - O aumento da incidência de tuberculose no mundo induziu a utilização da PCR nesse trabalho, para o diagnóstico das micobacterioses nas vias urinárias. Procurando estabelecer um protocolo de PCR e comparar os resultados achados com os métodos convencionais.

Após a realização de 886 baciloscopias em urinas de 176 pacientes com suspeita de tuberculose renal, essas urinas descontaminadas foram semeadas em Löwestein-Jensen. Foram também reunidas em 528 "pools" para realizar PCR, com "primers" para *Mycobacterium sp.* e para o complexo *M. tuberculosis*.

A sensibilidade da PCR, usando a cultura como padrão-ouro, foi 90,9% e a especificidade 87,9%. Usando a baciloscopia como padrão-ouro, a sensibilidade foi de 84,0% e a especificidade foi 94,0%.

Realizadas as comparações do que foi obtido com os resultados citados na literatura, pode-se observar uma boa relação com estes e que a PCR tem um bom desempenho ante outros métodos.

A PCR tem um desempenho comparável aos métodos de diagnóstico das micobactérias, superando a cultura por obter resultados em algumas horas, permitindo rapidamente a identificação e tratamento dos indivíduos portadores dos bacilos.

PALAVRAS-CHAVE - Micobactérias; Reação em Cadeia da Polimerase; Cultura.

SUMMARY - The increased incidence of tuberculosis in the world led to performance of the PCR techniques in this study to diagnose of the micobactérias and trying to establish a protocol of PCR and comparing the results found with the conventional methods.

The study was performed with 886 urine samples from 176 patients. 886 bacilloscopies and cultures were taken, as well as 538 PCR with specific primers for *Mycobacterium sp.* and *M. tuberculosis*, as the 886 samples were divided into 528 "pools".

The sensitivity of the PCR using the culture as a gold standard was 90.9% with specificity of 87.9%. Using bacilloscopy as a gold standard, sensibility was 84.0% and specificity 94.0%. The PCR provided an incidence of 90.0% of atypical micobacteria in renal tuberculosis.

Accomplished to the comparisons of the results obtained with mentioned it in the literature a good relationship can be observed with the same ones and that PCR has a good one carry out front to the methods to the which it was compared.

The PCR has a performance comparable to that of culture and bacilloscopy in the diagnosis of renal tuberculosis, exceeding cultures in expediency, the result being obtained in just a few hours, allowing rapid identification and treatment of individual carriers of the bacillus.

KEYWORDS - Tuberculosis, renal; Polymerase Chain Reaction; Culture.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença milenar, responsável por milhares de mortes ao longo do tempo no mundo todo, principalmente entre as populações menos favorecidas. Recentemente, a doença se expandiu em consequência da AIDS e ao surgimento de cepas de *Mycobacterium* resistentes a múltiplas drogas (COLE & TALENTI, 1995). O *Mycobacterium* é transmitido através de aerossóis respiratórios, instalando-se inicialmente nos pulmões, para depois se disseminar por via hematogênea para qualquer órgão, assim podendo chegar aos rins, que é um dos órgãos extrapulmonares mais afetados (AFIUNE, 1996).

No caso da tuberculose renal, o diagnóstico é difícil de ser realizado em virtude da eliminação de poucos bacilos, induzindo a uma baixa eficiência da pesquisa de bacilos álcool ácido-resistentes e pela demora que se tem quando se utiliza a cultura - em torno de 6 a 8 semanas (KONEMAN *et al.*, 2001).

Este diagnóstico pode ser altamente satisfatório se realizado pela técnica de reação em cadeia da polimerase, pois,

além de alta sensibilidade e especificidade, é capaz de produzir resultado em poucas horas (BOLLELA *et al.*, 1999).

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

Foram coletadas 886 amostras de 176 pacientes com suspeita de tuberculose renal, procedentes do Hospital Universitário Dr. Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, durante o ano de 2001.

Procedimentos preliminares com as urinas

Foram realizadas baciloscopia em todas as amostras de urina, pelo método de Ziehl-Neelsen e, em seguida, as urinas foram descontaminadas pela técnica do hidróxido de sódio a 4,0%, sendo logo depois semeadas em Löwestein-Jensen e incubadas a 37°C. O restante do material foi armazenado -20°C.

Extração do DNA

As amostras foram descongeladas naturalmente e em seguida centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos suspensos em 1mL de tampão fosfato pH 6,8. Os tubos foram agitados

Recebido em 20/07/2005

Aprovado em 09/03/2006

Trabalho desenvolvido no Departamento de Patologia e Medicinal Legal- Universidade Federal do Ceará.

Mestre¹, doutores, docentes^{2,3 e 4}.

e em seguida centrifugados a 12.600 rpm por 5 minutos. Novamente os sobrenadantes foram desprezados e em seguida foi adicionado 1mL de Tris EDTA-Triton x -100 (TE constituído com 1% de Trinton x-100). As amostras foram mais uma vez centrifugadas a 12.600 rpm por 5 minutos, e novamente os sobrenadantes foram desprezados e em seguida 150µL de TE-Triton x -100 foi adicionado aos sedimentos e aquecidos a 100°C por 30 minutos.

Após os trinta minutos de fervura, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente para esfriar naturalmente, sendo logo em seguida centrifugadas por 3 minutos a 12.600 rpm. Os sobrenadantes foram armazenados a 4,0°C. (CLARRIDGE III *et al.*; NOLTE *et al.*, 1993).

Amplificação do DNA

Parte das amostras foram combinadas formando "pools", contendo no máximo 5 amostras, sendo todas do mesmo paciente e totalizando 528 "pools". Os "pools" foram submetidos a amplificação com iniciadores específicos do complexo *M. tuberculosis* e iniciadores para o gênero *Mycobacterium*.

A amplificação do DNA foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (ROTH *et al.*, 2000), segundo o quadro 1.

	Volume (µL)
Tampão (10x) 15mM MgCl ₂	2,50
DNTP (5,0mM/µL)	2,00
Dimetil Sulfoxido (DMSO)	1,25
Primer Up (7,5 µM/L)	1,00
Primer Down (7,5 µM/L)	1,000
Água destilada esteril	6,75
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,50
Amostra de DNA	10,00
Volume final (µL)	25,00

QUADRO 1- Protocolo utilizado para amplificação do DNA de micobactérias.

O material amplificado foi armazenado a 4°C por até 24 horas para efetuar a eletroforese.

Amplificação do DNA empregando iniciadores para o gênero *Mycobacterium* sp.

Os "primers" utilizados para amplificação do DNA de *Mycobacterium* sp. foram "primers" que amplificam a região intergênica 16S-23S rRNA (ROTH *et al.*, 2000) de fabricação da IN VITROGEN, que originam um produto de 221 pares de bases.

- Primer forward (up): 5' – ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC – 3', com uma concentração de estoque de 100 pM, sendo diluído para uso na reação para 10 pM;

- Primer reverse (low): 5' - GAT GCT CGC AAC CAC TAT CCA – 3', com uma concentração de estoque de 100 pM, sendo diluído para 10 pM para ser usado na reação (ROTH *et al.*, 2000).

O termociclador foi programado para realizar amplificação do DNA de *Mycobacterium* sp. segundo o quadro 2.

	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96	5,0 minutos	-
Desnaturação	94	1,0 minuto	38
Anelamento	59	1,0 minuto	38
Extensão	72	1,0 minuto	38
Extensão final	72	15 minutos	-
Final da reação	4,0	∞	-

QUADRO 2 - Condições da Reação de amplificação do DNA do *Mycobacterium*.

É importante salientar que a cada partida de reação de amplificação do DNA os controles positivo (*M. tuberculosis* H37RV) e negativo foram incluídos.

Amplificação do DNA empregando iniciadores que amplificam o complexo *M. tuberculosis*.

Os "primers" utilizados para a identificação do complexo *M. tuberculosis* foram IS6110 produzidos pela Oswel DNA Service, os quais amplificam um produto de 179 pares de bases.

Primer forward (up): 5' – GAG CGG GCG GTG CGG ATG GTC - 3', com uma concentração de estoque de 58,79 µM/L, sendo diluído para uma concentração final de 7,5 µM/L; Primer reverse (low): 5' – TCA GCG GAT TCT TCG GTC GTG GTC - 3', com uma concentração de estoque de 33,99 µM/L, sendo diluído para uma concentração final de 7,5 µM/L. (SAMBROOK, 1989).

O termociclador foi programado para realizar amplificação do DNA de *M. tuberculosis* segundo o quadro 3.

	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	2,0 minutos	-
Desnaturação	94	30 segundos	25
Anelamento	63,4	30 segundos	25
Extensão	72	30 segundos	25
Extensão final	72	15 minutos	-
Final da reação	4,0	∞	-

QUADRO 3- Condições da reação de amplificação do DNA do *M. tuberculosis*.

Foi preparado gel de agarose a 1,2% contendo 2,5µL de brometo de etídio (10mg/mL), que permite a visualização do DNA na luz ultravioleta. O gel foi colocado na cuba eletroforética e imerso em tampão TBE 1 x .

O produto da PCR (6µL da amostra) foi preparado para corrida eletroforética em um tubo de 0,5mL de capacidade, colocando 7µL de água destilada e 3µL de tampão de carregamento. As amostras, assim preparadas foram depositadas nos orifícios do gel de agarose e em seguida foi adicionado 2,5µL de brometo de etídio no TBE 1 x. A corrida eletroforética foi realizada a 50 volts por 2 a 3 horas. A visualização das bandas foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (FARAH, 1997; COUSISNS *et al.*; 1992).

Nested-PCR

Todas as amostras negativas foram submetidas a uma re-amplificação em Nested - PCR, que visa a aumentar a eficiência da PCR. (HIRATA *et al.*, 1997).

RESULTADOS

Os cálculos dos resultados foram feitos com base nos "pools" e por pacientes com a finalidade de obtenção das prevalências e das medidas de validação (sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e índice de concordância) e estes resultados podem ser vistos nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

TABELA I

Sinopse dos resultados das prevalências obtidas com 528 "pools" e 176 pacientes com suspeita de tuberculose renal do Hospital Universitário Dr. Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, usando baciloscopia, cultura para BK e PCR com meio de diagnóstico.

Testes	Culturas para <i>Mycobacterium</i> sp.				Baciloskopias				PCR			
	"Pools"		Pacientes		"Pools"		Pacientes		"Pools"		Pacientes	
Resultados	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Positivos	13	2,5	11	6,2	36	6,8	25	14,2	47	8,9	30	17,0
Negativos	515	97,5	165	93,8	492	93,2	151	85,8	481	91,1	146	83,0
total	528	100,0	176	100,0	528	100,0	176	100,0	528	100,0	176	100,0

TABELA II

Resumo dos resultados da comparação entre a PCR, BAAR e cultura de urina de 176 pacientes do Hospital Universitário Dr. Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará em 2001.

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	K
BAAR X PCR					
Por paciente	84,0	94,0	70,0	97,3	0,72
Por "pool"	80,5	96,3	61,7	98,5	0,67
Cultura X PCR					
Por paciente	90,9	87,8	33,3	99,3	0,43
Por "pool"	84,6	93,0	23,4	99,6	0,36
BAAR e/ou Cultura X PCR					
Por paciente	84,4	97,9	90,0	96,6	0,84
Por "pool"	78,6	97,1	70,2	98,1	0,73

- VPP= Valor preditivo positivo - K= Kappa= índice de concordância.
- VPN= Valor preditivo negativo - Os padrões-ouro sublinhados
- BAAR= Pesquisa de Bacilos Ácido-Resistentes

TABELA III

Resultados obtidos para espécie *M. tuberculosis* em relação à amostra de 176 pacientes do Hospital Universitário Dr. Walter Cantídio da Universidade Federal Ceará em 2001 e sua representatividade na amostra de 30 pacientes positivos para o gênero *Mycobacterium*, usando a PCR como teste de identificação.

	<i>M. tuberculosis</i> (em relação ao total de pacientes)		<i>M. tuberculosis</i> (em relação ao total de pacientes positivos para <i>Mycobacterium</i> sp)	
	nº	%	nº	%
Positivos	03	1,7	03	10,0
Negativos	173	98,3	27	90,0
Total	176	100,0	30	100,0

DISCUSSÃO

A PCR apresenta variações de sensibilidade e especificidade dependentes de alguns fatores, tais como: material clínico; tipo de iniciadores; padrão-ouro usado; pacientes analisados; uso de nested-PCR ou não; método de preparação das amostras; método de detecção do produto amplificado; eliminação de inibidores etc. (KRITSKI & MELO, 1997). Sabendo-se destes fatores, são analisados os resultados encontrados no presente trabalho:

Nas análises dos resultados da baciloscopia, cultura e PCR por "pools", a maior positividade foi encontrada na PCR com 47 (8,9%), seguida da baciloscopia com 36 (6,8%) e por último a cultura com 13 (2,5%) de um total de 528 "pools", sendo os resultados com pacientes os seguintes: 30 (17,0%) com PCR seguido de 25 (14,2%) com baciloskopias e, finalmente, 11 (6,3%) com culturas, de um total de 176 pacientes. Estes resultados não eram esperados, pois segundo Koneman *et al.* (2001), Leite (1997) e Kronbauer *et al.* (1996), a cultura é um método mais sensível para o diagnóstico de micobactérias.

Confrontando a baciloscopia e PCR, usando a 1ª como padrão-ouro, foram obtidas: sensibilidade=80,5%; especificidade=96,3%; VPP= 61,7%; VPN= 98,5% e K=0,67 através de "pools" e por paciente sensibilidade=84,0%; especificidade=94,0%; VPP=70,0%; VPN=97,3% e k=0,72, mostrando que os testes têm uma boa concordância vista pelos k=0,67 e k=0,72 (PEREIRA, 1995) dos "pools" e pacientes respectivamente sendo a sensibilidade e especificidade compatível aos citados por Campos (1991) sensibilidade e especificidade de $\pm 80\%$.

Foram encontrados 7 casos de PCR falso-negativos nos "pools" e 4 com os pacientes e 18 e 9 casos de PCR falso-positivos, respectivamente, nos "pools" e pacientes.

Os casos falso-positivos da PCR em relação à baciloscopia, podem ser explicados pelo baixo número de bactérias presentes nas amostras (WOLINSKY, 1994), o que inviabiliza seu achado ao microscópio.

Os casos falso-negativos da PCR em relação à baciloscopia podem ser justificados pelo fato de a baciloscopia mostrar apenas a forma e a cor da bactéria, não afirmando que tal microrganismo é micobactéria, podendo ser, por exemplo, uma *Nocardia* ou *Legionella micdadei* (NOLTE & METCHOCK, 1995;).

Comparando-se a cultura e a PCR, utilizando a cultura como padrão-ouro foram obtidos para os "pools: sensibilidade=84,6%; especificidade= 93,0%; VPP=23,4%; VPN=99,6% e k=0,36 e com pacientes: sensibilidade=90,9%; especificidade=87,9%; VPP=33,3%; VPN=99,3% e k=0,43 mostrando que os dois testes têm uma concordância sofrível com os "pools" e regular considerando-se os pacientes de acordo com Pereira (1995), através dos k. Os valores obtidos, de sensibilidade e especificidade, concordam com Kritski & Melo (1996), que relatam 61,0% a 88,0% de sensibilidade e de 92,0% a 100,0% de especificidade para PCR com iniciadores 16SrRNA. Também, o VPN da PCR encontrado neste trabalho está compatível com os valores encontrados por Abe *et al.* (1993) VPN= 94,2 e Carttuyvels *et al.* (1996) que relatam VPN de 98,7%, já o VPP para a PCR deste trabalho difere do achado por Abe *et al.* (1993), pois eles citam VPP=81,3% e Carttuyvels *et al.* (1996) que mencionam VPP=52,0%. Nota-se uma boa performance da PCR em relação à cultura, embora os valores de VPP e k tenham sido baixos.

Foram encontrados 36 casos de PCR falso-positivos nos

“pools” e 20 com pacientes. Os falso-negativos foram 13 nos “pools” e 1 com paciente.

Os casos falso-positivos da PCR em relação à cultura podem ser explicados pela maior sensibilidade da PCR (KRITSKI & MELO, 1996) e pelos seguintes fatores: o meio Lowenstein-Jensen é menos eficaz para cultivar micobactérias atípicas do que os outros meios para micobactérias (NOLTE e METCHOCK, 1995). A cultura foi processada objetivando o crescimento de *M. tuberculosis*, portanto não sendo incubada nas diversas temperaturas que diferentes espécies de micobactéria exigem para um melhor crescimento (KONEMAN *et al.*, 2001); o processo de descontaminação pode ter matado as bactérias, tornando a cultura inviável, porém seu DNA pode ter ficado intacto para ser amplificado; e ainda a necessidade de um número relativamente alto de bactérias nas amostras para ocorrer crescimento bacteriano, 5 a 10 bactérias por mL, quando teoricamente a PCR necessita de apenas um fragmento do genoma de micobactéria para que a amplificação do DNA aconteça. (KRONBAUER *et al.*, 1996; ROSEMBERG, 1993) Os falso-negativos da PCR em relação à cultura podem ter ocorrido por uma destruição do DNA durante a fase de extração ou na fase de descontaminação das amostras, sendo pouco significativo em relação ao paciente, pois ocorreu somente um caso.

Relacionando agora a PCR com os dois testes, cultura e/ou baciloscopia como padrão-ouro para aumentar o poder de diagnóstico dos dois frente a PCR foram obtidos os seguintes resultados para os “pools”: sensibilidade=78,6%; especificidade= 97,1%; VPP= 70,2%; VPN=98,1% e k=0,73 e com os pacientes, sensibilidade=84,4%; especificidade=97,7%; VPP=90,0%; VPN=96,6%; e k=0,84, mostrando que a PCR e a união dos dois testes têm uma ótima concordância, demonstradas pelos k dos “pools” e pacientes (PE-REIRA, 1995).

Neste confronto, foram encontrados também 14 casos de PCR falso-positivos nos “pools” e 3 com pacientes. Também foram encontrados 9 casos de PCR falso-negativos dos “pools” e 5 com pacientes, melhorando sensivelmente as medidas de validação da PCR (sensibilidade, especificidade, VPP e VPN).

Em relação à prevalência, observa-se que a PCR e baciloscopia para BK concordam entre si, pois diagnosticaram 30 (17,0%) e 25 (14,4%) *Mycobacterium sp.*, respectivamente; já a cultura discorda dos dois outros testes, pois só diagnosticou 11 (6,3%) *Mycobacterium sp.*

Foram identificados 3 (1,7%) *M. tuberculosis* na amostra de 176 pacientes, discordando de Corigliano & Leedom (1996), ao dizerem que o grande causador da tuberculose geniturinária é *M. tuberculosis*. A prevalência de *M. tuberculosis* em relação ao gênero *Mycobacterium sp.* foi alta (10,0%).

Embora não apareça nos resultados, o “nested” PCR foi empregado eficientemente em muitas amostras, as quais inicialmente foram negativas com PCR e que positiveram com a segunda (nested).

CONCLUSÕES

O resultado do estudo da comparação da PCR com os métodos convencionais, baciloscopia e cultura, empregados no diagnóstico das micobactérias do trato geniturinário proporcionaram as seguintes conclusões:

- maior número de pacientes foi diagnosticado como positivo para micobactéria através de PCR do que por baciloscopia e cultura;

- da PCR em relação à baciloscopia, foram encontradas sensibilidade de 84,0%; especificidade de 94,0%; VPP de 70,0%; VPN de 97,3% e k de 0,72;
- da PCR em relação à cultura, foram encontradas sensibilidade de 91,0%; especificidade de 88,0%; VPP de 33,3%; VPN de 99,3% e k de 0,43;
- da PCR em relação à baciloscopia e/ou cultura foram encontradas sensibilidade de 84,4%; especificidade de 97,7%; VPP de 90,0%; VPN de 96,6% e k de 0,84;
- podem ser usados “pools” para fazer o diagnóstico de micobactérias nas vias urinárias, quando empregando a técnica de PCR, usando número pequeno de amostras em cada “pool” para evitar casos falso-negativos, como observado neste trabalho em que ocorreu a existência de um mesmo paciente com um “pool” positivo e outro negativo;
- incidência de 1,7% de *gxxxxx* em uma população de 176 pacientes;
- noventa por cento das micobactérias encontradas nas vias urinárias são atípicas.

REFERÊNCIAS

1. ABE, C.; HIRANO, H.; WADA, M.; KAZUMI, Y.; TAKAHASHI, M.; FUKASAWA, Y.; YOSHIMURA, T.; MIYAGI, C.; GOTO, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in cal specimens by polymerase chain reaction and gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 12, p. 3270-3274, 1993.
2. AFIONE, J. Tuberculose extrapulmonar. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu, 1996. v. 1, cap. 74.8, p. 942-947.
3. BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev. Saúde Pública*, v. 33, n. 3, p. 281-286, 1999.
4. CAMPOS, H. S. Diagnóstico e tratamento da tuberculose. *Rev. Bras. Clin. Terap.*, v. 20, n. 7, p. 267-282, 1991.
5. CARTUYVELS, R.; DE RIDDER, C.; JONCKHEERE, S.; VERBIST, L.; VAN ELDERE, J. Prospective clinical evaluation of amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a Screening method in a low-prevalence population. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 8, p. 2001-2003, 1996.
6. CLARRIDGE III, J. E.; SHAWAR, R. M.; SHINNICK, T. M. Large-scale use of polymerase reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in routine *Mycobacteriology Laboratory*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 8, p. 2049-2056, 1993.
7. COLE, S. T.; TELENTI, A. Drug resistance in *mycobacterium tuberculosis*. *Eur. Resp. J.*, v. 8, n. 20, p. 701s-713s, 1995.
8. CORIGLIANO, B. E.; LEEDOM, J. M. Renal infections. In: MASSRY, S. G.; GLASSOCK, R. J. Textbook of nephrology. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983. chapt. 46, p. 687-692.
9. COUSINS, D. V. WILTON, S. D.; FRANCIS, B. R.; GOW, B. L. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 1, p. 255-258, 1992.
10. FARAH, S. DNA: segredos & mistérios. São Paulo: Sarvier, 1997. 276p.
11. HIRATA, M. H. MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; LEITE, C. Q. F. Técnica de amplificação de gene para o diagnóstico da tuberculose. *Rev. Cienc. Farm.*, v. 18, n. 1, p. 75-85, 1997.
12. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C. Micobactérias. In: _____. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. cap. 17, p. 903-964.
13. KRITSKI, A. L.; MELO, F. A. Co-infecção *M. tuberculosis*/HIV. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu, 1996. v. 1, cap. 74.9, p. 947-959.
14. KRITSKI, A. L.; CASTELO, A.; MELLO, F. C. Q. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. *J. Pneumol.*, v. 23, n. 1, p. 33-42, 1997.
15. KRONBAUER, A. L.; DIAS, C.; AZEVEDO, P. A. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: revisão dos métodos diagnósticos atuais. *Rev. AMRIGS*, v. 40,

- n. 3, p. 159-165, 1996.
16. LEITE, C. Q.; TELAROLLI JUNIOR, R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. Rev. Cienc. Farm., v. 18, n. 1, p. 17-28, 1997.
17. MOUSSA, O. M., et al. Rapiod diagnosis of genitourinary tuberculosis by Polymerase Chain Reaction and non-radioactive DNA hibridization. J. Urol., v.164, n. 2, p. 584-588, 2000.
18. NOLTE, F. S.; METCHOCK, B.; McGOWAN Jr., J. E. Diret dectetion of mycobacterium tuberculosis in sputum by Polymerase Chain Reaction and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol., v. 31, n. 4, p. 1777-1782, 1993.
19. NOLTE, F. S.; METCHOCK, B. Mycobacterium. In: MURRAY, P. R. et al. Manual of clinical microbiology. 6. ed. Washington, DC.: ASM, 1995. chapt. 31, p. 400-423.
20. PEREIRA, M. G. Aferição dos eventos. In: _____. Epidemiologia: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. cap. 17, p. 258-276.
21. ROSEMBERG, J. Repercussões da biologia molecular na tuberculose. J. Pneumol., v.19, n.1, p. 25-36, 1993.
22. ROTH, A.; REISCHL, U.; STREUBEL, A.; NAUMANN, L.; KROPENSTEDT, R. M. HABICHT, M.; FISCHER, M.; MAUCH, H. Novel diagnostic for identification of micobacteria using genus-specific amplification of the 16S rRNA gene specer and restriction endonucleases. J. Clin. Microbiol., v. 38, n. 3, p. 1094-1104, 2000.
23. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory manual. 2. Ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989. v. 1 cap.6, p.6.3-6.2.
24. WOLINSKY, E. Conventional diagnostic methods tuberculosis. Clin. Infec. Dis., v. 9, n. 3, p. 396- 401, 1994.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Antonio Jorge Alves de Lima

Fone-Fax: (085)3292-0655.

E-mail: ajorgelima@oul.com.br e ajal@terra.com.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria

Prevalence of the microorganisms in urinary tract infections of patients attended in the Hospital Universitário de Santa Maria

Rosmari Hörner¹, Rubia Vissotto², Aline Mastella², Adenilde Salla³, Bettina Meneghetti³, Nara L. Frasson Dal Forno³, Roselene Alves Righi³ & Loiva O. de Oliveira³

RESUMO - A infecção do Trato Urinário (ITU) é considerada uma das infecções mais comuns, tanto nosocomial quanto na comunidade. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de patógenos responsáveis por infecções do trato urinário observadas no Hospital Universitário de Santa Maria. Durante o período de janeiro à junho de 2004 foram analisados os resultados de 2629 culturas. *Escherichia coli* foi o microrganismo isolado mais prevalente (52,1 %) seguido pela *Pseudomonas aeruginosa* com 6,8 % e *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae* ambos com 5,4 %. O estudo da suscetibilidade dos isolados bacterianos mostrou que norfloxacina (NOR) apresentou mais alta atividade frente aos bacilos Gram-negativos e levofloxacina (LEV) maior atividade frente aos cocos Gram-positivos.

PALAVRAS-CHAVE - Infecção do Trato Urinário, urocultura, antimicrobianos.

SUMMARY - The Urinary Tract Infection (UTI) is considered one of the most common nosocomial and community infections. The aim of this study was to determine the prevalence of responsible pathogens for infections in the urinary tract, observed in Hospital Universitário de Santa Maria. During the period from January to June 2004 was analyzed the results of 2629 urine cultures. *Escherichia coli* was the more prevalent isolated microorganism (52,1 %), followed by the *Pseudomonas aeruginosa* with 6,8 % and *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella pneumoniae* both with 5,4 %. The antibacterial susceptibility of the bacteriological isolates revealed that Norfloxacin (NOR) presented high activity from Gram-negative Bacilli, while the Levofloxacin (LEV), the antibiotic who presented the biggest activity from the Gram-positive Cocci

KEYWORDS - Urinary Tract Infection, Urine culture, antibiotic.

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as doenças infecciosas mais comuns na prática clínica, particularmente em crianças, adultos jovens e mulheres sexualmente ativas, sendo apenas menos freqüentes que as do trato respiratório. No meio hospitalar são as mais freqüentes entre as infecções nosocomiais em todo mundo¹.

O trato urinário acima da uretra é estéril em pessoas saudáveis, mas a uretra é normalmente colonizada com muitos tipos diferentes de bactérias².

A infecção do trato urinário (ITU) pode ser definida como sendo a invasão e multiplicação de microrganismos nos tecidos do trato urinário, desde a uretra até os rins³. A maioria destas infecções do trato urinário, incluindo cistite, pielonefrite, bacteriúria assintomática e síndrome uretral aguda, são causadas por poucos gêneros bacterianos, e a presença destes microrganismos na urina é conhecida como bacteriúria⁴.

A prevalência das infecções das vias urinárias varia com o sexo e a idade do paciente. Em neonatos e lactentes, estas infecções são mais comuns nos meninos. Este número maior está relacionado a anomalias congênitas, especialmente válvula de uretra posterior, que acomete preferencialmente o sexo masculino. Posterior a esse período, durante toda a infância e, principalmente, na fase escolar, as meninas são acometidas por ITU numa proporção 10 a 20 vezes mais do que os meninos. Este predomínio do sexo feminino perma-

nece na idade adulta, com picos de maior acometimento no início ou relacionado à atividade sexual, durante a gestação ou na menopausa, de modo que 48 % apresentam pelo menos um episódio de ITU ao longo da vida. Na velhice as taxas de incidência deste tipo de infecção, seguidamente são maiores no sexo feminino, mas podem variar tanto em mulheres quanto em homens, conforme a existência de condições predisponentes à infecção, como uropatias obstrutivas da próstata nos homens e esvaziamento insuficiente da bexiga devido ao prolapso uterino nas mulheres^{5,6}. Na mulher, a suscetibilidade à ITU se deve à uretra mais curta e a maior proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra. No homem, o maior comprimento uretral, maior fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático são protetores^{6,7}.

As ITUs, quanto à presença dos fatores predisponentes ou agravantes, podem ser classificadas em dois grupos: a ITU não complicada, que ocorre em paciente com estrutura e função do trato urinário normais, é adquirida fora do ambiente hospitalar, ocorrendo primariamente em mulheres jovens sexualmente ativas e a ITU complicada que ocorre em indivíduos que já possuem alguma anormalidade estrutural ou funcional, ou metabólica ou na vigência de cateterismo vesical, instrumentação ou procedimentos cirúrgicos do trato urinário. As infecções do trato urinário não complicadas adquiridas na comunidade constituem atualmente o tipo de infecção mais comum que acomete as mulheres nos Estados Unidos, sendo responsáveis por mais de 8 milhões

Recebido em 11/06/2005

Aprovado em 25/04/2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM) e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS

Apoio: FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM - RS)

¹Professora Adjunta da disciplina de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

²Farmacêutica bioquímica aluna do Curso de Especialização em Laboratório Clínico – UFSM/DACT

³Farmacêutica bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria setor de Bacteriologia (LAC-HUSM)

de consultas por ano, como também por significativa causa de morbidade e altos custos em saúde⁸.

A urocultura ainda é o padrão-ouro no diagnóstico laboratorial da ITU. As culturas de urina representam 40 a 70 % dos espécimes clínicos enviados para análise nos laboratórios de Bacteriologia Clínica^{4,9}. Estes laboratórios têm por objetivo reduzir a morbidade e mortalidade produzindo os resultados das culturas com acurácia e precisão através da identificação do microrganismo envolvido juntamente com a realização de seu teste de suscetibilidade a antimicrobianos^{3,10}. Atualmente, está bem estabelecido que a frequência dos patógenos e os padrões de resistência podem variar significativamente tanto de país para país, como também, em diferentes hospitais dentro de um mesmo país. Por isso, a realização de trabalhos de vigilância identificando os padrões de prevalência e perfis de suscetibilidade são essenciais para direcionar as terapias e como medidas controle das infecções¹¹.

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência dos microrganismos responsáveis pelas infecções do trato urinário dos pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM-RS) relacionando-os com sua suscetibilidade frente aos antimicrobianos comumente empregados pelos clínicos e em uso neste nosocômio.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de janeiro a junho de 2004, foram analisados os resultados de 2629 culturas de urina, de pacientes ambulatoriais e hospitalizados, atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

As amostras constituíram, na sua maioria, de urina de jato médio. Os pacientes foram orientados para realizar uma higienização prévia na região genital, principalmente para o sexo feminino, desprezando o primeiro jato de urina e o restante da micção. Outras amostras que também foram processadas constituíram-se de urina de qualquer jato (opitadas de crianças com auxílio de saco coletor), urina com sonda vesical e urina coletada por punção supra-púbica. As amostras de urina foram coletadas em frascos estéreis e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do HUSM o mais rapidamente possível. A urocultura foi processada conforme descrito nos Procedimentos Operacionais Padrões (POP) do LAC de Bacteriologia do HUSM, utilizando a cultura quantitativa: as amostras foram semeadas através do método da alça calibrada de 0,01 mL (10 µL), em ágar CLED (cistina-lactose eletrólito deficiente), ágar McConkey e também em ágar sangue de carneiro quando na bacterioscopia (coloração de Gram) da urina homogeneizada (10µL) cocos Gram positivos eram visualizados. As culturas foram incubadas durante 24 - 48 horas, a 35°C ± 1 °C. Após isolamento primário, as amostras foram submetidas à identificação e determinação da suscetibilidade frente ao painel de urina (automação MicroScan - Dade Behring). As recomendações do fabricante do produto para inoculação e incubação dos painéis foram rigorosamente seguidas. Após 18-24 horas de incubação a 35°C ± 1 °C, os painéis foram lidos no sistema MicroScan.

Foram consideradas positivas as urinas que apresentaram um crescimento igual ou superior de aproximadamente 10⁵ UFC/mL. Este "cut off" (valor de corte) foi considerado no grande geral, para urinas de jato médio. À parte, foram consideradas a punção supra-púbica, onde qualquer número é significativo, assim também como contagens inferiores foram consideradas para pacientes sintomáticos, pacientes com suspeita de recidiva apresentando cultura pura, etc, ajustando cada caso quando solicitado ou investigado.

RESULTADOS

Observou-se um predomínio das infecções urinárias em mulheres 76% (n= 1998), sendo que a maioria encontrou-se na faixa etária de 13-35 anos. No sexo masculino as ITUs mais prevalentes ficaram na faixa entre 58-68 anos.

O microrganismo mais frequentemente isolado foi a *Escherichia coli* representando 52,1% (n= 1369), seguido da *Pseudomonas aeruginosa* com 6,8% (n= 179) e *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* ambos com 5,4% (142), como pode ser observado na tabela I.

TABELA I
Prevalência das bactérias nas infecções urinárias do HUSM:

Microrganismo	Percentage ns (%)
<i>Escherichia coli</i>	52,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,80
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,40
<i>Enterococcus faecalis</i>	5,40
<i>Enterobacter cloacae</i>	4,80
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,60
<i>Proteus mirabilis</i>	2,71
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,71
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,80
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1,60
<i>Staphylococcus sp.</i>	1,60
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,60
<i>Citrobacter freundii</i>	1,20
<i>Klebsiella sp.</i>	1,20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,10
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,10
<i>Morganella morganii</i>	0,90
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	0,70
<i>Serratia marcescens</i>	0,4
<i>Streptococcus sp.</i>	0,4
outros	2,0*

*Outros: *Escherichia fergusonii*, *Providencia rettgeri*, *Bordetella bronchiseptica*, *Serratia fonticola*, *Proteus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp.*

A Figura 1 mostra o percentual de cocos Gram positivos sensíveis as fluorquinolonas, antimicrobianos usados rotineiramente nos casos de infecções urinárias. O *Enterococcus faecalis* apresentou 66,7% de organismos sensíveis a Norfloxacin (NOR), 98,6% frente a Levofloxacin (LEVO) e 62,5% sensíveis a Ciprofloxacina (CIPRO). O *Staphylococcus aureus* mostrou 62,5% dos organismos sensíveis a Norfloxacin (NOR), 69,0% frente a Levofloxacin (LEVO) e 62,5% a Ciprofloxacina (CIPRO). O *Staphylococcus saprophyticus* apresentou 91,6% dos organismos sensíveis a Norfloxacin (NOR), 100 % s frente a Levofloxacin (LEVO) e 90,2 % frente a Ciprofloxacina (CIPRO).

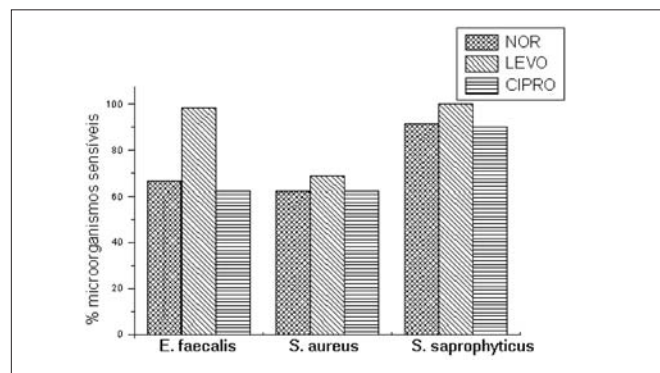


FIG. 1 - Sensibilidade apresentada pelos diferentes cocos Gram positivos frente à Norfloxacin, Levofloxacin e Ciprofloxacina.

A Figura 2 representa a porcentagem de bacilos Gram negativos sensíveis aos antimicrobianos testados. A *Escherichia coli* apresentou 87,4% de organismos sensíveis a Norfloxacin (NOR), 87% a Ciprofloxacina (CIPRO), 9,6% a Nitrofurantoína (NIT) e 62,2% frente a Sulfametoxazol-Trimetoprim (SFT). A *Pseudomonas aeruginosa* apresentou sensível a Norfloxacin (NOR) em 70% dos casos, para Ciprofloxacina (CIPRO) a sensibilidade foi de 76,6%, frente a Nitrofurantoína (NIT) 83,3% e para Sulfametoxazol (SFT) 7,8% de sensibilidade.

A *Klebsiella pneumoniae* mostrou sensível a Norfloxacin em 70,8% dos casos, frente a Ciprofloxacina (CIPRO) e Nitrofurantoína (NIT) apresentou 62,5% de sensibilidade, enquanto que, frente a Sulfametoxazol Trimetoprim (SFT) 58,4

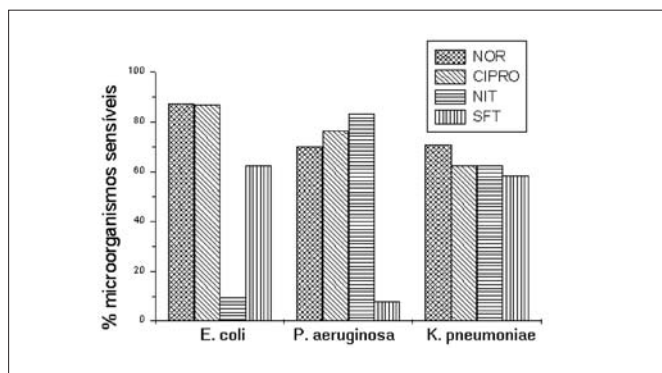


FIG. 2 - Sensibilidade dos bacilos Gram negativos frente à Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacina (CIPRO); Nitrofurantoína (NIT) e Sulfametoxazol-Trimetoprim (SFT).

DISCUSSÃO

A morbidade e a mortalidade das Infecções do Trato Urinário (ITU) mantêm-se de maneira considerável, apesar do advento de numerosos agentes antimicrobianos eficazes. Essas infecções são ainda responsáveis por aproximadamente 20 % de todas as consultas pediátricas. As ITU crônicas constituem uma das principais causas de Insuficiência Renal Terminal, isto é, aqueles pacientes pediátricos que necessitarão precoce ou tardiamente de tratamentos de substituição renal (diálise peritoneal ambulatorial contínua – CAPD), hemodiálise e transplante renal¹².

É de consenso dos especialistas da área, que o teste padrão para o diagnóstico das UTI é a cultura quantitativa de urina. Nenhum outro elemento da urinalise ou combinação de elementos é tão sensível ou específica. A ITU é confirmada ou excluída baseada no número de unidades formadoras de colônia por mL de urina analisada (UFC/mL) que crescem nos meios de cultura, rotineiramente idealizados para a semeadura desse tipo de amostra^{9,13}.

O trato urinário normal é estéril. Com exceção do período neonatal, a contaminação por via ascendente do aparelho urinário, por microrganismos da flora intestinal constitui o mecanismo patogênico mais freqüente de infecção urinária¹⁴. Os dados encontrados neste estudo referentes à prevalência são similares aos encontrados por outros autores^{8,9,14,15,16}. A porcentagem representada pelo patógeno mais freqüente, a *E. coli*, pode variar entre 52 % a 80 %, com a tendência a índices maiores nas uroculturas ambulatoriais sobre as nosocomiais. Os gêneros dos outros microrganismos envolvidos também são similares. Neste estudo, *Pseudomonas aeruginosa* ocupa um grau de destaque (segunda posição), estatística essa inquietante representada pelas características de resistência aos antimicrobianos apresenta-

da por essa bactéria. *Proteus mirabilis* ocupa em nosso meio, um lugar mais distante dos referidos nos outros centros acima citados.

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos indicou levofloxacina (LEVO) como um dos melhores agentes antibacterianos frente aos cocos Gram positivos. Já com os bacilos Gram negativos mais envolvidos nas ITU, norfloxacin e ciprofloxacina apresentaram atividade avantajada sobre os outros antimicrobianos e similares. A *E. coli* apresentou uma resistência grande à nitrofurantoína. Isso, em parte, pode ser justificado pela utilização preferencial pelos clínicos, nesse nosocômio da ciprofloxacina.

Podemos concluir que a prevalência e o perfil de suscetibilidade podem variar bastante, de acordo com a localidade, idade dos pacientes, sexo, dentre outras variáveis. Assim, apesar da patogênese e as formas de tratamento das ITU terem sido extensivamente estudadas nas duas últimas décadas¹⁷, é importante o conhecimento da prevalência e perfil de suscetibilidade dos patógenos locais. A urocultura quantitativa, representa o melhor tipo de exame para o diagnóstico dessa infecção, permite além do isolamento e identificação do microrganismo infectante, a determinação da sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos, além de representar a única forma de diagnosticar os quadros de bacteriúria assintomática (freqüente nas mulheres idosas e fator de risco nas gestantes) e caracterizar as infecções recorrentes as quais exigem uma conduta terapêutica diferenciada, já que é estimado que 80 % das mulheres com ITU tratada venham a apresentar recorrência.

REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Principais Síndromes Infeciosas- Módulo I – Infecções do trato urinário- [online] Disponível na internet via http://www.ccih.med.br/mod_1_2004.pdf. Arquivo capturado em novembro de 2004.
2. Thompson, Jr, R. B.; Miller, M. Specimen Collection, Transport, and processing: Bacteriology in Manual of Clinical Microbiology, Manual of Clinical Microbiology. 8a ed. Washington, D.C. (Eds). American Society for Microbiology, 2003. p. 320-321.
3. Hasenack, B. S.; Marquez, A. S.; Pinheiro, E. H. T, et al. Disúria e polaciúria: sintomas realmente sugestivos de infecção do trato urinário? RBAC 36(3): 163-166, 2004.
4. Cardoso, C. L.; Muraro, C. B.; Siqueira, V. L. D.; Guilhermetti, M. Simplified Technique for detection of significant Bacteriuria by Microscopic Examination of urine. J. Clin. Microbiol. 36 (3): 820-823, 1998.
5. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr., W. C. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido, . 5ª MEDSI, Rio de Janeiro, RJ, 2001, p. 141-147.
6. Heilberg, I. P.; Schor, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário – ITU. Rev. Assoc. Med. Bras. 49 (1): 109-116, 2003.
7. Carvalho, N. S.. Infecções Urinárias na mulher. Prática Hospitalar. 32 (2): 20-29, 2004.
8. Gupta, K.; Hooton, T. M.; Stamm, W. Increasing Antimicrobial Resistance and the Management of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infections. Ann. Intern. Med., 135: 41-50, 2001.
9. Martino, M. D. V.; Toporovski, J.; Mímica, I. M. Métodos bacteriológicos de triagem em infecções do trato urinário na infância e adolescência. J. Bras. Nefrol. 24(2): 71-80, 2002.
10. Graham, J. C., Galloway, A. The laboratory diagnosis of urinary tract infection. J. Clin. Pathol. 54: 911-919, 2001.
11. Sader, H. S.; et al. Pathogen Frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: Summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. BJID, 5 (4): 200-214, 2001.
12. Andrade, E. A, Infecção do trato urinário na Infância. Medicina on line – Revista Virtual de Medicina 1 (2):abr, mai, junh , 1998. - [online] Disponível na

internet via <http://www.medonline.com.br/meded/med2/itu.htm>.

13. Bergman, D. A.; Baltz, R. D.; Cooley, J. R; et al. Practice Parameter: The diagnosis, Treatment, and Evaluation of the Initial Urinary Tract Infection in Febrile Infants and Young Children – American Academy of Pediatrics,. Pediatrics, 103 (4): 843-852, 1999.
14. Santos, R. C. V.; Lunardelli, A.; Castaman, T. A.; et al. Prevalência e perfil de sensibilidade de microrganismos em infecções do trato urinário. RBAC, 35 (1): 27-28, 2003.
15. Koch, v. h.; Zucolotto, S. M. C. Infecção do trato Urinário. Em busca de evidências. J. Pediatr. 79 (1): 97-106, 2003.
16. Lapchile, m. S.; Nishiura, J. L.; Heilberg, I. P.; et al. Tratamento da infecção não complicada (ITU): estudo comparativo entre a ciprofloxacina (CIPRO) e Sulfametoxazol-Trimetoprima (SZM+TMP) com 2 esquemas de duração terapêutica. J. Brás. Nefrol. 17 (1): 31-34, 1995.

17. Rubinstein, I. Infecção urinária de repetição na mulher- Capítulo 22 – Guia Prático de urologia, (on line disponível na internet: <http://www.sbu-mg.org.br/guia/guia%20-%20cap%2022.pdf>, acessado dia 04-01-2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Rosmari Hörner
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria RS – CEP: 97110-970
Telefone: 0xx55-220-8464
e-mail: rosmari@smail.ufsm.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Avaliação de testes de diagnósticos rápidos na detecção de infecção assintomática do líquido amniótico em mulheres gestantes

Evaluation of rapid diagnosis tests in detection of amniotic fluid asymptomatic infection in pregnant women

Roxeane Martins¹; Carlos Augusto Alencar Júnior²; Marly Maria Lopes Vieira Peixoto²; Josias Martins Vale¹ & José Luciano Bezerra Moreira¹

RESUMO - Há evidências que associam ruptura prematura de membranas e parto prematuro com colonização bacteriana do líquido amniótico. O propósito deste estudo foi avaliar os métodos de diagnósticos rápidos incluindo determinação de glicose, coloração de Gram e proteína C reativa na detecção de infecção assintomática do líquido amniótico em mulheres gestantes. A população do estudo consistiu de 81 pacientes admitidas na Maternidade Escola Assis Chateaubriand. O líquido amniótico foi coletado por amniocentese transabdominal de gestantes sem evidências clínicas de corioamnionite. O líquido amniótico também foi cultivado para bactérias aeróbias e anaeróbias e micoplasmas genitais. A prevalência de cultura positiva do líquido amniótico foi de 9,9%. As bactérias isoladas foram: *Ureaplasma urealyticum* (8,6%), *Mycoplasma hominis* (1,2%) e *Peptostreptococcus sp* (2,4%). A sensibilidade e especificidade da coloração de Gram foram 25% e 100%, respectivamente. A concentração de glicose do líquido amniótico apresentou 37,5% de sensibilidade e especificidade de 88,9%. A sensibilidade da proteína C reativa foi 60% e especificidade foi 91,9%. Foi o teste mais sensível. Todos os testes, quando avaliados juntos, poderiam dar maiores informações sobre as condições amnióticas.

PALAVRAS-CHAVE - Líquido amniótico. Diagnóstico rápido. Infecções na gravidez.

SUMMARY - There is evidence that preterm premature rupture of the membranes and preterm labor are associated with bacterial colonization of the amniotic fluid. The purpose of this study was to evaluate rapid diagnosis methods including glucose determination, Gram stain and C reactive protein in detection of amniotic fluid asymptomatic infection in pregnant women. The study population consisted of 81 patients admitted at Maternidade Escola Assis Chateaubriand. Amniotic fluid was collected by transabdominal amniocentesis of pregnant women without evidence of clinical chorioamnionitis. Amniotic fluid also was cultured for aerobic and anaerobic bacteria and for genital mycoplasma. The prevalence of positive amniotic culture was 9,9%. The bacteria were: *Ureaplasma urealyticum* (8,6%), *Mycoplasma hominis* (1,2%) e *Peptostreptococcus sp* (2,4%). The sensitivity and specificity of Gram stain were 25% and 100%. Amniotic fluid glucose concentration showed 37,5% of sensitivity and 88,9% of specificity. The sensitivity of C reactive protein was 60% and specificity was 91,9%. It was the most sensitivity test. All tests when evaluated together could give more information about amniotic conditions.

KEYWORDS - Amniotic fluid; Rapid tests; Pregnancy infection.

INTRODUÇÃO

A invasão do líquido amniótico por microrganismos tem sido implicada como causa de parto prematuro, principalmente em pacientes em trabalho de parto prematuro com prolongada ruptura das membranas. (Kass, 1960; Romero *et al*, 1999; Wahbeh *et al*, 1984)

As pacientes em parto prematuro idiopático podem apresentar como características: evidência histológica de corioamnionite⁴; presença de microrganismos nas membranas fetais, placenta ou líquido amniótico bem como endotoxinas bacterianas ou mediadores inflamatórios no líquido amniótico (Mcgregor *et al* 1991; Waites *et al*, 1990; Gravett *et al*, 1996; Bobitt *et al*, 1981)

A infecção intra-amniótica é confirmada pela cultura positiva do líquido amniótico, independe da presença ou ausência de evidências clínicas (Romero *et al*, 1990).

Bobitt *et al*. (1981), em trabalho realizado com 31 gestantes em trabalho de parto prematuro e membranas intactas, obtiveram 8 cultivos positivos do líquido amniótico, sendo que apenas duas pacientes apresentaram sinais clínicos de infecção.

Assim, a colonização do líquido amniótico por microrganismos é patológica, pois a cavidade intra-uterina de mulhe-

res que não estão em trabalho de parto e com membranas intactas é normalmente estéril. Entretanto, bactérias têm sido isoladas do líquido amniótico em todas idades gestacionais na ausência de trabalho de parto prematuro ou de ruptura de membranas (Wahbeh 1984).

As justificativas para explicar este processo seriam:

a. A ascendência de microrganismos ao trato genital superior, particularmente durante a gravidez, devido à progressiva dilatação uterina. A membrana amniótica ficaria então exposta a microrganismos do trato genital baixo, que atravessariam as membranas intactas e teriam acesso à cavidade amniótica, causando rompimento prematuro das membranas (Averbauch, 1995; Baron 1993; Laney, 1982; Romero *et al*, 1988).

b. Disseminação hematogênica através da placenta (infecção transplacentária). O agente infeccioso atinge a circulação materna, tem acesso ao espaço intervilo, vilo e circulação fetal (Romero *et al*, 1988).

c. Via retrógrada, através da cavidade peritoneal, tubas uterinas, cavidade intra-amniótica (Romero *et al*, 1988);

d. Introdução acidental no momento de procedimentos intra-uterinos, tais como amniocentese, cordocentese, etc (Romero *et al*, 1988).

Romero *et al* (1988) observaram que a prevalência de in-

Recebido em 17/05/2005

Aprovado em 25/04/2006

¹Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará/UFC

²Maternidade Escola Assis Chateaubriand/UFC

fecção depois de procedimentos diagnósticos invasivos é baixa e que a via mais comum para infecção intra-uterina é a ascendente. Esta via apresenta vários estágios na patogênese do parto prematuro:

- a) O primeiro estágio para a ascendência de microrganismos é o excessivo aumento destes na vagina e no canal cervical.
- b) Microrganismos têm acesso à cavidade intra-uterina e permanecem na decídua, causando inflamação localizada, deciduíte.
- c) Invadem o amnion (amnionite), causando infecção intra-amniótica.
- d) Na cavidade amniótica, a bactéria pode infectar o feto por várias portas de entradas.

Estas evidências associam a infecção assintomática do trato genital e microbiota vaginal como causa de parto prematuro e rompimento prematuro de membranas, uma vez que a interação microrganismo-hospedeiro pode levar aos tecidos locais níveis elevados de fatores de virulência tais como fosfolipases ou proteases (McGregor *et al*, 1990; Polzin & Brady, 1991; McDonald *et al*, 1994)

Romero *et al*. (1989), avaliando a existência de invasão microbiana na cavidade amniótica em partos a termo ou prematuro com membranas intactas, obtiveram culturas positivas em 18,8% e 21,6% dos casos, respectivamente. As bactérias mais freqüentemente isoladas foram: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus agalactiae* e espécies de *Lactobacillus*.

A cultura do líquido amniótico é largamente utilizada para avaliar o estado microbiológico da cavidade uterina, entretanto, os resultados não estão disponíveis imediatamente (Romero *et al*, 1990). O diagnóstico precoce de infecção assintomática do líquido amniótico é um objetivo desejável, porque poderá dar informação antecipada ao corpo clínico, que poderá tomar providências para prevenir morbidade e mortalidade materno-fetal (Romero *et al*, 1993; Gauthier *et al*, 1991).

Entre estes métodos, a coloração de Gram fornece informações imediatas sobre aspectos morfológicos de células bacterianas presentes em processo infecciosos, enquanto o resultado da cultura ainda não está disponível (Romero *et al*, 1988).

A dosagem de glicose também tem sido utilizada como teste rápido, pois a diminuição da sua concentração em diversos fluidos corporais tem sido utilizada para o diagnóstico de infecção (Romero *et al*, 1990).

Sereepapong *et al* (2001) reportaram que a determinação de proteína C reativa no soro materno poderia ser utilizada para detectar corioamnionite.

O objetivo deste trabalho foi: avaliar os métodos de diagnósticos rápidos como coloração de Gram, à determinação de glicose no líquido amniótico e à dosagem de proteína C reativa no soro materno, em detectar infecção assintomática em mulheres gestantes em relação ao padrão ouro deste estudo, que foi cultura bacteriana; identificar o percentual de mulheres gestantes com infecção assintomática do líquido amniótico. Identificar as bactérias envolvidas.

MATERIAL E MÉTODOS

O grupo de estudo consistiu de 81 grávidas submetidas à amniocentese entre a 24ª e 40ª semanas gestacionais. As indicações para realização do procedimento foram a pesquisa da maturidade fetal em pacientes, com indicação de resolução de gestação; a análise cromossômica do conceito e a avaliação da bilirrubina presente no líquido amniótico em gestantes com isoimunização pelo fator Rh. Não existiam sinais clínicos e/ou laboratoriais de infecção intra-

uterina. O uso de antibióticos ou a suspeita de infecção intra-útero, no momento da coleta, foram critérios para exclusão na pesquisa.

As pacientes foram submetidas ao procedimento enquanto internadas na Enfermaria de Patologia Obstétrica da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC), da Universidade Federal do Ceará (UFC) Após informação verbal e escrita sobre o trabalho, o consentimento foi obtido de cada uma delas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará.

A amniocentese sob controle ultra-sonográfico foi realizada estando a grávida em decúbito dorsal após assepsia e anestesia local. O líquido amniótico foi coletado em seringa própria sendo o primeiro mL desprezado. A seguir, amostras de 10 a 20 ml foram obtidas e transportadas, em seringas plásticas encapadas para o Laboratório de Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) UFC. A amostra foi semeada imediatamente após a coleta e cultivada em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose, incubada em estufa bacteriológica à temperatura de 35 a 37°C, segundo Koneman e col.¹⁴. Além disso, foram realizadas culturas para micoplasmas genitais.

A identificação das espécies bacterianas, quando as culturas eram positivas, foi feita pelo sistema ATB Expression® (Bio-Mérieux). Para o cultivo, identificação das espécies (controle/identificação de *M. hominis* e *U. urealyticum*) e contagem de colônias ($\geq 10^4$ CCU-Unidade de Mudança Colorimétrica) dos micoplasmas genitais foi utilizado Kit Mycoplasma IST® (Bio-Mérieux).

Simultaneamente, foram realizadas bacterioscopias pela coloração de Gram, após confecção de esfregaço obtido da amostra não centrifugada. A técnica utilizada para coloração de Gram foi realizada segundo metodologia descrita por Koneman *et al* (1992). Os resultados de todas as bacterioscopias foram imediatamente informados ao corpo clínico.

O líquido amniótico remanescente foi encaminhado ao laboratório da MEAC/UFC para realização dos exames específicos para os quais havia sido indicado o procedimento e também dos testes rápidos.

A dosagem de glicose foi feita pelo método da glicose oxidase, após a centrifugação do líquido amniótico, conforme método anteriormente descrito (Romero *et al*, 1993). Todas as amostras foram processadas em duplicata. A simplicidade metodológica possibilitou a utilização do sistema enzimático em aparelhos semi-automatizados.

O valor considerado como sugestivo de infecção para o líquido amniótico, à semelhança de Romero *et al* (1993), foi $<10\text{mg/dL}$.

Reagentes de proteínas da fase aguda da inflamação, tais como a proteína C, podem ser achadas no soro materno ou fluido amniótico como resposta à infecção (Watts *et al*, 1993).

A metodologia consiste em determinar, de forma qualitativa e semiquantitativa, a dosagem de proteína C reativa (pCr) para diagnóstico *in vitro*. Para o soro são considerados positivos valores maiores que 6mg/dL .

Para análise estatística dos métodos diagnósticos utilizados para detecção da infecção assintomática do líquido amniótico utilizou-se o SPSS for Windows versão 7.0.

RESULTADOS

Houve isolamento bacteriano do líquido amniótico em 9,9% das gestantes estudadas (8/81). Micoplasmas genitais foram as bactérias mais isoladas. *Ureaplasma urealyticum* em sete casos, *Mycoplasma hominis* em um caso, seguido

por *Peptostreptococcus sp* em dois casos, compreendendo 25% de invasão polibacteriana.

TABELA I
Espécies bacterianas isoladas nas culturas do líquido amniótico nas gestantes estudadas.

Bactérias	n	%
<i>U. urealyticum</i>	07	8,6
<i>Peptostreptococcus sp</i>	02	2,5
<i>M. hominis</i>	01	1,2
TOTAL	10	12,3

N= número de espécies bacterianas isoladas.

Utilizando como referência o nosso teste ouro, que foi a cultura bacteriana, observamos incidência de 9,9% de infecção do líquido amniótico. Quando comparamos os outros testes diagnósticos encontramos os seguintes resultados (tabela 2), (figura 1):

TABELA II
Índices diagnósticos e valores preditivos de diferentes testes usados na detecção de infecção do líquido amniótico.

	S	E	VP	VPP	FP	VPN	FN
Coloração de Gram	25,0	100,0	92,6	100,0	0,0	92,4	7,6
Glicose do líquido amniótico	37,5	88,9	83,1	26,3	73,0	92,8	7,1
Proteína Creativa	60,0	91,9	89,7	33,4	55,6	95,4	4,6

S - Sensibilidade; E - Especificidade
VP - Valor preditivo
VPP - Valor preditivo positivo; VPN - Valor preditivo negativo
FP - Falsos positivos; FN - Falsos negativos
A prevalência P= 9,9% de pacientes com infecção no líquido amniótico.

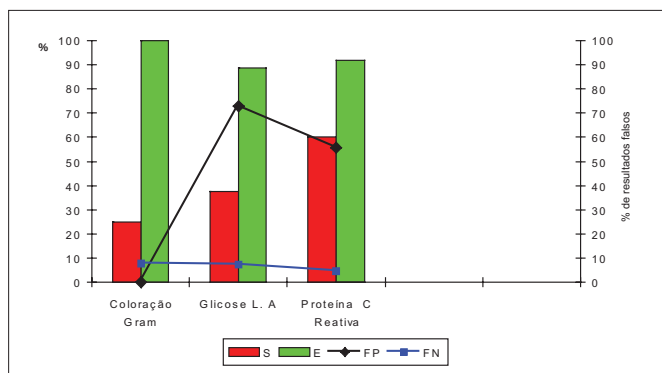


FIGURA 1 – Índices diagnósticos dos testes usados na detecção de infecção do líquido amniótico.

DISCUSSÃO

A presença de microrganismos no líquido amniótico durante a gestação é assunto de importância na prática clínica obstétrica. É citado ocorrer em 10% das grávidas com membranas intactas e em até 93% das pacientes com ruptura de membranas (Romero, 1988).

Romero *et al.* (1989) observaram que, em 41 gestantes com membranas intactas, 9,9% apresentaram cultura do líquido amniótico positiva, percentual semelhante ao verificado em nossa pesquisa.

O diagnóstico rápido de infecção intra-uterina é problemático. O teste deve ser rápido, barato, capaz de ser realizado a qualquer momento do dia, e muito eficiente para detectar infecção do líquido amniótico. Segundo Kirshon *et al* (1991), o ideal seria apresentar sensibilidade de 100%, com margem de falsos positivos sem significância ou sem im-

portância para ser considerado. Desta forma, enquanto o resultado da cultura do líquido amniótico ainda não estar disponível, testes rápidos como o Gram, dosagem de glicose do líquido amniótico e proteína C reativa do soro materno poderiam ser realizados, auxiliando na conduta terapêutica (Gauthier, 1994).

Esfregaços corados pelo Gram e dosagem de glicose são testes simples e baratos que têm sido propostos como testes rápidos para detecção de infecção subclínica do líquido amniótico (Romero 1993). A bacterioscopia pelo Gram é um método largamente usado para detecção rápida de bactérias nos fluidos corporais. A desvantagem da coloração de Gram é a baixa sensibilidade, em torno de 56% a 83%, conforme trabalhos já publicados (Gauthier, 1992). Espécies de micoplasmas não são visualizadas pelo Gram porque não possuem parede celular (Gauthier, 1994). Por outro lado, resultados falso-negativos, podem ocorrer quando o inóculo bacteriano é pequeno (<10⁵ UFC/mL) ou quando a infecção bacteriana ficou limitada às membranas fetais. Quando comparamos os resultados obtidos em relação à especificidade da coloração de Gram (100%) apresentados na tabela 2 e figura 1, e a obtida por Romero *et al* (1993) (98,5% - 67/68), percebemos que houve acentuada concordância.

A determinação de glicose no líquido amniótico <10mg/dL, como demonstrado pela tabela 2 e figura 1, apresentou sensibilidade de 37,5% e especificidade de 88,88%. Em trabalho de Romero *et al* (1993), estes índices foram, respectivamente, 57,1% (24/420) e 73,5% (50/68). Estes resultados podem ser obtidos na ausência de bactérias viáveis no líquido amniótico ou em casos de infecção por micoplasmas, já que não utilizam glicose no seu metabolismo, também em infecções por vírus e *Chlamydia sp* (Miller, 1980). A dosagem de proteína C reativa foi mais sensível (60%) que a coloração de Gram e a dosagem de glicose na detecção de infecção subclínica do líquido amniótico. Muitos estudiosos relataram que a dosagem da proteína C reativa pode identificar gestantes com infecção subclínica. Krohn *et al* (1991) verificaram em gestantes, com idade gestacional entre 23 e 34 semanas, que estavam em trabalho de parto prematuro, com ruptura prematura das membranas, e em outro grupo com membranas intactas, um nível elevado de proteína C reativa (pCr). A pCr, quando utilizada como teste preditivo de infecção intra-uterina, mostrou sensibilidade de 60,0% e especificidade de 91,78% nas amostras testadas. Sereepapong *et al* (2001) obtiveram, respectivamente, 56,0% e 57,9%.

A desvantagem da dosagem de pCr é que, como esta é uma proteína da fase aguda da inflamação, fica difícil diferenciar infecção do líquido amniótico de outro processo inflamatório (Krohn, 1991).

Um importante achado foi o alto índice de infecção intra-uterina assintomática, por micoplasmas, em particular, por *Ureaplasma urealyticum*, seguido por *Mycoplasma hominis* e *Peptostreptococcus sp*. (Romero, 1989).

Estudos microbiológicos do fluido amniótico que não incluem culturas para micoplasmas genitais, como a bacterioscopia pela coloração de Gram, podem subestimar a proporção de infecção intra-uterina. Estas bactérias estão associadas com elevados índices de infecção intra-uterina, levando à perdas fetais. A negatividade da pesquisa pelo Gram deve-se ao fato da ausência da parede celular nos micoplasmas.

Por esse motivo, e pela presença freqüente desses microrganismos nos quadros infecciosos, como confirmado por nosso estudo, a pesquisa pela coloração de Gram, dosagem

de glicose e proteína C reativa não devem ser usados como métodos isolados para detectar infecção.

REFERÊNCIAS

- 1) Averbuch, B., Mazor, M., Shoham Vardi, I., Chain, W., Vardi, H., Horowitz, S., Shuter, M. Intrauterine infection in women with Preterm rupture of membranes maternal and neonatal characteristic. *Europ J Obstet Gynecol Reprod.Biology*, v. 62, p. 25-29,1995.
- 2) Baron, E.J., Cassel, G.H., Duffy, L., Eschembach, DA Laboratory diagnosis of female genital tract infection. *Cumitech.*, v. 17, p. 1-24, 1993.
- 3) Bobitt JR, Haylipp C, Domato JD. Amniotic fluid infection as determined by transabdominal amniocentesis in patients with intact membranes in premature labor. *Am J Obstet Gynecol.*, v.140, p.947-52,1981.
- 4) Gauthier, DW., Meyer, WJ., Bierniarz, A. Correlation of amniotic fluid glucose concentration and intraamniotic infection in patients with preterm labor or premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.*,v.165, p. 1105-1110, 1991.
- 5) Gauthier, DW., Meyer, WJ. Comparison of Gram stain, leukocyte esterase activity, and amniotic fluid glucose concentration in predicting amniotic fluid culture results in preterm premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 167, p. 1092-1095, 1992.
- 6) Gauthier, DW., Meyer, WJ., Bierniarz, A. Expectant management of premature rupture of membranes with amniotic fluid culture positive for Ureaplasma urealyticum alone. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 170, p. 587-90, 1994.
- 7) Gravett MG, Hummel D, Eschembach DA, Holmes KK. Preterm labor associated with subclinical amniotic fluid infection and with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.*, v.67, p.229-37,1986.
- 8) Kass, EH. Bacteriuria and pyelonephritis of pregnancy. *Arch Intern Med.*, v. 105, p. 194-196, 1960.
- 9) Kirshon, B., Rosenfeld, B., Mari, G., Belfort, M. Amniotic fluid glucose and intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 164, p. 818-820, 1991.
- 10) Koneman EW, Allen DA, Dowell VR, Sommers HM. *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: JB Lippincott 1992; p.675-701.
- 11) Krohn, MA., Hillier, SL., Lee, ML., Rabe, LK., Eschenbach, DA. Vaginal bacteroides species are associated with increased rate of preterm deliver among women in preterm labor. *J Infect Dis.*, v. 164, p. 88-93, 1991.
- 12) Lamey, JR, Eschembach, DA. Isolation of mycoplasma and bacteria from the blood of post partum women. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 143, p. 104-112, 1982.
- 13) McDonald HM, O' Loughlin, Jolley PT, McDonald PJ, Vigneswaran R. Changes in vaginal flora during pregnancy and association with preterm birth. *J Infect Dis.*, v.170, p. 724-8, 1994.
- 14) McGregor JA, French JI, Richter R, Franco-Buff A, Johnson A, Hiller S, Judson FM, Todd JK. Antenatal microbiologic and maternal risk factors associated with prematurity. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 163, p.1465-73, 1990.
- 15) Miller, JM., Pupkin, MJ., Hill, GB. Bacterial colonization of amniotic fluid from intact fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.*, v.136, p. 803-807, 1980.
- 16) Minkoff H, Grunebaun NA., Schuarz RH, Feldman J, Cummings M, Crombleholme W, Clark L, Pringle G, McComarck WM. Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes. A prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, v.150, p. 965-72, 1984.
- 17) Polzim WJ, Brady K. Mechanical factors in the etiology of premature rupture of the membranes. *Clin Obstet Gynecol.*, v. 34, p. 702-14, 1991.
- 18) Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol.*, v. 31, p. 553-84,1988.
- 19) Romero R, Sirtori M, Oyarzun E. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 161, p. 817-24, 1989.
- 20) Romero R, Emanian M, Quintero R, Wan M, Hobbins JC, Mazor M., Edberg S. The value and limitation of Gram stain examination in the diagnosis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.*, v.159, p. 114-19, 1988.
- 21) Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Gonzalez R, Diamond MP, Baumann P, Aramada H, Kenney JS, Cotton DB, Seghal P. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6 and Gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.*, v.169, p. 839-51, 1993.
- 22) Romero, R., Jimenez, C., Lohda, AK., Nores, J., Hanoaka, S., Ávila, C., Callahan, R., Mazor, M., Hobbins, JC., Diamond, MP. Amniotic fluid glucose concentration: a rapid and simple method for detection of intraamniotic infection in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 163, p. 968-974, 1990.
- 23) Sereepapong, W., Limpogsanurak, S., Triratanachai, S., Wannakrairot, P., Charuruks, N., Krailadsiri, P. The role of maternal serum and white blood cell count in prediction of chorioamnionitis in women with premature rupture of membranes. *J Med AssocThai*, v.84, p.360-366, 2001.
- 24) Waites, KB., Crouse, DT., Cassel, GH. Systemic neonatal infection due to Ureaplasma urealyticum. *Clin Infect Dis.*, v. 17 (suppl. 1), p.5131-5135, 1993.
- 25) Wahbeh, CJ., Hill, GB., Eden, RD., Gall, SA. Intraamniotic bacterial colonization in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 148, p.739-742, 1984.
- 26) Wallace RL, Herrick CN. Amniocentesis in the evaluation of premature labor. *Obstet Gynecol.*, v.; 57, p. 483-86, 1981.
- 27) Watts, Dh., Krohn, Ma., Hillier, Sl., Wener, Mh., Kiviat, B., Eschenbach, DA. Characteristic of women in preterm labor associated with elevated C- reactive protein levels. *Obstet Gynecol.*, v. 82, p.509-514, 1993.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Roxeane Martins

Avenida da Universidade, 3264 apto 1002 bloco II - Bairro Benfica

CEP: 60.020-181 - Fortaleza-Ce

Fone: (085) 3081-2453

(085) 9987-6269

e-mail-rox@unifor.br

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará

Airborne fungi in the periodics room of the library of health science of the University Federal of Ceará

Everardo Albuquerque Menezes¹, Adriano Coutinho Alcanfor¹ & Francisco Afrânio Cunha¹.

RESUMO - Os fungos anemófilos ou alergizantes pertencem a diversos gêneros e espécies e quase todos são contaminantes, isto é, podem ser isolados facilmente do ar em placas de ágar Sabouraud. Numerosos fungos encontrados na poeira e no ar desempenham papel importante na patologia médica, como elementos alergizantes que são. Assim asmas e rinites ditas de "clima" estão na dependência ou em relação íntima com a microbiota fúngica do ar. Tendo como premissa o grande número de pessoas que sentiam algum tipo de alergia na sala de periódicos da biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, teve-se como objetivo a determinação da microbiota fúngica anemófila. Foram expostas 50 placas de Petri na referida sala, durante quinze minutos. As placas foram levadas para o laboratório de Microbiologia de DACT/FFOE/UFC. Após o crescimento nas placas, os fungos foram identificados de acordo com a metodologia clássica de micologia. Das 50 exposições foram isolados 13 gêneros fúngicos considerados anemófilos, isto é, veiculados pelo ar atmosférico. Os fungos anemófilos mais frequentes em ordem decrescente foram: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp. e *Myceila sterilia*. De acordo com o nosso estudo concluímos que a sala de periódicos da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará é um local insalubre, porque possui fungos que podem desencadear uma alergia respiratória nos frequentadores da referida sala.

PALAVRAS-CHAVE - Fungos anemófilos, alergia respiratória, *Aspergillus*, *Penicillium*

SUMMARY - Airborne or allergy fungal belong to the diverse genera and species and almost all are contaminants, that is, they can easily be isolated of air in plates of Sabouraud agar. Numerous fungal found in the dust and air they play important role in the medical pathology, allergic diseases elements that they are. Thus asthmas and rhinitis of "climate" are in the dependence or in close relation with microbiota fungal of air. Having as premise the great number of people who felt some type of allergy in the room of periodic of library of Sciences of the Health of the Federal University of the Ceará, was had as objective the determination of airborne fungal. 50 plates of Petri were displayed in the related room, during fifteen minutes. The plates were taken for the laboratory of Microbiology of DACT/FFOE/UFC. After growth in the plates, the fungus were identified according to with classic methodology of mycology. Of the 50 expositions 13 genera were isolated considered airborne fungal, that is, propagated for atmospheric air more frequent airborne fungal orderly decreasing were: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp. e *Myceila sterilia*. According to with our study we conclude that the room of periodic of the Library of Sciences of the Health of the Federal University of the Ceará it is a place unhealthy, because it possess fungal that can break out a respiratory allergy in the people that frequent of the related room.

KEYWORDS - airborne fungal, respiratory allergy, *Aspergillus*, *Penicillium*.

INTRODUÇÃO

Os fungos dispersam-se na natureza através do ar atmosférico ou por outras vias como água, insetos, homem e animais. Os fungos que são dispersos através do ar atmosférico são denominados fungos anemófilos. Sendo assim, a microbiota fúngica anemófila pode ser semelhante ou diferente em cada cidade ou região. Os elementos fúngicos que são encontrados no ar atmosférico são os esporos (propágulos). São aeroalérgenos que, quando inalados, podem ser responsáveis por manifestações respiratórias alérgicas, como asma e rinite¹.

O homem, ao se expor inalando estes aeroalérgenos, pode desenvolver uma doença respiratória alérgica e a intensidade de exposições pode determinar a relevância clínica. Para controlar as manifestações alérgicas provocadas por estes alérgenos inalantes através da terapêutica específica, é importante conhecer a frequência com que ocorre determinado fungo anemófilo, em relação ao total de exposições praticadas pelo indivíduo ou do número de amostras isoladas. Segundo Horner *et al*², nos Estados Unidos e em outros países industrializados, cerca de 20% da população apresenta doenças alérgicas como asma e ou rinite causadas por aeroalérgenos de fungos³.

Desde muito tempo conhece que os fungos do ambiente, veiculados pelo ar atmosférico, desempenham um papel importante como elementos alergizantes das vias respiratórias, ocasionando principalmente asma e rinite. Esporos e fragmentos de micélio de fungos estão entre os mais ubíquos aeroalérgenos do mundo³.

Além da predisposição genética para o desenvolvimento de doenças alérgicas há a necessidade da presença de outros fatores, principalmente os ambientais, relacionados à exposição do paciente aos fungos anemófilos. Existe grande variedade de alérgenos potencialmente responsáveis pela sensibilização e desencadeamento de "crises alérgicas" em indivíduos atópicos, tais como: fungos, pólenes, epitélios de animais, poeira doméstica, antígenos ocupacionais, poluentes químicos e outros⁴.

A poeira doméstica é hoje o principal desencadeador de alergias, existem trabalhos que provam que a poeira doméstica tem uma quantidade muito grande de fungos que são veiculados pela poeira e provocam asma e rinite⁵.

Em relação a poeira de livros, existem trabalhos que fazem a identificação dos fungos que estão presentes nos livros que podem também desencadear uma crise alérgica⁶.

Tendo em vista a grande quantidade de fungos anemófilos como agentes poluidores do ambiente, principalmente na

Recebido em 17/05/2005

Aprovado em 05/12/2005

Trabalho realizado no laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/FFOE/UFC

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará

bibliotecas universitárias, dada sua importância na etiologia de doenças respiratórias de natureza alérgica e como oportunistas responsáveis por diferentes quadros clínicos de micoses, este trabalho teve como pretensão conhecer a microbiota anemófila da biblioteca das ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Característica da área estudada:

A área estudada foi a sala de Periódicos da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, onde há várias estantes com os periódicos, possui ar condicionado e é totalmente fechada, apresentando uma porta e as janelas são mantidas fechadas.

2. Locais da coleta:

Foram coletadas 50 amostras da sala de periódicos da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, de vários locais (em vários ângulos) a escolha foi aleatória, no período de um mês.

3. Exposição¹⁸:

Foram expostas 50 placas de Petri contendo ágar Sabouraud com Cloranfenicol, no período de um mês. Este método baseia-se na sedimentação de esporos dos fungos anemófilos, sobre a placa em questão, colocada em posição horizontal.

As placas foram abertas dentro da sala por aproximadamente quinze minutos e a uma altura de 1m e 20cm de altura de acordo com Gambale *et al.* (1993)¹⁸. Após este período foi levado ao laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

4. Cultivo e Identificação dos Fungos:

As placas, após a exposição, foram mantidas por quatro dias em estufa a 25°C, sendo iniciada a classificação genérica a partir deste dia. A identificação foi feita pelos seguintes métodos micológicos (LACAZ, *et al.*, 2002⁷ e NEUFELD, 1999⁸):

- Microscopia direta da colônia na placa.
- Técnica da colônia gigante.
- Técnica do retalhamento.
- Técnica do microcultivo.

Os fungos que não apresentavam órgãos de frutificação que permitissem a sua identificação foram repicados para tubos contendo ágar batata e ágar infuso de milho. Quando o estado de não esporulação persistiu nesses meios, foram então classificados como *Mycelia sterilia*⁷.

RESULTADOS

A partir das 50 exposições, foram isolados 220 colônias e identificados 13 gêneros fúngicos, cujas frequências encontram-se na tabela 01. Para facilitar a apresentação dos resultados, convencionou-se os seguintes tipos de frequências, segundo Gambale *et al.*, (1993)¹⁸:

- Absoluta (F), correspondendo ao número de vezes que determinado gênero de fungo foi isolado num considerado período;

- Relativa (%), que corresponde à percentagem de isolamento de determinado gênero de fungo em relação ao número de exposições.

Os fungos mais frequentes na sala de periódicos da Biblio-

teca das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará foram *Aspergillus* sp. (100%), *Penicillium* sp. (80%), *Curvularia* sp. (60%), *Cladosporium* sp. (50%). Os de menor frequências foram: *Mucor* sp. (2%), *Absidia* sp. (2%) e *Epicoccum* sp. (2%)

Comparando os nossos resultados (tabela 01) com os obtidos na cidade de Fortaleza (Tabela 02), concluímos que houve coincidências nos gêneros fúngicos. Na cidade de Fortaleza, os fungos mais frequentes foram: *Aspergillus* sp., seguido pelo *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. e *Mycelia sterilia*, estes resultados encontrados por Menezes *et al.*, (2004)⁸, são bastante semelhantes aos aqui apresentados. Provavelmente estes fungos foram veiculados eolicamente das áreas externas.

TABELA I

Frequência de isolamento de fungos alergizantes na sala de periódicos da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará.

Fungos	F	%
<i>Aspergillus</i> sp.	50	100
<i>Penicillium</i> sp.	40	80
<i>Curvularia</i> sp.	30	60
<i>Cladosporium</i> sp.	25	50
<i>Mycelia sterilia</i>	30	60
<i>Drechslera</i> sp.	10	20
<i>Fusarium</i> sp.	10	20
<i>Rhodotorula</i> sp.	15	30
<i>Alternaria</i> sp.	05	10
<i>Rhizopus</i> sp.	02	4
<i>Epicoccum</i> sp.	01	2
<i>Absidia</i> sp.	01	2
<i>Mucor</i> sp.	01	2
Total	220	—

F - Frequência absoluta
% - Frequência relativa

TABELA II

Frequência de fungos anemófilos isolados em dez bairros na cidade de Fortaleza

Locais → Fungos ↓	CE	AL	BF	AB	RT	CF	BC	MO	PA	PP	Nº de Colônias	%
<i>Aspergillus</i> sp.	44	152	37	54	43	52	100	35	48	117	682	44,7
<i>Penicillium</i> sp.	13	52	22	18	15	15	27	12	18	12	204	13,3
<i>Curvularia</i> sp.	08	58	06	07	18	13	14	08	11	06	149	9,8
<i>Cladosporium</i> sp.	09	17	01	01	11	15	15	05	09	21	104	6,8
<i>Mycelia sterilia</i>	04	02	15	22	08	09	07	09	08	08	92	6,0
<i>Fusarium</i> sp.	05	04	01	03	02	07	-	05	14	13	54	3,5
<i>Rhizopus</i> sp.	04	03	08	12	03	05	03	06	02	02	48	3,1
<i>Drechslera</i> sp.	03	08	03	-	05	03	02	03	03	07	37	2,6
<i>Alternaria</i> sp.	-	08	06	02	05	07	03	-	01	01	36	2,4
<i>Absidia</i> sp.	04	03	-	05	03	05	-	01	15	-	33	2,2
<i>Neurospora</i> sp.	02	-	-	02	02	06	02	02	05	-	21	1,4
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	01	02	05	03	-	01	02	-	-	14	0,9
<i>Aureobasidium</i> sp.	-	01	02	02	-	-	02	-	-	-	07	0,5
<i>Cunninghamella</i> sp.	-	-	-	-	01	-	-	04	01	-	06	0,4
<i>Mucor</i> sp.	-	-	-	-	01	-	-	02	01	-	06	0,4
<i>Epicoccum</i> sp.	-	-	-	01	02	-	-	02	01	-	06	0,4
<i>Syncephalastrum</i> sp.	02	02	-	-	-	-	-	01	01	-	06	0,4
<i>Paeclomyces</i> sp.	-	-	-	-	01	-	-	-	03	-	04	0,3
<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-	-	03	-	-	-	-	03	0,2
<i>Nigrospora</i> sp.	-	-	-	-	01	-	-	01	-	-	02	0,15
<i>Verticillium</i> sp.	-	01	-	-	-	-	-	-	01	-	02	0,15
<i>Geotrichum</i> sp.	01	-	01	-	-	-	-	-	-	-	02	0,15
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	01	-	01	02	0,15
<i>Phoma</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	01	-	-	01	0,10
TOTAL	99	312	104	134	124	140	176	100	142	188	1521	100

Fonte: Menezes *et al.*, 2004

DISCUSSÃO

Processos alérgicos, como rinite, asma alérgica, alveolite alérgica extrínseca, sinusite alérgica, foram verificados, bem como micoses pulmonares clinicamente definidas são algumas das manifestações eventualmente provocadas pela microbiota fúngica exógena⁷.

Quatro fungos anemófilos são importantes desencadeadores de alergias respiratórias, são eles: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp.. A literatura internacional e nacional relata a importância destes organismos, inclusive com a imunoterapia das alergias por eles provocados¹⁰. Os quatro fungos citados foram encontrados na sala de periódicos da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, este fato pode ser comprovado pelos sintomas que são desencadeados em pessoas que têm predisposição a alergia e freqüente a referida sala.

Em nosso trabalho, de acordo com a tabela 01, verificamos que o *Aspergillus* sp. um dos principais fungos anemófilos do mundo foi isolado em todas as exposições, demonstrando que ele está constantemente presente na sala de periódicos da biblioteca.

A *Alternaria* sp. é o fungo anemófilo mais isolado nos Estados Unidos, no Ceará segundo o estudo realizado por Menezes *et al.*, (2004)⁹, ele foi isolado em pequena freqüência. Em nosso trabalho, também foi isolada apenas em cinco placas. Gambale (1976)¹¹, foi o pioneiro no estudo de fungos anemófilos no Brasil, realizando 429 exposições de placas de Petri, contendo agar Sabouraud, em 11 locais da Grande São Paulo, verificou a incidência de 17% de fungos do gênero *Alternaria* sp.. Fato digno de registro, pois a maioria dos trabalhos assinalam uma pequena freqüência, na biblioteca observamos 10%.

Machado (1979)¹², em 12 áreas do grande Recife (Pernambuco), verificou que os fungos mais freqüentemente isolados do ar atmosférico enquadravam-se nos gêneros *Aspergillus* (58,9%), *Penicillium* (41,4%), *Candida* sp. (30,6%), *Cladosporium* (20,8%), *Fusarium* (19,6%), *Phoma* (19,4%), *Curvularia* (18,9%) e outros, com menor incidência.

Medrano (1979)¹³, em Ciudad Bolívar (Venezuela), verificou maior predominância de fungos dos gêneros *Cladosporium*, *Aureobasidium* e *Alternaria* no ar atmosférico daquela cidade. Na cidade de Recife (Pernambuco, Brasil), Lima & Gadelha (1983)¹⁴, verificaram a predominância, no ar atmosférico desta cidade, de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Phoma*.

Silva (1982)¹⁵, estudou a microbiota fúngica do ar e de pisos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte). Perfazendo um total de 2940 colheitas entre 9064 colônias isoladas, foram identificados vários fungos anemófilos, principalmente *Mycelia sterilia* (26,90%), *Cladosporium* sp. (65,03%), *Aspergillus* sp. (37,08%), *Fusarium* sp. (22,10%), *Penicillium* sp. (19,86%), *Aureobasidium* sp. (18,40%), *Curvularia* sp. (16,20) e *Nigrospora* sp. (15,30%). O presente trabalho com extensa literatura sobre o assunto, é de real interesse para todos aqueles que tratam de infecções hospitalares por fungos oportunistas.

Fiorini (1985)¹⁶, na cidade de Alfenas (MG), nos os meses de setembro a novembro de 1984, expôs ao ar 80 placas de Petri, em diversos locais, por um período de 20 minutos, identificando os seguintes fungos: *Cladosporium* sp. (35,8%), *Penicillium* sp. (16,7%), *Alternaria* sp. (9,1%), *Aspergillus* sp. (7,8%), *Oospora* sp. (5,4%), *Geotrichum* sp. (2,7%), *Mucor* sp. (0,5%) e fungos não-identificados (15,6%). Mohovic *et al.* (1988)⁵, trabalhando com 201 pacientes com

asma brônquica e/ou rinite alérgica, realizaram testes intradérmicos com extratos alergênicos de 42 fungos isolados no ar de São Paulo. Inicialmente, foram submetidos às referidas provas com um antígeno polivalente, obtendo-se 70 positivos (34,8%). A seguir, os reagentes positivos foram examinados com 42 extratos individuais e 74,3% deles reagiram positivamente a um ou mais dos extratos. Os controles reagiram negativamente aos diversos extratos. Assinala-se que os autores trabalharam com maior número de extratos de fungos, com isso, aumentou-se as possibilidades diagnósticas.

Oliveira *et al.* (1993)², em Natal, também verificaram que os fungos mais prevalentes foram o *Aspergillus* e o *Penicillium*. Ibañez-Henriquez (1993)¹⁷, em tese de mestrado apresentada à Universidade do Chile, estudou a flutuação estacional de bioalérgenos fúngicos entre 1991 e 1992, em Santiago do Chile (Norte), com especial referência ao gênero *Aspergillus*. Monitorizando as amostras de ar, em dez lugares diferentes, durante 52 semanas, foram coletadas 1040 amostras de fungos, com predominância dos gêneros *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis* e *Epicoccum*. Tais fungos anemófilos, aumentam sua concentração no verão, sofrendo decisiva influência da luz solar e temperatura.

Gambale *et al.* (1993)¹⁸ investigaram a microbiota fúngica do ar e de livros em 28 bibliotecas da Universidade de São Paulo, verificando que os fungos mais freqüentes do ar pertenciam aos gêneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Neurospora*, *Trichoderma*, *Rizhopus*, *Phoma*, *Monascus*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Nigrospora*, *Acremonium*, *Geotrichum*, *Helminthosporium* e outros não-esporulados (*Mycelia sterilia*). Dos livros predominaram *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*. Em uma etapa posterior, 314 bibliotecários foram interrogados quanto à presença de sintomas de rinite ou asma, em relação ao seu ambiente de trabalho. Desses, 154 (49%) referiam sintomas de rinite ou de asma, dos quais 80% relacionados ao ambiente de trabalho. Em uma etapa final os bibliotecários foram submetidos à prova cutânea com um "pool" de 20 alérgenos fúngicos mais freqüentemente encontrados nas bibliotecas, resultando 18 bibliotecários com provas cutâneas positivas, dos quais, 12 referiram rinite e seis eram assintomáticos.

A sala de periódicos da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará é um local insalubre, pois contém grande quantidade de fungos filamentosos veiculados pelo ar ambiental que podem desencadear uma alergia respiratória nos freqüentadores da referida sala. É importante também reportar aqui a predisposição genética dos freqüentadores.

AGRADECIMENTOS

Os pesquisadores agradecem aos funcionários da biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, principalmente sua diretora a bibliotecária Norma de Carvalho Linhares, que de forma direta proporcionaram condições para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Mezzari, A.; Perin, C.; Junior, S.A.S.; Bernd, L.A.G.; Di Gesu, G. Fungos Anemófilos e Sensibilização em Indivíduos Atópicos em Porto Alegre. Rev. Inst. Medicina Tropical 2002, 44 (5):269-272.
2. Oliveira, M.T.B.; Braz, R.F.S.; Ribeiro, M.A.G. Airborne fungi isolated from Natal, State of Rio Grande do Norte -Brazil, Rev. de Microbiologia 1993 24 (3):

- 198-202.
3. AL-Doory, Y. & Domson, J.F. Mould Allergy. Philadelphia, Ed. Lea e Feigh, 1984.
4. Kramer, C.L.; Pady, S.M.; Wiley, B.J. Kansas aeromycology XIV – Diurnal studies. Trans. Acad. Sci. 1984, 67:442-447
5. Mohovic, J.; Gambale, W.; CROCE, J. Cutaneous positivity in patients with respiratory allergens to 42 allergenic extracts of airborne fungi isolated in São Paulo, Brasil. Allergol. Immunopathol. 1988, 16: 397-402.
6. Gambale, W.; Purchio, A.; Paula, C.R. Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil. Rev. Microbiol. 1983 14: 204-14.
7. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Vaccari, E.M.H., Melo, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz, 9ª.ed, Editora Savier. São Paulo. 2002. 810-35.
8. Neufeld, P.M.. Manual de Micologia Médica – Técnicas básicas de diagnóstico. 1ª. Edição, Editora PNCQ, Rio de Janeiro. 1999.
9. Menezes, E.A.; Trindade, E.C.P.; Costa, M.M.; Freire, C.C.F.; Cavalcante, M.S.; Cunha, F.A. Airborne fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceará, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2004; 46(3): 133-137.
10. Menezes, E.A.; Gambale, W.; Macedo, M.S.; Castro, F.; Paula, C.R.; Croce, J. Characterization of allergenic fractions from Drechlera monoceras. J. invest. Allergol. Clin. Immunol. 1998, 8 (4): 214-18.
11. Gambale, W. Contribuição ao estudo da flora anemófila da Grande São Paulo. São Paulo (tese de Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo (São Paulo): Universidade de São Paulo; 1976
12. Machado, G.M.R. Fungos Anemófilos de áreas do grande Recife. Estudo qualitativo e quantitativo. (Tese de Mestrado) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1979
13. Medrano, P.C.E. Determinación genérica de los hongos aislados del aire de Ciudad Bolívar durante el período comprendido entre los meses de noviembre de 1978 a octubre de 1979. Ciudad Bolívar, Escuela de Medicina, 1979
14. Lima, J.A. & Gadelha, W. Contaminação de hongos del aire atmosférico em la ciudad de Recife (Pernambuco-Brasil). Rev. lat. amer. Microb., 1983, 25: 243-251.
15. Silva, M.G. Estudo da flora fúngica do ar e do piso do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Minas Gerais (tese de Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas: Universidade Federal de Minas Gerais; 1982.
16. Fiorine, J.E. Incidência de fungos anemófilos em Alfenas, Minas Gerais. Rev. Esc. Farm. Odont. Alfenas, 1985, 8: 59-70.
17. Ibañez-Henriquez, A. Flutuacione estacional di bioalergnos fungicos entre 1991 e 1992 in Santiago – Chile. (Tese de Mestrado). Santiago – Chile: Universidad di Santiago; 1993.
18. Gambale, W.; Croce, J.; Manso, E.R.C.; Croce, M.; Sales, J.M. Library fungi at the University of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1993; 3:45-50.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Everardo Albuquerque Menezes
Rua Juazeiro do Norte, 199/302
Meireles 60.165-110
Fortaleza - Ceará
Fone: 85 4009-8266
Fax: 85 4009-8292



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Avaliação da intervenção multiprofissional e interdisciplinar na evolução do quadro clínico de pacientes com alto risco de doença arterial coronariana*

Evaluation of multiprofessional and interdisciplinary intervention in the clinical evolution of patients at high risk for coronary artery disease

Geny Aparecida Cantos¹; Claudia de Souza Marques da Silva²; Carmen Dolores de Araujo Waltrick³; Elizabeth M. Hermes³; Albertina Bonetti⁴; Manoela Bagestam⁵ & Cláudia Cavalett⁶

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o sucesso da intervenção multiprofissional e interdisciplinar na evolução do quadro clínico de pacientes com fatores de risco para doença arterial coronariana, considerando em especial a dislipidemia e outras associações de fatores de riscos, conforme o escore de Framingham. Foram analisados 277 pacientes que estavam inseridos no Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa, Extensão e atendimento a Dislipidemia (NIPEAD) - Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina - SC. Destes, 35 (12,6%) apresentavam alto risco para doença arterial coronariana e somente 25 participaram regularmente do programa. Entre estes últimos, a idade foi o fator de risco que mais se destacou, seguido da hipertensão arterial sistêmica e tabagismo. Em seguida, os fatores mais frequentes foram dislipidemias e diabetes. Dos 25 pacientes, 60% obtiveram uma diminuição no risco coronariano, sendo que ainda foi possível observar melhoras nos níveis de colesterol total (68%), colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (64%), colesterol das lipoproteínas de alta densidade (56%) e triglicerídeos (64%). As bases preventivas para doença arterial coronariana, com a identificação dos fatores de risco, permitiu modificar o perfil lipídico e o risco coronariano, sendo que o alcance de tais objetivos depende da adesão do paciente ao programa e do compromisso dos profissionais da saúde com propostas de mudança no estilo de vida destes indivíduos.

PALAVRAS-CHAVE - Doença arterial coronariana; fatores de risco; escore de framingham.

SUMMARY - The aim of this study was to analyze the successful multiprofessional and interdisciplinary intervention in the clinical evolution of patients at high risk for coronary artery disease, with special attention to dyslipidemia and other risk factors, as Framingham score. The study analyzed 277 patients, inserted in the Interdisciplinary Nucleus for Research, Extension and Care for Dyslipidemia (NIPEAD), in the University Hospital of Santa Catarina State University. Among these, 35 presented at high risk for coronary artery disease, and only 25 regularly attended the program. Between these last ones, age was the more relevant risk factor, followed by systemic arterial hypertension and smoking. In addition, other frequent factors were dyslipidemias and diabetes. From these 25 patients, 60% presented reduction in the coronary risk, and it was also possible to detect improvement in total cholesterol levels (68%), low-density-lipoprotein cholesterol (64%), high-density-lipoprotein cholesterol (56%) and triglycerides (64%). Preventive basis for coronary artery disease, with identification of risk factors, made it possible to modify lipidic profile and coronary risk, taking into account that achieving such objectives depends on the adhesion of the patients to the program and the commitment of healthcare professionals with proposals of change in the lifestyle of these individuals.

KEYWORDS - Coronary artery disease; risk factors; framingham score.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares têm papel indiscutível na morbidade e mortalidade do mundo ocidental, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A cardiopatia isquêmica e o acidente vascular cerebral são e serão, de acordo com as projeções para o ano 2020, as principais causas de morte, de anos de vida perdidos e de anos de vida perdidos com incapacitação (Levy *et al.*, 1998). O processo patogênico das lesões ateroscleróticas é complexo, com múltiplas possíveis etiologias, sendo influenciada por uma série de fatores ambientais e genéticos (Pearson *et al.*, 1997). A hiperlipidemia tem sido demonstrada como um fator de risco importante na mortalidade pela doença arterial coronariana (DAC) (Goldman, 2000). A estratificação do risco de desenvolver DAC permite racionalizar a abordagem preventiva. Com base em estudos clínicos, observacionais e prospectivos, é possível classificar indivíduos de acordo com a intensidade e número de fatores de risco causais ou de acordo com a presença de doença cardiovascular manifesta. O escore de Framingham

adotado pelas III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias baseia-se em valores numéricos, positivos e negativos, a partir de zero, de acordo com o risco atribuível aos valores da idade, pressão arterial, colesterol total (CT), colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), tabagismo e diabetes mellitus (DM). A cada escore obtido corresponde um percentual da probabilidade de ocorrência de DAC nos próximos dez anos, com base em dados epidemiológicos. Assim, indivíduos de baixo risco teriam uma probabilidade < que 20%. Essa estratificação determina os valores do perfil lipídico a serem alcançados. Dentre os indivíduos de alto risco estão aqueles com manifestações clínicas de doença aterosclerótica, hipertensos com lesões de órgãos-alvo e diabéticos (SBC, 2001).

No nosso meio, são poucos os estudos que discutem a associação da prevalência de dislipidemia com outros fatores de risco para DAC em uma população específica. A falta de pesquisas sobre fatores de risco na população brasileira resulta em grande desvantagem em relação aos países desenvolvidos. No caso da população economicamente ativa, a falta de dados é dramática, mesmo em setores de grande

Recebido em 04/07/2005

Aprovado em 01/07/2006

*Hospital Universitário (HU) - UFSC

¹Profa. Dra do Departamento de Análises Clínicas (ACL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Florianópolis-SC; ²Cardiologistas do Hospital Universitário (HU) - UFSC; ³Bioquímica do HU - UFSC; ⁴Doutoranda do Depto de Enfermagem - UFSC; ⁵Aluna de extensão - ACL - UFSC; ⁶Aluna de mestrado do curso de Farmácia - UFSC.

importância econômica (Romaldini *et al.*, 2004).

De acordo com o exposto anteriormente, este trabalho considerou a possibilidade de alterações positivas importantes nas concentrações séricas de CT, lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), HDL-c e TG, por meio de ações abrangentes relacionadas ao estilo de vida em um grupo populacional com alto risco para DAC.

METODOLOGIA

Os pacientes que participaram desta pesquisa eram indivíduos de uma comunidade universitária: estudantes (graduação e pós-graduação), professores e servidores, sendo que todos estavam inseridos no Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa Extensão e Atendimento a Dislipidemia (NIPEAD) - Hospital Universitário (HU) - Universidade Federal de Santa Catarina. No período entre março de 1997 a junho de 2004. Foram atendidos 277 indivíduos com idade entre 31 e 74 anos, de ambos os sexos. Todos os indivíduos concordaram em participar espontaneamente desta pesquisa e assinaram o termo de consentimento de acordo com o comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, e tiveram acesso a todos os resultados.

Inicialmente, houve uma avaliação médica, onde foram obtidas informações dos pacientes, como: idade, atividade física, diabetes, tabagismo e valor da pressão arterial. Em seguida, estes indivíduos foram submetidos à realização de exames laboratoriais que foram executados pelo setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do HU. O soro foi colhido após 12 horas de jejum e o inquérito bioquímico consistiu na determinação do CT, pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Cepa Biotecnologia Ltda); TG, pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Dade Behring); HDL-c, através do método de precipitação seletiva, acoplado à dosagem do método enzimático colorimétrico automatizado (Dade Behring); o valor do LDL-c foi obtido pelo cálculo que utiliza a fórmula de Friedewald, sendo válida para valores de TG até 400mg/dL (SBC, 2001). Também, foi dosada a glicemia pelo método da glicose oxidase, enzimático. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi considerada para os pacientes que apresentaram níveis pressóricos iguais ou superiores a 140mmHg de sistólica e 90mmHg de diastólica. O tabagismo foi definido pelo ato de fumar, independente da quantidade de cigarros por dia e do tempo de duração do hábito.

Para avaliar a dislipidemia, foram analisados os níveis do LDL-c, considerando alto os níveis séricos maiores que 160mg/dL e níveis desejáveis os inferiores a 130mg/dL. Para o CT foi considerado valores normais até 200mg/dL e para a fração HDL-c, para os homens > que 35mg/dL e mulheres > 45mg/dL. Os valores de TG foram considerados normais de 10 a 150mg/dL.

Para todos os pacientes foi calculado um valor percentual do risco de desenvolver DAC nos próximos dez anos por meio da tabela do score de Framingham. Cada score obtido correspondia a um percentual de probabilidade de um evento cardiovascular nos próximos 10 anos. Assim, os indivíduos foram inseridos nas seguintes categorias: baixo (<10%), médio (10% a 20%) e alto risco (20%).

Para avaliação do tratamento multiprofissional e interdisciplinar foram considerados apenas 25 indivíduos que apresentavam alto risco coronariano e que participaram regularmente do programa oferecido pelo NIPEAD. Para esta avaliação foram considerados os valores séricos de CT, LDL-c, HDL-c, TG e o risco coronariano. Além disto, foram consideradas as variáveis de risco como idade, HAS, DM e tabagismo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O atual estágio de transição demográfico-epidemiológico pelo qual atravessam as sociedades modernas em desenvolvimento, tem-lhes conferido mudanças nos padrões de morbimortalidade em direção às doenças crônico-degenerativas, destacando-se as doenças cardiovasculares (Moraes *et al.*, 1996). Entre as inúmeras condições associadas à DAC, apontadas na literatura, parece haver unanimidade em considerar a hipertensão arterial, a hipercolesterolemia e o hábito de fumar como os mais potentes fatores de risco para a doença isquêmica do coração (Goldstein, 1992; Therrien & Lavie; Kannel, 1993).

Dentro desta perspectiva, este trabalho considerou os casos de indivíduos que, entre o período de março de 1997 a junho de 2004, procuraram no Hospital Universitário, um serviço especializado em doenças do coração e que tiveram como diagnóstico um quadro de dislipidemia. A partir disto, os mesmos foram convidados a participar do programa do NIPEAD que, por meio de uma equipe multiprofissional e interdisciplinar, vem atuando na prevenção para doenças cardiovasculares.

Considerando que as enfermidades cardiovasculares têm uma etiologia multivariada e que os grandes estudos clássicos (Framingham, Tecumseh) e outros de tipo transversal e retrospectivos têm permitido descobrir associações importantes entre algumas variáveis e eventos cardiovasculares (Dawber, 1980), procedeu-se inicialmente uma classificação dos fatores de riscos dos 277 pacientes atendidos durante este período, conforme a tabela de Framingham. Assim, verificou-se que 50 indivíduos (18,1%) tiveram um baixo risco para DAC em 10 anos (<10%), 192 indivíduos (69,3%) estavam na faixa do risco intermediário (10% a 20%) e 35 indivíduos (12,6%) apresentavam alto risco para DAC (20%). Pelos dados encontrados, pode-se inferir que indivíduos integrantes do NIPEAD apresentam risco moderado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Assim, os resultados desse estudo permitiram identificar um grupo de fatores que predispunham a um maior risco do desenvolvimento para DAC, entre os quais despontavam como mais importantes como faixa etária, sexo, hipercolesterolemia, HAS, DM e tabagismo. A partir da identificação desses fatores, foram selecionados 25 pacientes que apresentaram alto risco para DAC e que participaram regularmente do programa oferecido pelo NIPEAD.

Neste trabalho procurou-se determinar a frequência e a importância com que os principais fatores de risco para DAC apontados na literatura internacional associam-se com a ocorrência de um maior evento arterial coronariano. Há falta de estudo similar, sendo que as campanhas e a política de prevenção para DAC, tanto promovidas pelas agências oficiais como pelas organizações não-governamentais, têm se baseado nos resultados do estudo de Framingham (Silva *et al.*, 1998).

Embora muitos fatores de risco tenham atividade aterogênica autônoma, a associação de um ou mais fatores aumenta enormemente o efeito nefasto sobre o aparelho cardiovascular. Não há uma causa única para as doenças cardiovasculares, mas sabe-se que existem fatores que aumentam a probabilidade de sua ocorrência. São os denominados fatores de risco cardiovascular. Entre estes, os principais são: HAS, dislipidemia, DM e tabagismo. Quanto mais fatores de risco o indivíduo tiver, maior será a chance dele desenvolver uma DAC e evoluir para um quadro de angina ou de infarto (Guimarães, 2002).

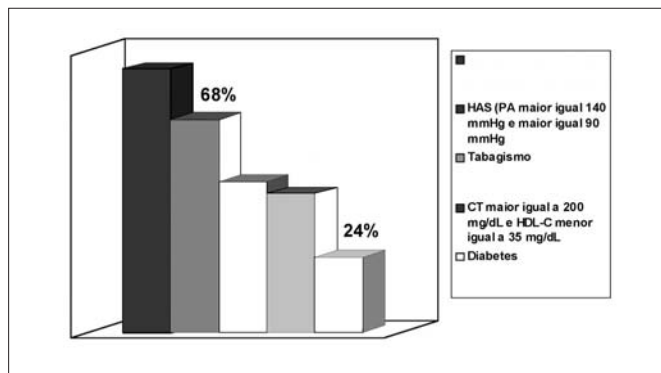


Figura 1: Percentual das variáveis de risco em pacientes de uma comunidade universitária com alto risco para DAC.

A Fig. 1 mostra que nos indivíduos de maior risco de desenvolvimento para DAC, a idade foi um fator de importante análise. Pode-se notar que 84% dos pacientes tinham idade considerada como risco para DAC. Todos os homens e mulheres tinham idade superior a 45 e 55 anos, respectivamente.

No Brasil, investigações de grupo etário são importantes, principalmente em Estados com um contingente significativo de idosos, uma vez que, associado ao fenômeno do envelhecimento populacional, ocorre aumento na prevalência de doenças crônico-degenerativas associadas à idade, principalmente as doenças cardiovasculares (Marafon *et al.*, 2003). Por outro lado, é possível que na fase de menopausa, nas mulheres por volta dos 50 anos, ocorra aumento da obesidade, hipertensão e dislipidemia. No sexo masculino, o número médio de fatores de risco atinge o ponto máximo aos 60 anos e passam a diminuir acentuadamente (Martins *et al.*, 1996).

Embora este fator isoladamente já influencie diretamente no aumento do risco para DAC, é importante considerar que a idade está associada ao enrijecimento da parede arterial e que essa alteração anatômica poderia ocasionar um aumento dos níveis da pressão arterial (Mencken, 2000). A HAS tem sido considerada o maior fator de risco para acidente vascular cerebral (Zétola *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2004) e está presente em cerca de 70% dos casos de doença cardiovascular (Radanovic, 1999, Lessa, 1999). Sousa *et al.*, 2004 avaliaram as pressões sistólica, diastólica e pressão de pulso como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana grave em mulheres com angina instável. Neste trabalho, a HAS em pacientes com alto risco para DAC foi o segundo fator mais freqüente. O tabagismo foi o terceiro fator de risco mais freqüente para DAC, seguido da hipelipidemia secundária e DM (Fig.1). O tabagismo é um fator de risco que chama a atenção, pois depende diretamente do comportamento do indivíduo.

Em diferentes populações, estão bem estabelecidas as correlações entre o risco para DAC e concentrações séricas elevadas de CT, particularmente de LDL-c, assim como, concentrações reduzidas de HDL-c (Menotti, 2000). Vários estudos relacionam as concentrações de colesterol presentes na infância com as encontradas na vida adulta (Webber *et al.*, 1991). Marafon *et al.*, 2003, ao realizar a análise multivariada, observou que o CT e o LDL-c foram marcadores de mortalidade independente das demais variáveis analisadas. Entre os pacientes analisados neste trabalho, 40% apresentavam concomitantemente CT>200mg/dL e HDL-C<35mg/dL (Tab. 1).

O DM, seja ele do tipo 1 ou 2, foi um fator presente em 24% dos pacientes analisados. Neste caso, mesmo com o controle da glicemia, os pacientes apresentavam os níveis séricos

dos CT e TG alterados. O atual levantamento da prevalência de fatores de risco numa subpopulação de indivíduos já com alto risco para doença coronariana e com anormalidades da homeostase glicêmica mostra a importância de diagnosticar essa entidade e, a seguir, rastrear os indivíduos diagnosticados quanto aos demais agravantes freqüentemente presentes. É essencial a identificação desses indivíduos como um grupo-alvo para a tomada de ações preventivas cardiovasculares em nível individual e populacional. Em nível mais precoce ainda, a intervenção ideal é a prevenção do DM, HAS e dislipidemia. Ela pode ser obtida, pelo menos parcialmente, a partir de programas de saúde dirigidos às populações com maior risco para a doença (indivíduos com sobrepeso e obesidade, em especial), que estimulem a atividade física e a redução de peso corporal (Schaan *et al.*, 2004; Cantos *et al.*, 2000).

Tabela I

Avaliação do perfil lipídico e do FRDAC (fator de risco para DAC) de pacientes atendidos no NIPEAD, que apresentavam alto Risco coronariano, considerando o tratamento multiprofissional e interdisciplinar, durante o período de março de 1997 a junho de 2004.

Pacientes	CT		HDL-C		LDL-C		TG		FRDAC	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1	201	216	60	52	126	150	76	72	20%	25%
2	266	267	34	40	170	206	312	106	20%	18%
3	324	241	65	66	242	159	85	80	25%	10%
4	220	167	27	22	175	114	92	156	24%	28%
5	235	173	34	43	147	93	269	186	31%	25%
6	311	356	44	48	209	273	290	177	20%	18%
7	306	293	13	22	0	0	985	685	20%	20%
8	273	252	29	40	210	169	170	215	27%	20%
9	286	301	39	36	226	232	103	166	20%	31%
10	280	197	46	36	204	128	152	163	24%	18%
11*	171	199	34	42	95	137	210	100	16%	16%
12	291	226	47	61	217	148	133	85	28%	15%
13	323	230	42	33	246	0	175	684	37%	53%
14	362	192	40	31	248	135	370	129	27%	28%
15	304	259	47	48	241	191	80	98	31%	25%
16	165	165	18	22	81	78	332	327	20%	31%
17	281	248	32	54	219	172	149	112	24%	18%
18	354	362	32	43	289	279	163	198	20%	15%
19	299	227	34	39	219	144	230	220	31%	20%
20	284	211	34	33	221	151	143	133	25%	16%
21	305	262	65	52	207	174	165	182	20%	20%
22	299	234	10	16	0	143	999	377	20%	13%
23	312	268	54	49	223	189	173	148	20%	13%
24	269	266	43	39	194	204	159	117	20%	18%
25	184	176	27	25	118	110	193	204	25%	25%

Onde, A e D significam os valores bioquímicos obtidos dos pacientes antes e depois do tratamento interdisciplinar e multiprofissional; 0= cálculo do LDL-c impossibilitado pelo valor do TG; *= paciente portador de doença arterial coronariana.

De fato, a literatura mostra que a hipertensão arterial é a maior determinante da ocorrência de eventos cardiovasculares em pacientes com DM do tipo2, sendo duas vezes mais prevalente entre os indivíduos diabéticos, além disso, a sua presença aumenta a ocorrência de complicações micro e macrovasculares, sendo a dislipidemia um importante fator de risco para o DM. (SBC, 2001)

Levando-se em conta que é freqüente a existência de três, quatro ou mais fatores de risco em um mesmo paciente, altamente relacionados entre si, não é difícil compreender a necessidade de intervenções múltiplas. Assim, o desenvolvimento de programas de saúde de caráter preventivo, com enfoque na mudança do estilo de vida, pode ser um meio eficaz para sensibilizar o indivíduo quanto à mudança de hábitos de vida nocivos à saúde (Matos *et al.*, 2004).

Estes últimos têm como alvo a modificação de comportamentos precursores de doenças cardiovasculares, como dieta, exercícios físicos e controle do tabagismo. Segundo Sixt *et al.*, 2004 uma intervenção multifatorial, incluindo medidas dietéticas, controle glicêmico, tratamento anti-hipertensivo e exercícios físicos regulares têm influência positiva nos fatores de risco modificáveis, na melhora de outras funções cardiovasculares e na tolerância ao exercício livre de angina.

Os estudos mais amplos, feitos até agora, mostram um certo benefício no combate aos fatores de risco e servem de base para o tratamento clínico destes fatores. Segundo Goldman, 2000, o benefício é maior nos pacientes que já apresentam alguma forma de aterosclerose, especialmente coronariana.

Neste trabalho, procurou-se realizar intervenções corretivas de forma a reduzir a incidência de coronariopatias. A respeito dos 35 indivíduos que foram classificados como alto risco para DAC, 10 foram excluídos que, por motivos diversos, não puderam comparecer ao exame laboratorial. Assim, a avaliação feita após o tratamento mostrou que 60% dos pacientes melhoraram o percentual de risco coronariano. Diga-se que os pacientes que obtiveram diminuição do risco cardíaco, também foram aqueles que tiveram maior adesão ao atendimento oferecido pelo NIPEAD. Em relação ao perfil lipídico, pode-se notar na Tabela 1 que 68% dos pacientes tiveram uma melhora nos níveis séricos de CT, 64% diminuíram o LDL-c, 56% aumentaram o HDL-c e 64% melhoraram os níveis de TG.

A conscientização por parte das pessoas sobre a presença de fatores de risco coronariano como hipertensão, obesidade, sedentarismo, tabagismo, diabetes e dislipidemia são sinais importantes, ressaltando a necessidade de uma avaliação médica imediata. A extensão dos benefícios da prevenção para DAC depende de um esforço multidisciplinar que envolve sistematização de rotinas, educação médica, interação com a comunidade, educação pública, recursos diagnósticos utilizados de modo racional e, principalmente, extremo empenho por parte da comunidade médica para mudança de toda uma estratégia em prática por uma nova filosofia, baseada em sólidas evidências científicas acumuladas.

Finalmente, em vista da amostra analisada ser representativa da comunidade universitária, todas as conclusões e comentários são extensivos a esta população que, apesar de conviver com profissionais da saúde bastante diferenciados e com portadores de moléstias cardiovasculares resultantes de prevenção inadequada, não difere substancialmente no comportamento em relação a população em geral, necessitando portanto de maiores e mais enfáticas informações. Onde, A e D significam os valores bioquímicos obtidos dos pacientes antes e depois do tratamento interdisciplinar e multiprofissional; 0= cálculo do LDL-c impossibilitado pelo valor do TG; * = paciente portador de doença arterial coronariana.

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo confirmam que a detecção e o controle dos fatores de risco são tarefas prioritárias na prevenção da evolução da DAC, havendo, assim, necessidade de buscar medidas preventivas e educativas que conduzam a mudanças no estilo de vida desses indivíduos.

REFERÊNCIAS

1. Cantos, G.A.; Amaral, J.A.; Massarollo E. Diabetes mellitus e sua correlação com níveis de lipídeos e lipoproteínas. Laes & Haes, v.5, p.178-188, 2000.
2. Dawber, T.R. The framingham study. Cambridge, Harvard University Press, 1980.
3. Goldstein, M. R. Cholesterol inhibition, cancer and coronary heart disease. Rev. Lancet, v.340, p.127-128, 1992.
4. Goldman, L.; Coxon P.; Hunink, G.M. A influência relativa da prevenção primária versus secundária utilizando as diretrizes do painel II para o tratamento de adultos do programa nacional de educação do colesterol (NCEP). Rev. J. Amer. Coll. Cardiol, v.6, n.2. p. 50-59, 2000.
5. Guimarães, A. C. Prevenção de doenças cardiovasculares no século 21. Hipertensão, v. 5, n. 3, 2002.
6. Kannel, W. B. Hypertension as a risk factor for cardiac events. Epidemiologic results of long-term studies. J. Cardiovasc. Pharmacol., v.21, p.27-37, 1993.
7. Lessa, I. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil. Rev. Soc. Cardiol. Estado São Paulo, v.4 p.509-518, 1999.
8. Levy, D.; Wilson, W. F. Atherosclerotic cardiovascular disease - an epidemiologic perspective. In: Topol EJ, editores. Textbook of Cardiovascular Medicine. 2ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raver, p.13-29, 1998.
9. Matos, M. F. D.; Silva, N. A. S.; Pimenta, A. J. M. et al. Prevalência dos fatores de risco para doença cardiovascular em funcionários do Centro de Pesquisas da Petrobras. Arq. Bras. Cardiol., v.82, n.1, p.1-4, 2004.
10. Marafon, L. P.; Cruz, I. B. M.; Schwanke, C. H. A. et al. Preditores cardiovasculares da mortalidade em idosos longevos. Rev. Cad. Saúde Pública, v.19, n.3, p.799-807, 2003.
11. Martins, I. S.; Marucci, M. F. N.; Cervato, A. M. et al. Doenças cardiovasculares ateroscleróticas, dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes melito em população da área metropolitana da região Sudeste do Brasil: II - Dislipidemias. Rev. Saúde Pública, v.30, n.1, p.75-84, 1996.
12. Mencken, H. L. There is a non-linear relationship between mortality and blood pressure. Euro. Heart J., v.21 p.1635-1638, 2000.
13. Menotti, A.; Lanti, M.; Puddu, P. E.; Kromhout, D. Coronary heart disease incidence in northern and southern European population: a reanalysis of seven countries study for a European coronary risk chart heart. v.84 p.238-244, 2000.
14. Moraes, S. A.; Souza, J. M. P. Efeito dose-resposta de fatores de risco para a doença isquêmica do coração. Rev. Saúde Pública, v.30, n.5, p.471-478, 1996.
15. Pearson, T. A.; Crique, M. H.; Lueque, R. V., et al. Compêndio de cardiologia Científica Preventiva. Ed. de Publicações Ltda, p1-81, 1997.
16. Pires, S. I.; Gagliardi, R. J.; Gorzoni, M. L. Estudo das frequências dos principais fatores de risco para acidente vascular cerebral isquêmico em idosos. Arq. Neuro-Psiquiatr. v.62, n.3, p.844-851, 2004.
17. Radanovic, M. Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário. Arq Neuropsiquiatr., v.58 p.99-106, 1999.
18. Romaldini, C. C.; Issler, H.; Cardoso, A. L. et al. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana prematura. J. Pediatr., v.80, n.2, p.135-140, 2004.
19. SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Resumo das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq. Bras. Cardiol, v.77, p.1-48, 2001.
20. Silva, M. A. D.; Sousa, A. G. M. R.; Schardegosky, H.; Fatores de risco para infarto do miocárdio no Brasil: estudo FRICAS. Arq. Bras. Cardiol., v.71, n.5, p.667-675, 1998.
21. Sixt, S.; Korff, N.; Schuler, G. et al. Opções terapêuticas atuais para diabetes mellitus tipo 2 e doença arterial coronariana: prevenção secundária intensiva focada no treinamento físico versus revascularização percutânea ou cirúrgica. Rev Bras Med Esporte, v.10, n.3, p.220-223, 2004.
22. Sousa, J. M. A.; Hermann, J. L. V.; Guimarães, J. B. et al. Avaliação das pressões sistólica, diastólica e pressão de pulso como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana grave em mulheres com angina instável ou infarto agudo do miocárdio sem supradesnivelamento do segmento ST. Arq. Bras. Cardiol., v.82, n.5, p.426-429, 2004.
23. Schaan, B. D.; Harzheim, E.; Gus, I. Perfil de risco cardíaco no diabetes mellitus e na glicemia de jejum alterada. Rev. Saúde Pública, v.38, n.4, p.529-536, 2004.
24. Therrien J. M. & Lavie, C. J. Smoking and ischemic heart disease. Postgrad. Med., v.91 p.74-76, 1992.
25. Webber L. S.; Srinivasan S. R; Wattigney W. A.; Berenson G. S. Tracking of serum lipids and lipoproteins childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. Am J Epidemiol., v.133, p.884-899, 1991.
26. Zétola, V. H.; Flumignam, N. E. M.; Camargo, C. H. F. et al. Acidente vascular cerebral em pacientes jovens: análise de 164 casos. Arq. Neuro-Psiquiatr. v.59, n.3, p.740-745, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Geny Aparecida Cantos
Rua Maestro Aldo Krieger, 138/106
Córrego Grande Cep. 88037-500 Florianópolis - SC

Interferência do consumo de Chimarrão nos níveis de ácido hipúrico urinário*

“Chimarrão” consumption interference and hippuric acid urine levels

Estefânia Perin Fonseca¹, Ingrid Johann^{1,2}, Ana Paula Alegretti¹ & Flavia Valladão Thiesen^{1,2}

RESUMO - O ácido hipúrico (AH) é empregado como indicador de exposição ocupacional ao tolueno, uma vez que é seu principal metabólito na urina. Contudo, o AH pode ser originado também do ácido benzóico, presente em algumas frutas e alimentos. Considerando que a erva-mate apresenta entre seus constituintes precursores do ácido benzóico, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a provável interferência do consumo de chimarrão nos níveis de AH urinário. Foram analisadas 70 amostras de urina de indivíduos não expostos ao tolueno ou qualquer alimento rico em seus precursores. O AH foi determinado por cromatografia gasosa e os resultados corrigidos pela creatinina urinária. A média dos resultados foi significativamente maior entre os consumidores de chimarrão (média = 1,40 ± erro padrão = 0,2953), demonstrando que o consumo recente desta bebida pode interferir nos resultados de AH urinário. São necessários estudos adicionais para avaliar a interferência do tipo de erva-mate e do padrão de consumo.

PALAVRAS-CHAVE - ácido benzóico, ácido hipúrico, erva-mate, tolueno, interferentes

SUMMARY - Hippuric acid, toluene's urinary main metabolite, is used as a biomarker for toluene occupational exposure. However, hippuric acid may be also originated from benzoic acid present in some fruits and food. Considering that *Ilex paraguariensis* has some precursors of benzoic acid among its constituents, this study investigated the influence of chimarrão, a typical tea-like beverage made from *Ilex paraguariensis* and frequently used in southern Brazil, in urinary hippuric acid background levels. Seventy urine samples from non-exposed toluene individuals or any food rich in toluene's precursors were analyzed. Hippuric acid was measured by gas chromatography and the results were corrected by urine creatinine. Urinary hippuric acid mean results were higher among chimarrão consumers (mean = 1.40 ± standard error = 0.2953), indicating that recent consume of this beverage may influence in urinary hippuric acid measures. Additional studies to evaluate the influence of *Ilex paraguariensis* commercial brands and use patterns are necessary.

KEYWORDS - benzoic acid; hippuric acid; toluene; *Ilex paraguariensis*; background levels

INTRODUÇÃO

Tolueno (metilbenzeno, fenilmetano, toluol) é um hidrocarboneto aromático volátil e incolor, com amplo uso industrial, naturalmente presente no petróleo. É um dos solventes produzidos em maior quantidade, e cerca de 92% do tolueno obtido é utilizado na produção de gasolina. O restante, purificado como tolueno comercial, é empregado na produção de produtos químicos^{7,8,16}. Tendo em vista seus efeitos tóxicos, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7), da Secretaria de Segurança e Medicina do Trabalho do Ministério do Trabalho, determina que todos os trabalhadores com risco de exposição ao tolueno realizem a monitorização biológica por meio de exames toxicológicos para avaliar seu grau de exposição a este solvente⁵. Esta mesma legislação define o ácido hipúrico (AH) urinário como indicador de exposição ocupacional ao tolueno, uma vez que é seu principal metabólito na urina e, apesar de não ser específico, apresenta excelente relação com os níveis ambientais deste solvente¹¹.

A formação do AH se dá devido à biotransformação do tolueno. Inicialmente, o tolueno é metabolizado a álcool benzílico, pelo sistema microsossomal hepático de oxidasas de função mista, e, a seguir, é oxidado a benzaldeído e, então, a ácido benzóico pelo álcool e aldeído desidrogenase, respectivamente. Assim, cerca de 80% do tolueno absorvido é oxidado a ácido benzóico, que é conjugado com a glicina, produzindo ácido hipúrico, o qual é excretado na urina, apresentando uma meia-vida de excreção de 2 a 3 horas^{4,10,12,16,17}.

De acordo com a NR-7, considera-se como valor de referência (VR) e índice biológico máximo permitido (IBMP) níveis de AH urinário de até 1,5 e 2,5 g/g de creatinina respectivamente⁵.

Os valores de referência são quesitos indispensáveis à mo-

nitorização biológica de xenobióticos. O nível de um indicador biológico nos indivíduos expostos auxilia no estabelecimento de estratégias de controle¹³ e seus interferentes devem ser conhecidos.

No caso do tolueno, o AH é também um metabólito natural do organismo humano, podendo se originar de dietas ricas em alimentos que contenham ácido benzóico e/ou seus precursores^{9,14}. Assim, a ingestão de grandes quantidades de refrigerantes ou enlatados, conservados com ácido benzóico, café, chá da Índia e ameixas, pode elevar os níveis de ácido hipúrico na urina¹⁶.

Além disto, com a melhora das condições no ambiente de trabalho e com o uso de equipamentos de proteção adequados, as concentrações urinárias de biomarcadores têm sido próximas aos valores de indivíduos não expostos. Por isso, é importante esclarecer a origem dos níveis de biomarcadores e outros fatores que possam afetá-los, a fim de realizar uma correta interpretação dos dados obtidos através de análises toxicológicas.

Ao observar resultados de análises realizadas na rotina do laboratório de análises toxicológicas do Instituto de Toxicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, quando foram detectados níveis alterados de AH em indivíduos não expostos ao tolueno ou aos interferentes conhecidos, formulou-se a hipótese de que o consumo de erva-mate como infusão (chimarrão) poderia elevar os níveis de AH urinário.

O consumo de chimarrão é um hábito muito antigo que até hoje caracteriza as populações de todo o Cone Sul, região que inclui a área de distribuição natural da espécie da qual a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.) é obtida. A erva-mate apresenta, entre seus constituintes, fenóis e ácidos fenólicos como ácido p-hidroxibenzóico e o p-hidroxibenzóico.

Recebido em 25/07/2005

Aprovado em 01/07/2006

¹ Instituto de Toxicologia

² Faculdade de Farmácia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

benzil benzoato, ácido clorogênico e seu derivado ácido quínico; flavonóides como antocianinas (perlagonidina e cianidina), flavonóis (rutina), terpenóides (ácido ursólico), metilxantinas (cafeína), aminoácidos (glicina, alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, tirosina, e valina), ácidos graxos (ácido linoleico, heptadecanóico, láurico), álcoois, alcanos e carboidratos (glicose, sacarose)^{1,9}.

Este trabalho teve como objetivo avaliar se o consumo de chimarrão, em função da sua composição natural, pode interferir na análise de AH urinário, ao aumentar seus níveis nos indivíduos não expostos ao tolueno.

MATERIAIS E MÉTODOS

População investigada

Foram analisadas amostras de urina de 70 indivíduos saudáveis não expostos ao tolueno ou qualquer alimento rico em ácido benzóico e/ou seus precursores nos três dias que antecederam a coleta. Destes, 28 consumiam chimarrão diariamente e 42 não consumiam ou não haviam consumido chimarrão nos três dias anteriores à pesquisa. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Informado e responderam a um questionário, onde forneceram informações como: sexo, idade, quantidade e frequência de consumo do chimarrão, data e horário da última ingestão, uso de tabaco e medicamentos, contato com substâncias contendo tolueno, ingestão de alimentos com conservantes ou precursores do AH. Todas as amostras foram coletadas pela manhã, visando eliminar a interferência do ciclo circadiano. Foi critério de exclusão o consumo de medicamentos que pudessem interferir nos resultados.

Determinação do Ácido Hipúrico Urinário

As amostras de urina foram acidificadas e extraídas com acetato de etila e, após derivação, o metabólito foi extraído com clorofórmio. A fase orgânica foi analisada em cromatógrafo a gás Varian, modelo 3300, com detector de ionização de chama e coluna megabore DB-5, 30m. Os resultados foram corrigidos pela creatinina urinária, determinada através do método de Jaffé, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível Varian, modelo Cary 1E, a 510nm.

Análise Estatística

A comparação dos níveis de AH entre indivíduos expostos e não-expostos ao chimarrão foi feita através do Teste t de Student para amostras independentes, utilizando o programa SPSS versão 11.5. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Conforme apresentado na Tabela I, houve diferença significativa nos níveis médios de AH detectados nos grupos avaliados e os valores médios foram superiores no grupo de consumidores diários de chimarrão.

Tabela I

Níveis médios de ácido hipúrico em indivíduos não consumidores e consumidores diários de chimarrão

	Número de indivíduos	Média (ácido hipúrico /g creatinina)	Erro Padrão
Não consumidores	42	0,35	0,0546
Consumidores	28	1,40*	0,2953

* valores significativamente diferentes do grupo de não expostos, $p < 0,002$.

Dentre os participantes que não consumiram chimarrão nos últimos três dias anteriores à análise, todos apresentaram resultados dentro dos parâmetros de normalidade (até 1,5 g/g creatinina). Das 28 amostras de consumidores diários de chimarrão, 67,9% apresentaram concentrações de AH urinário dentro dos parâmetros de normalidade; 10,7%, concentrações entre 1,5 e 2,5 g/g creatinina; e 21,4%, concentrações acima do IBMP (2,5g/g creatinina), indicando que o consumo recente de chimarrão pode gerar alguns resultados falsos-positivos em análises laboratoriais que utilizam os níveis de ácido hipúrico urinário como indicadores de exposição ao tolueno.

DISCUSSÃO

O AH urinário é usado como indicador biológico de exposição ao tolueno^{5,12}, mas sabe-se que este analito também pode ser originado da conjugação do ácido benzóico com a glicina, os quais são constituintes frequentes de alguns tipos de alimentos. Portanto, a excreção urinária de AH pode ser influenciada pela quantidade de glicina e ácido benzóico, ingeridos através da dieta. Em alguns casos, o ácido benzóico não faz parte da composição dos alimentos, porém pode ser originado do metabolismo de seus precursores, os quais estão presentes em alguns componentes da dieta^{15,16}. O chimarrão, bebida típica no Rio Grande do Sul, é preparado através da infusão das folhas de erva-mate (espécie *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., família Aquifoliaceae), vegetal comumente encontrado no Cone Sul¹. A presença de AH, glicina e conjugados dos ácidos hidroxibenzóico e metilbenzóico na urina de homens e animais têm sido associada ao metabolismo de flavonóides pela flora intestinal. Sabe-se que a erva-mate apresenta flavonóides em sua constituição natural², os quais poderão ser responsáveis pelos níveis aumentados de AH encontrados em alguns consumidores de chimarrão. Adicionalmente, a ingestão de ácido quínico pelo homem também pode aumentar significativamente a excreção urinária de AH, sendo esta excreção proporcional à dose de ácido quínico ingerida. Os ácidos clorogênicos, onde se enquadra o ácido quínico, são encontrados em alguns chás (por exemplo, no chá preto), e a *Ilex paraguariensis* possui concentrações deste componente superiores às presentes na maioria dos chás², o que provavelmente também pode estar relacionado aos níveis aumentados de AH na urina de consumidores de bebidas à base de erva-mate. Considerando que o consumo destas bebidas é extremamente frequente no Sul do país, é compreensível que ocorra aumento da excreção de AH urinário em função da constituição natural da planta, seja devido à presença de flavonóides, seja devido à presença de ácido quínico.

Além disto, a disponibilidade de glicina controla a formação de AH² e a glicina é um dos aminoácidos presentes na erva-mate. Pode-se supor, então, que a conjugação com um precursor do ácido benzóico também esteja relacionada ao aumento na formação de AH.

Desta forma, o fato da média dos níveis de AH urinário ter sido significativamente maior no grupo de consumidores diários de chimarrão pode ser explicado pela presença de glicina, ácido quínico e flavonóides na erva-mate.

No entanto, alguns indivíduos que consumiram chimarrão previamente à colheita das amostras não apresentaram níveis aumentados de AH urinário. Este resultado não surpreendeu, pois na prática também é possível verificar que nem todos os consumidores de chimarrão apresentam níveis elevados de AH. Porém, é necessário investigar a cau-

sa desta diferença nos resultados entre consumidores recentes de chimarrão; é provável que existam variações nos padrões de biotransformação devido à diferenças genéticas, ou que interações com alimentos ou fármacos estejam envolvidos nestes casos. O consumo de glicina originado de outras fontes, além do chimarrão, também pode influenciar, possibilitando o aumento de ácido hipúrico originado, uma vez que sua presença é indispensável na formação deste metabólito.

Salienta-se que, no grupo dos indivíduos que não consumiram chimarrão recentemente, nenhum apresentou níveis alterados, enquanto que nove indivíduos apresentaram níveis elevados de AH urinário dentre os 28 consumidores diários de chimarrão investigados. Cabe salientar que só participaram deste estudo indivíduos que informaram não haver consumido recentemente nenhum alimento ou medicamento que pudesse resultar em aumento dos níveis de ácido hipúrico. Estes dados permitem concluir que o consumo de chimarrão pode interferir nos resultados através do aumento dos níveis de AH na urina. Em toxicologia ocupacional, níveis de AH acima de 1,5 g/g creatinina são interpretados como exposição ao tolueno, caso seja descartada a exposição a interferentes. Desta forma, é fundamental investigar se o indivíduo consumiu chimarrão recentemente no caso da presença de resultados alterados ou inconsistentes com os detectados nos demais trabalhadores avaliados. O consumo de chimarrão pode aumentar a excreção de AH na urina e deve ser investigado em todos trabalhadores que apresentam níveis elevados de AH, a fim de evitar erros na interpretação dos resultados destas análises toxicológicas. São necessários estudos adicionais para verificar de que forma o tipo de erva-mate consumida e o padrão de uso de outras bebidas à base de erva-mate interferem nos resultados encontrados, bem como o motivo de apenas alguns indivíduos apresentaram níveis alterados de AH.

REFERÊNCIAS

1. Alikaridis F. Natural constituents of Ilex Species. *J Ethnopharmacol*, 20: 121-144, 1987.
2. Alvarez-Leite E.M.; Duarte A.; Barroca M.M. Influência de fatores individuais sobre o valor de ácido hipúrico urinário em indivíduos não expostos ocupacionalmente ao tolueno, residentes na região metropolitana de Belo Horizonte-Brasil. *Rev Bras Toxicol*, 15 (2):87-91, 2002.

3. Alvarez-Leite E.M.; Duarte A.; Barroca M.M.; Silveira J.N. Possible effects of drinking and smoking habits on hippuric acid levels in urine of adults with no occupational toluene exposure. *J Occup Health*, 41: 112-114, 1999.
4. Baselt R.C.; Cravey R.H. Toluene. In: Baselt R.C.; Cravey R.H. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 5a ed., Chicago: Year Book Medical. p. 840-844, 2000.
5. Campanhole A.; Campanhole H.L. Consolidação das Leis do Trabalho. 70ª ed., São Paulo: Editora Atlas S.A., 1986.
6. Clifford M.N.; Copeland E.L.; Bloxsidge J.P. Hippuric acid as a major excretion product associate with black tea consumption. *Xenobiotica*, 30:317-326, 2000.
7. Eisenberg D.P. Neurotoxicity and mechanism of toluene abuse. *Einstein Quar J Biol Med*, 19:150-159, 2003.
8. Hjelm E.W.; Löf A.; Sato A. Dietary and ethanol induced alterations of the toxicokinetics of toluene in humans. *Occup Environm Med*, 51:487-491, 1994.
9. Kawamoto T.; Koga M.; Oyama T. Habitual and genetic factors that affect urinary background levels of biomarkers for organic solvent exposure. *Arch Environm Contam Toxicol*, 30:114-120, 1996.
10. Kawamoto T.; Matsuno K.; Kodama Y. ALDH2 polymorphism and biological monitoring of toluene. *Arch Environm Health*, 49:332-335, 1994.
11. Leite J.A.; Moaris A.R.; Vivanco M.J.F.; Siqueira M.E.P.B. Valores de referência de bioindicadores: avaliação estatística no caso do ácido hipúrico urinário. *Rev Bras An Clíin*, 37(1):41-44, 2005.
12. Oga S. Fundamentos de Toxicologia. 2ª ed., São Paulo: Atheneu Editora; 2003.
13. Oliveira D.P.; Siqueira M.E.P.B. Valores de referência e bioindicadores: uma visão geral. *Rev Bras Toxicol*, 16(1):49-53, 2003.
14. Page D.B.; Conacher H.B.S.; Weber D. A survey of benzene in fruits and retail fruit juices, fruit drinks, and soft drinks. *J AOAC Intern*, 75:334-340, 1992;
15. Simões C.M.O.; Schenkel E.P.; Gosmann G. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 1ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS e UFSC; 1999.
16. Sugita M.; Aikawa H.; Suzuki K. Urinary hippuric acid excretion in everyday life. *Tokai Exp Clin Med*, 13:185-19, 1988.
17. Tremblay G.C.; Qureshi I.A. The biochemistry and toxicology of benzoic acid to the elimination of waste nitrogen. *Pharmac Ther*, 60:63-90, 1993.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Flavia Valladão Thiesen
Faculdade de Farmácia e Instituto de Toxicologia/PUCRS
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12.A
CEP. 960619-900 - Porto Alegre - RS

IFCC WORLDLAB

Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Estudo da função tireoidiana de pacientes do sexo feminino da unidade básica de saúde da cidade de Campo Bom/ RS

Study of the thyroid function in patients' of the feminine sex of the basic unit of health of the city of Campo Bom/RS

Gustavo Müller Lara¹ & Fernanda Deitos²

RESUMO - Os hormônios tireoideanos são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos. A prevalência de transtornos tireoideanos depende de fatores étnicos, do nível de ingestão de iodo e ainda do modelo de estudo utilizado em uma determinada população. A disfunção subclínica da tireóide pode ser diagnosticada por testes de função tireoideana antes mesmo dos sintomas e complicações ocorrerem; por isso considera-se muito importante a verificação do perfil tireoideano em mulheres a partir de 35 anos, buscando assim uma prevenção de possíveis alterações hormonais decorrentes da idade. Foi realizado um estudo transversal com amostras composta por todos os pacientes do sexo feminino (n=156) acima de 35 anos (média 49 anos), que tiveram solicitação de testes de hormônios tireoideanos, no período de setembro de 2004 a abril de 2005. Com base nos resultados obtidos concluiu-se que para a população de faixa etária entre 35 a 44 anos não há necessidade de realizar periodicamente uma triagem hormonal para verificação da função tireoideana mas, acima desta faixa etária, torna-se indispensável esta verificação, e, também, não haver diferença significativa entre a média dos valores hormonais por faixa etária.

PALAVRAS-CHAVE - Tireóide, Hormônios tireoideanos, hipotireoidismo, hipertireoidismo, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto.

SUMMARY - The thyroid hormones are fundamental for the growth and development of several organs and tissues. The prevalence of thyroid disorders depends on ethnic factors, of the level of iodine ingestion and still of the study model used in a certain population. The subclinical dysfunction of the thyroid can be diagnosed before even of the symptoms and complications happen by tests of thyroid function, that he is considered very important to the verification of the thyroid profile in women starting from 35 years old, looking for like this a prevention of possible hormonal alterations current of the age. A prevalence study was accomplished with samples composed by all the patients of the feminine sex (n=156) above 35 years old (average 49 years old), that they have solicitation of thyroid hormones, in the period of September of 2004 to April of 2005. With base in the obtained results was ended that for the age group population among 35 to 44 years old there is not need to accomplish a hormonal screening periodically for verification of the thyroid function, but above this age group she becomes indispensable this verification, and also there not to be significant difference among the average of the hormonal values for age group.

KEYWORDS - Thyroid, thyroid hormones, hypothyroidism, hyperthyroidism, Graves Disease, Hashimoto's thyroid.

INTRODUÇÃO

Na grande maioria das vezes, a anamnese e o exame físico conduzem ao diagnóstico das tireopatias mas com o advento de modernas técnicas de dosagens hormonais e refinamento dos diagnósticos de imagem, a propedêutica das doenças tireoidianas vêm sendo sofisticadas progressivamente^{1,2,22}. Em base neste fato o diagnóstico laboratorial para os transtornos tireoideanos frequentemente deveriam ser iniciados através da pesquisa do TSH^{5,9,10}. Segundo a ATA (American Thyroid Association) uma vez que este se encontra dentro da faixa de referência, não se tornam necessárias mais avaliações laboratoriais, mas quando os valores de referência são rompidos a pesquisa clínica continua através da medida de T4 livre ou T4 total¹³.

Entre os transtornos da tireóide o hipertireoidismo e o hipotireoidismo são os predominantes, afetam as pessoas ao longo da vida e aproximadamente 5% dos adultos relataram apresentar alguma disfunção tireoideana ou estar usando algum medicamento para tireóide^{7,11,20}. A Associação Americana de Tireóide recomenda um screening a cada 5 anos em mulheres acima de 35 anos, sendo que nestas o risco é frequentemente elevado. A Academia Americana de Medicina e a Associação Americana de Endocrinologia recomendam a verificação periódica da função tireoideana em todas as mulheres assintomáticas acima de 60 anos de idade. A

triagem também é apropriada para pacientes com risco aumentado de disfunção tireoideana, como pacientes que recebem lítio, amiodarona, citoquinas, radiação ao pescoço ou que tenham outras doenças imunes, hipercolesterolemia, apnéia do sono, depressão ou demência¹⁷.

O hipertireoidismo é uma condição na qual a produção e a liberação dos hormônios da tireóide mostram-se aumentadas, na maioria das vezes, devido a uma hiperfunção da glândula^{2,23}. Os sinais e sintomas do hipertireoidismo originam-se, em sua maioria, da produção excessiva de calor, aumento da atividade motora e da atividade do sistema nervoso simpático, pele ruborizada, quente e úmida; fraqueza muscular, taquicardia, aumento do apetite e, se a ingestão for insuficiente, perda de peso. Ocorre também insônia, dificuldade de permanecer quieto, ansiedade, apreensão, aumento na frequência de evacuações². Os indivíduos idosos com hipertireoidismo podem não apresentar esses sintomas característicos, mas apresentam o que algumas vezes é denominado hipertireoidismo apático ou mascarado. Eles simplesmente tornam-se fracos, sonolentos, confusos, isolados e retraídos^{6,15,26,27}. A doença de Graves, uma forma de hipertireoidismo autoimune, também denominada doença de Basedow ou de Parry¹⁴, caracteriza-se pela formação e secreção excessivas de hormônio tireoideo, bem como por bócio difuso. Outras características são exoftalmia, dermopatia (sobretudo mixedema pré-tibial)^{8,21,24}. A infiltração por

Recebido em 25/08/2005

Aprovado em 25/04/2006

Trabalho realizado no curso de graduação em Biomedicina da FEEVALE - NH - Rio Grande do Sul
¹Professor de Imunologia Clínica e Supervisão de Estágio, Instituto de Ciências da Saúde da FEEVALE, ²Biomédica.

linfócitos indica a natureza auto-imune da doença; tais células provavelmente produzem quantidades consideráveis de anticorpos contra o receptor de TSH⁸.

O hipotireoidismo é a síndrome clínica provocada pela diminuição da secreção do hormônio tireóideo. Com mais frequência, reflete uma doença da própria glândula (hipotireoidismo primário), mas também pode ser causado por doença hipofisária (hipotireoidismo secundário) ou por doença hipotalâmica (hipotireoidismo terciário)⁸, com um amplo espectro de sintomas e manifestações clínicas¹⁶, resulta na lentificação dos processos metabólicos e, na sua forma mais grave, em acúmulo de mucopolissacarídeos na pele, causando edema não-depressível, denominado mixedema^{8,11}.

As diferentes causas de hipotireoidismo resultam em sintomas semelhantes. Na maioria dos pacientes, o início lento e progressivo da doença pode dificultar o diagnóstico clínico, o que se aplica, particularmente, aos pacientes idosos que exibem alterações como pele seca, diminuição dos pêlos corporais e dos cabelos e dificuldade da memória. As queixas típicas em pacientes hipotireóides consistem em maior cansaço e necessidade de sono com humor deprimido, intolerância ao frio, aumento de peso, constipação, diminuição da tolerância aos esforços físicos associado a câibras musculares, voz rouca e baixa, com fala lenta, anemia. A tireóide pode ser normal, aumentada ou, até mesmo, ausente, dependendo da etiologia do hipotireoidismo. As alterações cardiovasculares podem incluir bradicardia e aumento da silhueta cardíaca, hipertensão arterial observada em 10% dos pacientes^{25,1}.

No diagnóstico do hipotireoidismo, a elevação dos níveis de TSH em associação a níveis de T4 livre abaixo da faixa normal é diagnóstica do hipotireoidismo primário⁸.

A tireoidite de Hashimoto é uma doença auto-imune na qual o próprio organismo produz anticorpos contra a glândula tireóide levando a uma inflamação crônica que pode acarretar o aumento de volume da glândula (bócio) e diminuição do seu funcionamento³. Atinge três vezes mais mulheres, e é diagnosticada com maior frequência entre a terceira e a quinta décadas de vida^{8,12,18}.

O achado de anticorpos anti-peroxidase (anti-TPO) e anti-tireoglobulina (anti-TIG) indicam a natureza auto-imune da doença. Além disso, podem ocorrer a presença de anticorpos anti-receptores de TSH (TRAb), frequentemente do tipo bloqueador, impedindo a ação do TSH. Em raras ocasiões, ocorre a presença de imunoglobulinas estimulantes da tireóide (TSI), resultando em hipertireoidismo e na ocorrência combinada de doença de Graves e de doença de Hashimoto, denominada hashitoxicose^{25,8}.

No exame laboratorial, 90% dos pacientes apresentam anti-TPO, e 50% são positivos para os Ac anti-TIG. Os níveis de T4 e TSH podem-se mostrar normais. Nos pacientes com a forma hipotireoideana, os níveis de TSH são elevados, enquanto os níveis de T4 e de T4 livre se apresentam diminuídos¹.

Em pacientes com hipotireoidismo sub-clínico, que se caracteriza pela ausência de sintomas clínicos de hipotireoidismo, mas pela presença de valores de TSH acima do normal, com resultados normais dos hormônios T4 livre, T4 total, T3 livre, T3 total. O encontro de Anti-TPO positivo nestes casos irá identificar aqueles pacientes que tem chance maior de evoluir para hipotireoidismo clinicamente manifesto, conforme demonstrado pelo estudo epidemiológico de Whickam^{4,19,11}.

Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência das principais alterações hormonais na tireóide em mulheres usuárias da unidade básica de saúde da cidade de Campo Bom, identificar alterações hormonais da tireóide isolados

relacionadas com a idade e verificar a interdependência da idade em relação aos hormônios tireoideanos em geral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal, utilizando amostras de conveniência composta por todos os pacientes do sexo feminino (n=156) acima de 35 anos (média 49 anos), que tiveram solicitação de dosagens de hormônios tireoideanos, no período de setembro de 2004 a abril de 2005. Os exames foram solicitados como rotina pelo médico responsável do posto de saúde da cidade de Campo Bom/RS.

Este estudo teve como fatores de exclusão: (1) estar sob o uso de algum medicamento para tireóide; (2) estar tomando lítio; (3) estar utilizando qualquer medicamento que possa afetar os hormônios tireoideanos; (4) ter realizado algum procedimento na tireóide (cirurgia, tratamento com iodo radioativo) e (5) ter doença prévia da tireóide.

As amostras foram coletadas em tubos à vácuo com gel separador (Vacuette®) no posto de saúde de Campo Bom e transportadas para o laboratório de biomedicina do Centro Universitário FEEVALE, sob refrigeração. O material foi centrifugado por 5 minutos a 3.000 rpm e analisado, em um período não superior a 24 horas.

Nas análises laboratoriais, as dosagens de T3, T4, TSH, foram realizadas pelo método de quimioluminescência utilizando-se kits e calibradores para o aparelho ACCESS® (Beckman), enquanto que as dosagens de anti-TPO e anti-TIG foram quantificadas pelo método ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) utilizando-se kits da marca DI-ALA® (Gesellschaft m.b.H.) as lavagens foram realizadas em uma lavadora semi-automática Bras Serum (Bras Serum®) e a leitura foi realizada em uma leitora de microplacas ANTHOS 2010 (Anthos®). Os resultados foram primeiramente agrupados e analisados utilizando o programa Microsoft Office Excel versão 2003, juntamente com o programa SPSS for windows v 11.0.0. Os testes estatísticos utilizados foram teste z para probabilidade com intervalos de confiança de 95%, correlação linear simples e correlação linear múltipla.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo foi realizado em um posto de saúde do município de Campo Bom, Rio Grande do Sul. A análise estatística realizada mostrou a probabilidade de transtornos da tireóide de acordo com a faixa etária, estratificada em intervalos de 10 anos a partir da menor idade do estudo até um máximo de 4 faixas etárias, os dados obtidos estão resumidos na tabela I. Para cada faixa etária foi realizada uma análise comparativa utilizando como base os dados da literatura de 5% de transtornos tireoideanos.

Tabela I
Probabilidade de transtornos da tireóide de acordo com a faixa etária.

Faixa etária	N	Probabilidade de suspeitos	Teste z	t _{crítico}
35 a 44	70	0,0426	-0,0072	1,960
45 a 54	47	0,1064	6,2745	1,960
55 a 64	20	0,1000	2,2361	1,960
Acima de 65	19	0,1053	2,5268	1,960

No grupo de indivíduos analisados com idades entre 35 a 44 anos (média 39 anos) foram detectados 3 casos (4,26%) de transtornos da tireóide, no grupo com idades compreendidas entre 45 a 54 anos (média 49 anos) foram observados

5 casos (10,64%) de alterações nos exames de tireóide, para o grupo de faixa etária entre 55 a 64 anos (média 58 anos) observou-se 2 casos (10%) de transtornos tireoideanos e no grupo com idades superiores a 65 anos (média 74 anos) o número de casos encontrados com transtornos tireoideanos foi 2 (10,53%).

Foi observado que apenas para o intervalo de idade compreendido entre 35 a 44 anos não houve diferença significativa entre a amostra e a população descrita na literatura em relação aos transtornos da tireóide para um nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$). Para todos os outros intervalos de faixa etária os resultados mostraram ser estatisticamente diferentes quando comparados com aqueles encontrados na literatura para nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Os pacientes não faziam uso de medicamentos que pudessem alterar os resultados.

A tabela II apresenta os limites dos intervalos de confiança de 95% calculados para estas amostras e a figura 1 representa graficamente estes intervalos de não significância.

A tabela III mostra os valores médios e seus desvios padrão para os hormônios tireoideanos em cada faixa etária.

As figuras 2, 3 e 4 mostram uma análise de correlação entre os hormônios relacionados à tireóide com a idade das pacientes analisadas uma vez que a tabela III demonstrou haver uma diminuição do T3 de acordo com o aumento da idade. Embora a tabela III demonstra haver alteração dos hormônios tireoideanos em relação à idade, os dados obtidos e resumidos na tabela IV comprovam que a correlação é fraca, e não significativas para T4 e TSH.

Tabela II
Intervalos de confiança de acordo com a faixa etária

	probabilidade	%
IC _{35 a 44 anos} (95%)	0 a 0,098	0 a 9,8
IC _{45 a 54 anos} (95%)	0,008 a 0,205	0,8 a 20,5
IC _{55 a 64 anos} (95%)	0 a 0,256	0 a 25,6
IC _{acima de 65 anos} (95%)	0 a 0,270	0 a 27,0

Tabela III
Valores médios e desvios padrão dos marcadores tireoideanos

	T3 ng/dl	T4 µg/dl	TSH mUI/ml	Anti-TPO mUI/ml	Anti-TIG mUI/ml
35 a 44 anos	122±25	8,1±1,6	1,86±1,49	58±380	13±28
45 a 54 anos	123±22	7,7±1,4	1,65±1,00	15±34	19±60
55 a 64 anos	117±27	8,0±2,0	1,77±1,41	16±29	13±19
Acima de 65 anos	117±28	8,0±2,0	1,79±1,42	16±30	13±20

Tabela IV
Equação de reta, valores de coeficiente de correlação amostral (r) e coeficiente de determinação (r²)

	Equação de reta	r	r ²	significância
T3	y=137,86-0,3497x	0,1715	0,0294	0,05>p>0,02
T4	y=8,8938-0,0193x	0,1439	0,0207	0,10>p>0,05
TSH	y=0,2545-0,0021x	0,0894	0,0080	0,40>p>0,20

Os dados descritos na tabela acima demonstram que para o T3 a cada ano que o indivíduo envelhece, há uma diminuição de 0,3497 ng/dL na concentração média deste hormônio e o coeficiente de determinação para este analito é capaz de explicar apenas 2,94% das alterações em relação à idade para um nível de significância menor que 0,05 e maior que 0,02 (0,05>p>0,02). Para o T4, os dados mostram haver uma diminuição de 0,0193 µg/dL na concentração média deste hormônio e o coeficiente de determinação para este analito é capaz de explicar apenas 2,07% das alterações em relação à idade para um nível de significância menor que 0,10 e maior que 0,05 (0,10>p>0,05). Como a distribuição do

TSH não é uma curva normal, os dados foram convertidos em logaritmo de base 10 e para o TSH, os dados mostram haver uma diminuição de $\log^{0,0021}$ mUI/mL na concentração média deste hormônio e o coeficiente de determinação para este analito é capaz de explicar apenas 0,80% das alterações em relação à idade para um nível de significância menor que 0,40 e maior que 0,20 (0,40>p>0,20).

A tabela V apresenta uma saída estatística do SPSS for windows v 11.0.0 para a análise de regressão múltipla dos hormônios tireoideanos em relação à idade (variável dependente). A equação de reta prevista para esta análise é representada pela equação:

$$y = 63,429 - 0,0711(T3) - 0,700(T4) - 0,220(TSH)$$

Mesmo através de uma análise de regressão múltipla não foi possível verificar uma significância para comprovar que a diminuição do T3, T4 e TSH sejam dependentes da idade para esta faixa etária do estudo.

Tabela V
Análise de regressão múltipla dos hormônios tireoideanos em relação à idade

	T3 ng/dl	T4 µg/dl	TSH mUI/ml	Anti-TPO mUI/ml	Anti-TIG mUI/ml
35 a 44 anos	122±25	8,1±1,6	1,86±1,49	58±380	13±28
45 a 54 anos	123±22	7,7±1,4	1,65±1,00	15±34	19±60
55 a 64 anos	117±27	8,0±2,0	1,77±1,41	16±29	13±19
Acima de 65 anos	117±28	8,0±2,0	1,79±1,42	16±30	13±20

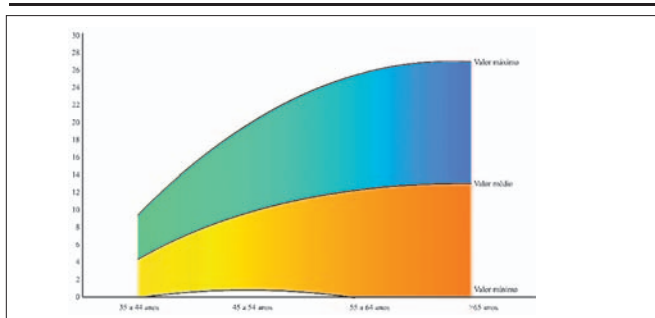


Figura 1 – Intervalos de não significância para faixas etárias

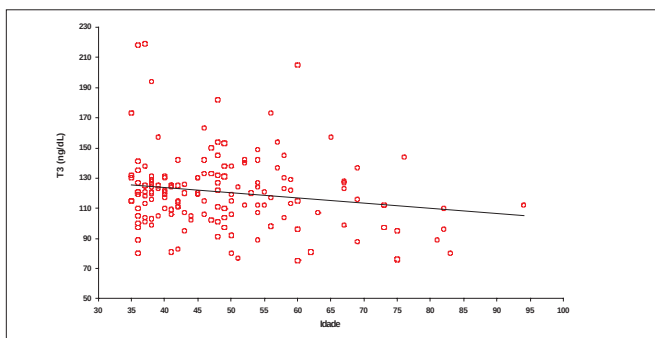


Figura 2 – Correlação entre T3 e idade

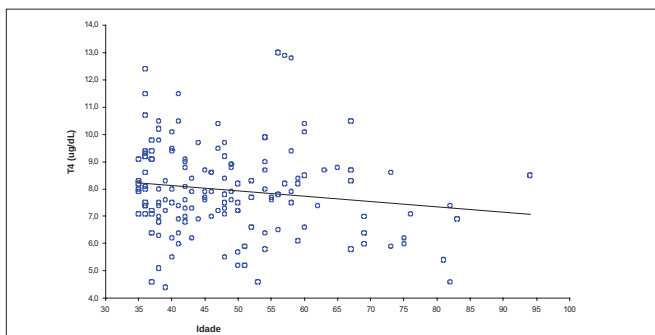


Figura 3 – Correlação entre T4 e idade

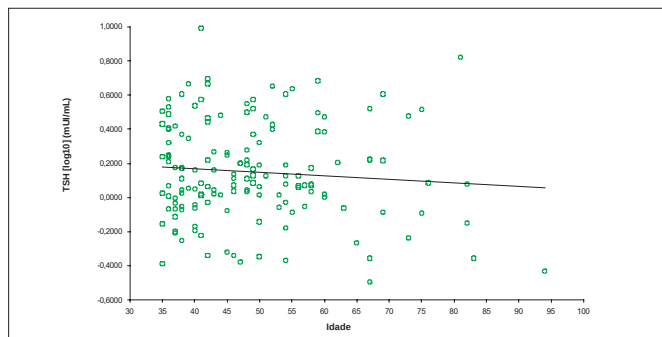


Figura 4 – Correlação entre TSH (log10) e idade

CONCLUSÃO

Podemos concluir que o uso apropriado dos testes de diagnóstico para os hormônios da tireóide como screening de transtornos tireoideanos para avaliação inicial mostra-se importante neste estudo. Com base nos resultados observados o grupo de mulheres da cidade de Campo Bom com faixa etária entre 35 a 44 anos não difere estatisticamente daqueles encontrados na literatura, enquanto que os outros grupos com faixa etária acima dos 45 anos possuem diferença significativa em relação aos resultados encontrados na literatura.

O intervalo de idade utilizado no estudo, que varia de adultos a idosos, não mostra diferença estatística entre as variações dos hormônios tireoideanos, e que as mudanças ocorridas nos valores de T3, T4 e TSH são provavelmente devido a ingestão de iodo diferente para cada indivíduo ou até pelo metabolismo do iodo, através de uma maior clearance urinária e que, utilizando os dados deste estudo, é conveniente recomendar um screening a cada 10 anos em mulheres acima de 45 anos, mesmo sem presença de sinais e sintomas de transtornos tireoideanos, sendo que nestas o risco de doenças tireoideanas é frequentemente elevado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Unidade Básica de Saúde de Campo Bom, aos pacientes que se dispuseram a realizar esta pesquisa pela autorização em termo de consentimento livre e esclarecido, à bioquímica Dalin Tedesco pelo auxílio técnico e financeiro nos kits de ELISA.

REFERÊNCIAS

1. BENSEÑOR, I.; MD; PhD. Screening for thyroid disorders in asymptomatic adults from Brazilian populations. *Revista Paulista de Medicina*, 146-151, maio. 2002.
2. COOPER, D.S. Hyperthyroidism. *The Lancet*, Aug. 2003. Academic Research Library, 2003. 459-468.
3. CZEPIELEWSKI, M.A. Tireoidite de Hashimoto. Data de publicação: 01/11/2001, revisão: 03/11/2003. in <http://www.abcdasaude.com.br/> último acesso em: out. 2004.
4. DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA: Anticorpos antitireoidianos <http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/anticorpos_antitireoidianos.shtml> último acesso em: nov 2004.
5. DAVEY, R. Thyroxine, thyrotropin, and age in a euthyroid hospital patient population. *Clinical Chemistry* 43:11, 2143-2148, 1997.
6. FERRAZ, AR; ARAÚJO, F°, VJF; GONÇALVES, AJ; FAVA, AS; LIMA, RA. Diagnóstico e Tratamento do Câncer da Tireóide. Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2001.
7. FURLANETTO, T.W.; PECCIN, S. et.al. Prevalência de nódulos de tireóide

- detectados por ecografia em mulheres após os 40 anos. *Rev. Assoc. Med. Brás. São Paulo*: outubro 2000, v. 46
8. GOLDMAN & BENNETT. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 21. ed., cap. 239, 1370-1392, Rio de Janeiro: 2001.v. 1.
9. GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed., cap. 57: 1175-1199, Rio de Janeiro 2003, .v. 2.
10. GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 859-869.
11. HELFAND, M. Screening for subclinical thyroid dysfunction in nonpregnant adults: a summary of the evidence for the U.S preventive services task force. *Annals of Internal Medicine*, iss.2, 128-140, jan. 2004, v. 140.
12. HERMANN, J.; HEINEN, E.; KROLL, H.J.; RUDORFF, K.H.; KRUSKEMPER, H.L. Thyroid function and thyroid hormone metabolism in elderly people. Low T3-syndrome in old age? *Klin Wochenschr*. 1981; 59: 315-323.
13. KAPLAN, M. M. Clinical perspectives in the diagnosis of thyroid diseases. *Clinical Chemistry*, 45:8 (B), 1377-1383, 1999.
14. MCKENNA, T.J. Graves' Disease. *The Lancet*. jun. 2001, 1793-96, v. 357.
15. MENDONÇA, S.C.L.; JORGE, P.T. Estudo da função tireoideana em uma população com mais de 50 anos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.46, n.5, 557-565, outubro 2002.
16. MEIER, C; et al. Serum thyroid stimulating hormone in assessment of severity of tissue hypothyroidism in patients with overt primary thyroid failure: cross sectional survey. *BMJ*, 2003; 326; 311-312.
17. MOHANDAS, R; KRISHAN, L.G. Managing thyroid dysfunction in the elderly answers to seven common questions. *Postgraduate Medicine*. iss.5, 54-60, may. 2003, v. 113.
18. MOORADIAN, A.D. Normal age related changes in thyroid hormone economy. *Clin Geriatr Med*, 1995; 11: 159-169.
19. NUNES, M.T. Hormônios tireoideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, n.6, p. 639-643, dez. 2003, v. 47.
20. PECCIN, S.; FURLANETTO, T.W. et al. Nódulos de tireóide: valor da ultrassonografia e da biópsia por punção aspirativa no diagnóstico de câncer. *Rev.Assoc.Med.Bras.* n.2.São Paulo: junho 2003, v. 49.
21. PEIXOTO, M.C.; TABOADA, G.F. et al. Avaliação da incidência e do comportamento do câncer de tireóide em pacientes com doença de graves submetidos a tireoidectomia. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.* São Paulo, out. 2003, v. 47.
22. PONTES, A. A. N. et al. Prevalência de doenças da tireóide em uma comunidade do nordeste brasileiro. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v46, n 5, 544-549, 2002.
23. ROMALDINI, J.H. Tratamento do hipertireoidismo: o que realmente há de novo? *Arq Bras Endocrinol Metab.* V. 45, n 6, 505-506, 2001.
24. ROSÁRIO, P.W.S.; CARDOSO, L.D. C. et al. Valor da varredura com radioiodo em pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide de moderado/alto risco com tireoglobulina (sem tiroxina) indetectável após tratamento inicial. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.* Junho 2004, v. 48.
25. SINGER, P.A.; COOPER, D.S. et al. Treatment Guidelines for Patients With Hyperthyroidism and Hypothyroidism. *Academic Research Library JAMA*; mar.8, 1995, n.10, 808, v 273.
26. SOUZA, I.C.C. Instituto de Endocrinologia e Nutrição in: <http://www.dri-en.com.br/en2003_tireoide.htm> último acesso em: novembro 2004.
27. WENZEL, K.W.; HORN, W.R. Triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) kinetics in aged men. In: ROBBINS, J.; UTIGER, R.D., eds. *Thyroid research*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1976: 270.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

¹Av João Ferreira Jardim, 140/67
Bairro Rubem Berta CEP: 91180-290 Porto Alegre – RS
e-mail: gustavo.lara@pop.com.br
²Rua: Duque de Caxias, 579
Bairro: Centro CEP: 95960-000 Encantado – RS
e-mail: nandinha82@yahoo.com.br

Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) - Revisão

Laboratory Identification of Extended-Spectrum β -lactamases - A review

Eduardo Monguilhott Dalmarco¹; Solange Lúcia Blatt² & Caio Maurício Mendes de Córdova³

RESUMO - Segundo vários autores (BELL *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2004; BRIGANTE *et al.*, 2005), a incidência de bactérias produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) é distinta nas diversas áreas geográficas estudadas. As Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) produzidas por bacilos gram negativos estão entre os grandes problemas da medicina atual. Quando produtoras destas enzimas, os microorganismos (principalmente *K. pneumoniae* e *E. coli*) tornam-se altamente eficazes em inativar as penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração. Além disso, as bactérias produtoras de ESBLs são frequentemente resistentes à diversas classes de antibióticos não Beta-Lactâmicos, causando grande dificuldade no tratamento destas infecções. O grande objetivo deste artigo é alertar os laboratórios de análises clínicas para as dificuldades na detecção rotineira deste fenômeno e a grande relevância clínica desta detecção para a saúde do paciente, além de sua enorme importância no controle das infecções hospitalares causadas por cepas produtoras de beta-lactamases.

PALAVRAS-CHAVE - Beta-Lactamases de Espectro Estendido, Resistência, Enterobactérias, Infecção Hospitalar.

SUMMARY - According to some authors (BELL *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2004; BRIGANTE *et al.*, 2005), the incidence of producing bacteria of Beta-Lactamases de Extended Spectrum (ESBLs), is distinct in the diverse studied geographic areas. Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL), produced for gram negative bacilli, is between the great problems of the current medicine. When producing of these enzymes, the microorganisms (mainly *K. pneumoniae* and *E. coli*) become highly efficient in inactivating penicillins, cephalosporines of first, second and third generation. Moreover, the producing bacteria of ESBLs are frequent resistant the diverse non-Beta-Lactamic antibiotic, causing great difficulty in the treatment of these infections. The great objective of this article, is to alert the laboratories of clinical analyses for the difficulties in the routine detection of this phenomenon, the great clinical relevance of this detection for the health of the patient, beyond its enormous importance in the control of the hospital infections caused by beta-lactamases producers.

KEYWORDS - Extended-Spectrum, β -Lactamases, Antibiotic-Resistance, Enterobacteriaceae, Hospital Infection.

INTRODUÇÃO

Dentre as bactérias Gram-negativas, a produção de Beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra agentes beta-lactâmicos (SANDERS e SANDERS, 1992). Membros da família Enterobacteriaceae comumente expressam Beta-lactamases codificadas por plasmídeos que conferem resistência à penicilinas mas não às cefalosporinas de amplo-espectro (BUSH *et al.*, 1995; LIVERMORE, 1995).

Em 1983, um novo grupo de enzimas logo nomeadas de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi detectado em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha (KNOTHE *et al.*, 1983). Mais tarde, estas enzimas foram mapeadas e classificadas em dois grandes grupos, não relacionados entre si, embora algumas enzimas dos dois grupos, ajam sobre o mesmo substrato (antibiótico beta-lactâmico), ligando-se a estes antibióticos em sítios completamente distintos. Este grupo de enzimas foi primeiramente referido como resultado de genes presentes em plasmídeos, como o TEM-1, TEM-2 e SHV-1, os quais sofreram mutações semelhantes, resultando em substituições no aminoácido terminal e no sítio ativo destas enzimas. Estas alterações (mutações), causam modificações estruturais no sítio ativo, causando acréscimo de sua ação sobre as cefalosporinas. Como resultado, sua ação não se restringe apenas às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração mas, também, sobre as oxiamino-cefalosporinas (Cefotaxima, Cefotaxidima, Ceftriaxona) e monobactams (Aztreonam) (STÜRENBURG e MACK, 2003).

As ESBLs, geralmente podem ser bloqueadas por inibidores de beta-lactamases, como o clavulanato, sulbactam e

tazobactam, que são geralmente ineficazes contra a classe "C" destas enzimas. Além disso, as bactérias produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido também apresentam resistência à outras drogas não-beta-lactâmicas, o que causa um verdadeiro dilema no que diz respeito à terapêutica a ser utilizada nestes casos.

Nos últimos 20 anos, inúmeros fármacos beta-lactâmicos têm sido desenvolvidos com o propósito principal de posuírem resistência à ação hidrolítica das enzimas beta-lactamases. Infelizmente, a utilização indiscriminada e sem critérios de tais fármacos, também tem favorecido a seleção de bactérias produtoras de (ESBLs) até então desconhecidas e resistentes a estes fármacos (MEDEIROS, A. 1997). A primeira mutação observada na produção de ESBLs foi a enzima denominada SHV-2, a qual foi encontrada em uma cepa de *Klebsiella ozaenae*, isolada na República Federal da Alemanha, em 1983 (LIVERMORE, D. M., 1995). A primeira ESBL "mutante" identificada em um hospital universitário foi isolada em Julho de 1984, na França, a qual foi posteriormente caracterizada molecularmente como TEM/CTX-1 (SANDERS, C. *et al.*, 2000).

A partir destes primeiros achados estritamente hospitalares, o isolamento deste fenômeno vem se tornando cada vez mais comum, inclusive em ambientes ambulatoriais. Além disso, este fenômeno já foi encontrado em diversos gêneros de Enterobactérias, como em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp.*, e também em bacilos gram-negativos não-fermentadores de glicose, como o *Pseudomonas aeruginosa* (AMBLER R. P., 1980).

Epidemiologia das ESBLs

A nível mundial, a incidência de microorganismos produ-

Recebido em 04/07/2005

Aprovado em 25/04/2006

¹Professor de Microbiologia Clínica; ²Professora de Citologia Clínica; ³Professor de Bioquímica Clínica.

^{1,2,3}Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

tores de ESBLs é muito difícil de se determinar, principalmente, por diferenças entre os métodos de detecção e interpretação utilizados por cada um dos países e instituições de saúde envolvidos, além de diferirem muito em relação à notificação do aparecimento de tal fenômeno. Por estes motivos, a ocorrência de ESBL é mundialmente sub-estimada (STEWART *et al.*, 2000). Uma outra razão para o fato, é a alta taxa de variação na incidência de ESBLs nos diferentes hospitais, que é observado pela escolha dos participantes na coleta dos dados, que tem grande influência sobre a média dos dados obtidos. Não obstante, nas mais recentes avaliações, o aumento significativo no aparecimento das ESBLs tem sido reportada em todas as partes do mundo, incluindo a América do Norte (Taxa de ESBL em *Klebsiella spp.* = 4.2 - 44%, *E.coli* = 3.3 - 4.7% e *Proteus mirabilis* = 3.1 - 9.5%) (WINOKUR *et al.*, 2001; MATHAI *et al.*, 2001; SAURINA *et al.*, 2000) e América do Sul/Latina (Taxa de ESBL em *Klebsiella spp.* = 40 - 47.3%, *E.coli* = 6.7 - 25.4% e *Proteus mirabilis* = 9.5 - 35.5%) (WINOKUR *et al.*, 2001; SADER *et al.*, 2003, 2002; GALES *et al.*, 2002).

Caracterização e tipos de ESBLs

As ESBLs "clássicas" são enzimas transmitidas/codificadas por plasmídeos, como as famílias: Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e oxacilina (OXA). Dentro destas maiores "famílias", estão incluídas as duas primeiras variantes de beta-lactamases identificadas (SIROT *et al.*, 1987; SOUGAKOFF *et al.*, 1988). Embora estas variantes ainda se mantêm, nos dias atuais, como as mais isoladas, nos últimos anos houve uma explosão no desenvolvimento/aparecimento de outras ESBLs (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES). Como resultado disso, mais de 370 variantes naturais de ESBLs diferentes são conhecidas atualmente (STÜRENBURG *et al.*, 2005).

Estas enzimas pertencem filogeneticamente à classe de beta-lactamases denominadas "*Serine-Beta-Lactamases*" que, juntamente com as "*Metallo-Beta-Lactamases*", formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar antibióticos beta-lactâmicos (SHAH *et al.*, 2004).

A evolução das Beta-Lactamases de Espectro estendido (*Serine-proteases*) é tão grande que foi criado até um web site (<http://www.lahey.org/studies>), com o objetivo de tentar manter uma certa ordem no que diz respeito à nomenclatura a ser utilizada nas novas descobertas. Para se caracterizar a descoberta de uma nova ESBL é necessário se descobrir alguma modificação, como mudança na região promotora, sozinha e/ou em conjunto com uma substituição nucleotídica, que funcionalmente devem ser "silenciosas".

Esquemas de Classificação

A relação fundamental entre as enzimas ESBLs foi melhor refletida pelo esquema de classificação de Ambler, que é baseada na similaridade entre as seqüências de aminoácidos (AMBLER *et al.*, 1991). Outro esquema de classificação utilizado é o modelo descrito por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH K. *et al.*, 1995; BUSH K., 2001).

Segundo o esquema de Ambler, as ESBLs podem ser divididas em 04 classes evolucionárias distintas (A, B, C e D). As *Beta-lactamases* SHV- e TEM- são pertencentes à classe A, que possuem uma *serina* como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo. Além disso, são penicilinas e cefalosporinas usualmente encontradas em plasmídeos ou transposons. Já as OXA-derivadas são ESBLs pertencentes a classe D (oxacilinas).

O esquema de Bush classifica as ESBLs segundo o perfil do

substrato, características físicas como peso molecular e ponto isoelétrico (BUSH K. *et al.*, 1995; BUSH K., 2001). No esquema funcional de Bush, as ESBLs são divididas em dois sub-grupos: 2be (principalmente TEM- and SHV-) e 2d (OXA-). Em geral, os dois sub-grupos são inibidos pelo clavulanato (BUSH K. *et al.* 1995).

Classificação Funcional (Fenotípica) das ESBLs, segundo BUSH *et al.*, 1995

Em 1995, Bush-Jacoby-Medeiros apresentaram um novo esquema de classificação, no qual, dividiram as enzimas em 4 grandes grupos (1 - 4) e subgrupos (a - f) (BUSH *et al.*, 1995; BUSH, K., 2001) (Tab. I).

Tabela I
Características Funcionais e Moleculares das Beta-Lactamases.

Grupo Funcional	Maior Subgrupo (Bush <i>et al.</i>) ^a	Classe Molecular (Ambler) ^b	Substrato de Preferência ^c										Inibição		Num. estimado	
			PEN	CARB	OX	CR	CTX	ATM	IPM	CLAV	CLOX	EDTA	1995	2000		
1		C	++	+	-	+++	+	-	-	-	++	-	32	51		
2	2a	A	+++	+	-	±	-	-	-	++	-	-	20	23		
	2b	A	+++	+	+	++	-	-	-	++	-	-	16	16		
	2be	A	+++	+	+	++	++	++	-	++	-	-	36	119		
	2br	A	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	9	24		
	2c	A	++	+++	+	+	-	-	-	+	-	-	15	19		
	2d	D	++	+	+++	+	-	-	-	V	-	-	18	31		
	2e	A	++	++	-	++	++	++	-	++	-	-	19	20		
3	2f	A	++	+	?	++	++	++	++	+	-	-	3	4		
	3a,3 b, 3c	B	++	++	++	++	++	-	++	-	-	++	13	24		
4			++	++	++	V	V	-	-	-	-	-	7	9		

^a Tabela adaptada de: aBUSH *et al.*, 1995; bLIVERMORE D. M., 1998; cAMBLER R. P., 1990.
^b Inibição: ++, forte; + moderada; V variável; - negativa; CLAV, ácido clavulânico; CLOX, cloxacilina; EDTA, ácido etilendiaminotetracético.
^c Substrato de preferência: +++, subst de preferência; ++, bom substrato; +, hidrólise mínima; ±, hidrólise mínima; - Não hidroliza; PEN, penicilina; CARB, carbenicilina; OX, oxacilina; CR, cefaloridina; CTX, cefotaxima; ATM, aztreonam; IPM, imipenem.

O grupo 1 é formado por cefalosporinas que não sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também, pertencentes a classe molecular C. O grupo 2 são penicilinas, cefalosporinas, ou ambas, que sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também pertencentes às classes moleculares A e D. Nesta classe estão as primeiras beta-lactamases isoladas (TEM-1 e SHV-1). Porém, por causa do numeroso aparecimento de ESBLs mutantes, foram criadas duas sub-classes: 2a e 2b. A sub-classe 2a contém apenas penicilinas, enquanto a 2b contém ESBLs de amplo espectro, e com a capacidade de inativação tanto de penicilinas quanto de cefalosporinas na mesma proporção (SHAH *et al.*, 2004). Com o passar dos anos, surgiu a necessidade da criação de novos subgrupos, segregados do subgrupo 2b. Trata-se atualmente dos subgrupos 2be e 2br. No subgrupo 2be, a letra "e" significa amplo espectro de atividade e representa as beta-lactamases capazes de inativar as cefalosporinas de 3ª. geração (ceftazidima, cefotaxima e cefepodoxima). Assim, com os monobactams (aztreonam). No subgrupo 2br, a letra "r" denota a reduzida ligação aos inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico e sulbactam); são também conhecidas como ESBLs resistentes aos inibidores de beta-lactamases (derivadas da TEM). Algumas ainda mantêm-se susceptíveis ao tazobactam (SHAH *et al.*, 2004). Existe, ainda, o subgrupo 2c, o qual foi separado do subgrupo 2b, devido a estas enzimas inativarem a carbenicilina, com maior afinidade do que a benzilpenicilina, e com pequeno efeito sobre a cloxacilina. O subgrupo 2d inativa a cloxacilina com mais afinidade do que a benzilpenicilina, e com pequeno efeito sobre a carbenicilina, além de serem fracamente inibidas pelos inibidores de beta-lactamases. O subgrupo 2e são cefalosporinas que podem também hidrolisar os monobactams e são inibidas pelo ácido clavulânico.

nico. Além disso, o subgrupo 2f foi adicionado, devido a tratar-se de enzimas classificadas como "*Serina-beta-lactamases*", em contraste as "*Zinco-beta-lactamases*", incluídas no grupo 3.

O grupo 3 são enzimas que possuem no seu sítio ativo a necessidade de Zinco (Zn) para exercerem seu efeito, por isso chamadas de "*Zinco-beta-lactamases*" ou simplesmente "*Metallo-beta-lactamases*", e correspondem à classe molecular B. Finalmente existe o grupo 4, onde localizam-se as penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico, e ainda não possuem grupo molecular definido (SHAH *et al.*, 2004).

Classificação Molecular

A classificação molecular das beta-lactamases é baseada na sequência de nucleotídeos e aminoácidos destas enzimas. Nos dias atuais, 04 classes são conhecidas (A a D), e são correlacionadas com suas classificações funcionais. As classes A, C e D agem através do mecanismo baseado nas "*Serinas*", enquanto a classe B ou *Metallo-beta-lactamases* necessitam de Zinco (Zn) para sua ação. A maioria das *ESBLs* estão contidas na classe molecular "A" de Ambler (AMBLER, R P., 1980), caracterizadas pela presença do sítio ativo "*Serina*" e massa molecular de aproximadamente 29.000 KDa, e preferência (afinidade) de hidrólise sobre as penicilinas (HALL E BARLOW, 2005).

Característica de susceptibilidade das *ESBLs*

As *ESBLs* diferem-se entre si (mesma família) por substituições na sequência de aminoácidos (de 1 a 7), os quais alteram configurações e propriedades do seu sítio ativo. As substituições mais importantes são as mutações que conferem amplo espectro a estas enzimas (Ex.: Posição 164 de Ambler nas TEMs, 179 nas SHVs e 238 em ambas), que ampliam seu sítio ativo, o qual produz espaço suficiente para interação entre a enzima e os antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro portadores de grandes cadeias *Oxiamino-*; como resultado, esta modificação faz com que estas enzimas sejam capazes de hidrolisar antibióticos betalactâmicos como a: Cefotaxidima, Cefotaxima, Cefuroxima e Aztreonam. Em contraste como suas "parentes" próximas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), que reconhecem os antibióticos betalactâmicos de amplo espectro como substrato, muito fracamente (KNOX JR., 1995).

Fatores de Risco

Alguns estudos têm revelado a existência de vários fatores de risco independentes entre si, associados à produção de *ESBLs*. O principal fator, sem dúvida, está relacionado ao tempo de permanência do paciente nos hospitais, principalmente nos centros de tratamento intensivo (CTIs) (BISSESON *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2002; MENASHE *et al.*, 2001; LUCET *et al.*, 1996); outro fator importante, são casos de hospitalização anterior, onde houve o uso de diversos antimicrobianos para erradicação da infecção, principalmente cefalosporinas de amplo-espectro (KIM *et al.*, 2002; MENASHE *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002; LAUTENBACH *et al.*, 2001; PENA *et al.*, 1997).

Outro importante fator de risco está associado à utilização de procedimentos invasivos, como cateteres venosos centrais, cateteres arteriais, urinários e cateteres utilizados em drenagem biliar (MENASHE *et al.*, 2001; LUCET *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2002; PENA *et al.*, 1997; HO *et al.*, 2002), além de intubações pulmonares, mecanismos de ventilação pulmonar artificial e doenças severas (doenças malignas e falha cardíaca) (MENASHE *et al.*, 2001; PENA *et al.*, 1997; HO *et al.*, 2002; PIROTH *et al.*, 1998).

Reservatórios Não-Hospitalares

Os microrganismos produtores de *ESBLs* são usualmente encontrados no ambiente hospitalar, conforme mencionado anteriormente, principalmente nas unidades de tratamento intensivo (CTIs). Embora seu aparecimento venha aumentando em ambientes cirúrgicos, pediátricos e neonatais, além dos oncológicos.

Situações inusitadas vêm sendo reportadas com mais frequência nos EUA e na França, a exemplo do aparecimento deste fenômeno em locais até então sem relatos de transmissão de microrganismos produtores de *ESBLs*, como centros de reabilitação (Clínicas de Reabilitação), centros de repouso (Asilos), assim como pacientes ambulatoriais portadores de doenças crônicas que podem ser transmissores de microrganismos produtores de *ESBLs* (BRADFORD *et al.*, 1995; RASMUSSEN *et al.*, 1993; EINHORN *et al.*, 2002).

Algumas vezes, este reservatório não hospitalar pode ser bem grande, como mostra um estudo realizado no Hospital Michel Reese em Chicago, onde 7 das bactérias gram-negativas resistentes à ceftazidima (Cefalosporina de 3ª. Geração) são advindas de pacientes provenientes de casas de repouso e clínicas de reabilitação. E em 80% destes casos, os microrganismos resistentes à ceftazidima foram isolados na primeira cultura realizada no ambiente hospitalar (RASMUSSEN *et al.*, 1993).

Opções Terapêuticas

Existe a possibilidade de tratamento com cefamicinas, como a cefoxitina, cefotetan e moxalactam, que são geralmente efetivos contra as Enterobacterias produtoras de *ESBLs* (TEM-, SHV- e CTX-M-). Porém, com terapias prolongadas a *Klebsiella pneumoniae*, pode adquirir resistência a cefamicinas (PANGON *et al.*, 1989; MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1996).

Os aminoglicosídeos também podem ser utilizados se a cepa estudada for susceptível. Porém, devido aos genes que codificam as *ESBL*, serem transmitidos via plasmídeos, existe a possibilidade de transmissão cepa-a-cepa, fator que pode levar rapidamente a transmissão de resistência a esta classe de fármaco. Já que a maioria dos microrganismos produtores de *ESBLs* serem também resistentes aos aminoglicosídeos, principalmente à gentamicina (OTEO *et al.*, 2002).

A utilização de Beta-lactâmicos em associação com inibidores de beta-lactamases, inicialmente, foi considerado o tratamento de escolha, embora não se demorou muito para verificar-se sua ineficácia *in vivo* (FRENCH *et al.*, 1996). Inicialmente, foi verificado que estes fármacos estão também sujeitos ao aumento da concentração inibitória mínima (CIM), com o aumento do inóculo bacteriano (CARON *et al.*, 1990), além disso, pode haver perda de porinas na membrana externa bacteriana, o que leva também à redução na atividade inibitória destes fármacos (RICE *et al.*, 1993). Além do mais, verificou-se que o sulbactam e o tazobactam não possuem bons efeitos contra *ESBLs* codificadas pelos genes SHV- (JACOBY e CARRERAS, 1990; BAUERNEFEIND, 1998).

Outra opção seria a utilização de fluoroquinolonas, já que inicialmente achava-se que a sua resistência era somente codificada por via cromossomal. Novamente, esbarrou-se na característica da maioria das bactérias produtoras de *ESBLs*, possuir este cromossomo (PATERSON *et al.*, 2000). Além do mais, alguns estudos vêm demonstrando que esta resistência também pode ser transferida via plasmídeos (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998).

As cefalosporinas de 4ª. geração demonstram alta capacidade de destruir estes microorganismos *in vitro*. Relatos de-

monstram níveis como 95-100% de atividade contra este tipo de microorganismo (JOHNSON *et al.*, 1999; BIEDENBACH *et al.*, 1999; TALLIS *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 1998). Embora estes fármacos demonstrem o mesmo problema apresentado pelas outras cefalosporinas (aumento da CIM, conforme aumento de inóculo). Um exemplo deste efeito pode ser visualizado em modelos de infecção em ratos (SZABO *et al.*, 2001). Atualmente, o cefepime não é considerado fármaco de primeira escolha para infecções causadas por microorganismos produtores de *ESBLs*. Mesmo quando em combinação com a amicacina ou outro aminoglicosídeo, pois este uso ainda necessita de mais estudos clínicos antes de ser recomendado como tratamento de escolha.

Finalmente, temos os carbapens (Imipenem, Meropenem) que possuem ação uniforme contra este tipo de microorganismo, seja *in vitro* ou *in vivo* (BELL *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 1998). Além disso, os carbapens são altamente estáveis à atividade hidrolítica das *ESBLs*, sem contar sua ótima penetração através da membrana externa, principalmente devido a seu peso molecular compacto e sua forma estrutural muito peculiar. Mecanismos de resistência a estes fármacos já vêm sendo detectados, tais como perda de proteínas na membrana externa (MACKENZIE *et al.*, 1997); resistências específicas contra *ESBLs* codificadas por TEM-, SHV- e AmpC- foram descritas como resultado da perda de porinas (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1999). A aquisição de carbapenases, enzimas capazes de degradar os carbapens, também vêm sendo descritas por inúmeros centros de pesquisa distribuídos pelo mundo (LIVERMORE, 1997).

Medidas de Controle

Modos de Transmissão

A ampla e rápida distribuição geográfica das *ESBLs* é uma ameaça com que os hospitais do mundo inteiro estão se deparando desde do início dos anos 80. As formas usuais de transmissão incluem a disseminação clonal das cepas produtoras de *ESBLs* (FRENCH *et al.*, 1996; PALUCHA *et al.*, 1999; PENA *et al.*, 1998) ou a disseminação através de genes produtores de *ESBLs* carregados por plasmídeos que são transmitidos entre gêneros diferentes de Enterobactérias (KITZIS *et al.*, 1988; RICE *et al.*, 1990). Ambas, a disseminação por plasmídeos ou a própria multiplicação bacteriana, podem ocorrer concomitantemente (PALUCHA *et al.*, 1999; NEUWIRTH *et al.*, 1996; VENEZIA *et al.*, 1995). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o mesmo gene codificador tem sido encontrado em diferentes plasmídeos presentes em diferentes cepas. Finalmente, já se sabe que alguns genes codificadores de *ESBLs* são residentes em *transposons* ou em *integrans*, fornecendo assim os meios adicionais para sua propagação e expressão (NAAS *et al.*, 2001; POIREL *et al.*, 1999 e 2000).

Riscos de Transmissão

A transmissão das *ESBLs* no ambiente hospitalar é muito complexa e envolve diversas variáveis. Algumas vezes pacientes provindos de ambientes externos, como casas de repouso ou outras instituições (ex.: Clínicas de Reabilitação), podem ser carreadores e transmissores iniciais de cepas produtoras de *ESBLs*, quando admitidos no ambiente hospitalar (BRADFORD *et al.*, 1995; RASMUSSEN *et al.*, 1993; EINHORN *et al.*, 2002). Embora a transmissão mais citada na bibliografia seja a que acontece no ambiente hospitalar, favorecida pela pressão seletiva de antibióticos que, como resultado, podem favorecer a transmissão inter-pessoal entre os profissionais de saúde, que manipulam o

paciente colonizado, e acabam transmitindo o microorganismo a outros pacientes até então não infectados (EINHORN *et al.*, 2002).

Isolamento e precauções no contato com pacientes

O isolamento e cuidados especiais no contato com pacientes infectados com bactérias produtoras de *ESBLs* são pontos cruciais no controle da disseminação de tais microorganismos no ambiente hospitalar (FRENCH *et al.*, 1996; SHANNON *et al.*, 1998). Atualmente, já existem alguns documentos citando medidas a serem tomadas quanto à manipulação de tais pacientes (Guia do CDC) (GARNER, 1996).

Além da separação física dos pacientes infectados ou colonizados por bactérias produtoras de *ESBLs*, deve-se tomar alguns cuidados durante o contato com estes pacientes, tais como: atenção cuidadosa na anti-sepsia (ex.: uso de clorexidina), além da utilização de vestimenta específica com objetivo de proteção individual (GARNER, 1996).

IDENTIFICAÇÃO DE BETA-LACTAMASES (*ESBLs*) NO LABORATÓRIO DE ROTINA (Análises Clínicas)

Identificação inicial de bactérias produtoras de *ESBLs* – (Classe Molecular A e D, de Ambler)

Para a identificação inicial de bactéria produtoras de *ESBLs* deve-se utilizar a metodologia proposta pelo NCCLS (*National Committee of Clinical Laboratory Standards*), no documento M100-S14 de janeiro de 2004, que utiliza antibióticos “marcadores” da possível presença de *ESBLs*. Os antimicrobianos preconizados pelo NCCLS como marcadores para triagem de *ESBLs* e os pontos de corte para o método de difusão do disco estão descritos na tabela 2 (Tab. II).

Tabela II
Critério de “Screening” sugerido pelo NCCLS, para evidênciação de *ESBLs*

Agente Antimicrobiano	Halo de difusão do disco (mm)
Cefpodoxima	≤ 17
Ceftazidima	≤ 22
Aztreonam	≤ 27
Cefotaxima	≤ 27
Ceftriaxona	≤ 25
Resultado	= Pode indicar a produção de <i>ESBL</i> , necessita confirmação.

* Esta tabela foi adaptada do documento M100-S14 (NCCLS, 2004).

Esta primeira triagem pode ser feita durante a realização do antibiograma de rotina, tomando-se cuidado de incluir os antibióticos “marcadores”. Qualquer halo menor que o descrito na tabela 2 é indicativo da produção de beta-lactamases de espectro estendido (*ESBLs*).

Para confirmação deste fenômeno o NCCLS indica duas metodologias. A primeira é a verificação através da metodologia do *E-teste*®, o qual tornou-se praticamente inviável para uso em laboratório de rotina, devido principalmente ao seu alto custo. A segunda metodologia pode ser incorporada durante a realização do antibiograma (Aproximação do disco).

Confirmação da produção de *ESBLs* (Classe Molecular A e D, de Ambler), através da metodologia de Aproximação do Disco

Também conhecido como “*Double-disc synergism*”, neste teste utiliza-se no centro de uma placa (150 mm) de ágar Muller-Hinton, previamente inoculada com a cepa a ser es-

tudada ajustada para a escala 0.5 de Mac Farland (10^8 UFC/mL) e coloca-se no centro do ágar um disco de amoxicilina/ácido clavulânico e, ao redor deste, os antimicrobianos marcadores (Cefoxitina, Aztreonam, Ceftazidima e Cefotaxima) na distância de 20 a 30 mm de centro a centro, em relação ao disco central (Fig. 1).

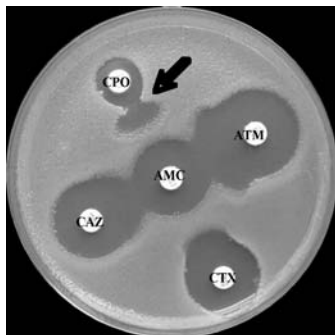


Figura 1 – Exemplicação da metodologia de Aproximação do Disco (Classe A e D de Ambler) (NCCLS, 2004).

* *Escherichia coli* produtora da ESBL. AMC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CTX = Cefotaxima; ATM = Aztreonam; CAZ = Ceftazidima; CPO = Cefpodoxima. A seta negra, demonstra o aparecimento do fenômeno conhecido como Zona Fantasma "Ghost Zone", que caracteriza a produção de ESBL pela cepa bacteriana isolada.

Após incubação por 18 a 20 horas de 33 a 35°C, deve ser procedida a leitura dos halos. A formação de uma zona fantasma "Ghost Zone" entre qualquer antimicrobiano marcador e o disco contendo ácido clavulânico é positiva para presença de ESBL (NCCLS, 2004). Este teste pode ser incorporado durante o Antibiograma de rotina, apenas tomando cuidado de colocar-se os antibióticos marcadores perto do disco de amoxicilina/ácido clavulânico, com o objetivo de verificar a possível produção da Zona Fantasma.

Identificação inicial de bactérias produtoras de Metallo-beta-lactamases - (Classe Molecular B, de Ambler)

A produção destas enzimas pode ser visualizada pela metodologia da aproximação do disco modificado (ARAKAWA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001; YONG *et al.*, 2002). Neste teste, utiliza-se os discos de imipenem, meropenem e/ou ceftazidima estrategicamente alinhados ao redor de um disco de papel impregnado com 750 µg de EDTA. O aparecimento de uma zona de confluência entre os carbapens e/ou a ceftazidima e o disco contendo EDTA (inibidor de Metallo-Beta-Lactamases) é considerado positivo para a presença de Metallo-beta-lactamases (Fig. 2).

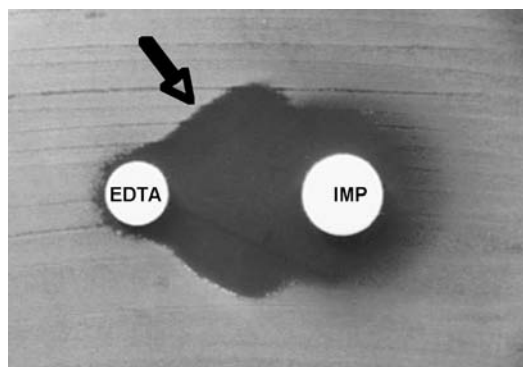


Figura 2 – Demonstração da detecção de Metallo-Beta-Lactamases (Classe B de Ambler), através da difusão do disco modificada.

* EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético; IMP = Imipenem. O aumento na zona de inibição em torno do disco de Imipenem, demonstra a ação inibitória do EDTA sobre a enzima produzida (Metallo-Beta-Lactamase) pela cepa bacteriana. A seta negra, demonstra o local onde ocorreu aumento da sensibilidade, devido a ação do EDTA.

Identificação de bactérias produtoras de AmpC (ESBLs) – (Classe Molecular C, de Ambler)

Também, conhecidas como Beta-lactamases cromossomais induzidas, as ESBLs (AmpC), constituem um grupo de enzimas com características particulares. Entre estas características podemos destacar a resistência aos inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (THOMSON e SMITH MOLAND, 2000).

Em algumas espécies este fenômeno é constitutivo, tais como: *Citrobacter freudii*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Desta maneira, uma vez feita a identificação da espécie, o laboratório deve informar que estas são capazes de produzir beta-lactamases cromossomais induzíveis, e podem desenvolver resistência as cefalosporinas de 3ª geração durante o tratamento com estes antimicrobianos ou com outros indutores, como a cefoxitina (PITOUT *et al.*, 2003).

Para a detecção da produção destas enzimas em outras bactérias, que não apresentam este fenômeno constitutivamente, a melhor maneira seria visualizar a resistência às cefamicinas, como a cefoxitina, pois trata-se do melhor indutor deste fenômeno (BAUERNFEIND *et al.*, 1998). Embora, muitas vezes, isto não seja possível, devido à necessidade do contato prévio com indutor, o que dificulta sua detecção. (YAN *et al.*, 2002).

Por isso, a melhor maneira de observar este fenômeno a nível fenotípico, é através da metodologia da aproximação do disco, modificada (YAN *et al.*, 2002; YONG *et al.*, 2005). Nesta metodologia, coloca-se um disco de cefoxitina, próximo a um disco de Aztreonam ou outro beta-lactâmico (15 mm de centro a centro), e o aparecimento de uma zona de entroncamento "Truncada", entre os dois discos é presumitivo da presença de ESBL, da classe C de Ambler (Fig. 3).

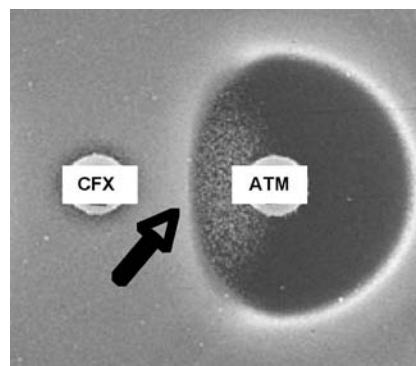


Figura 3 – Detecção de Beta-Lactamase do grupo C de Ambler (Induzida).

* CFX = Cefoxitina, antibiótico da classe das cefalosporinas (Cefamicina), que é forte indutora da produção de Beta-Lactamases do grupo C; ATM = Aztreonam, fármaco beta-lactâmico, o qual, inicialmente a bactéria se mostra sensível. A seta negra, demonstra a zona onde ocorreu diminuição na sensibilidade (Zona Truncada), causada pela exposição da bactéria ao antibiótico cefoxitina (indutora).

CONCLUSÃO

O aumento "explosão" no aparecimento das beta-lactamases de espectro-estendido, observada nos últimos anos, é devida em grande parte, à pressão seletiva sofrida pela utilização indiscriminada de cefalosporinas de 2ª e 3ª gerações. Parece inevitável que as ameaças mais importantes aos clínicos, neste milênio, será o encontro freqüente com patógenos que produzem Beta-lactamases múltiplas e potentes, incluindo as mediadas por plasmídeos tais como

ESBLs, *AmpCs*, e as *Metallo-Beta-Lactamases*. Além disso, a inabilidade de muitos laboratórios de microbiologia clínica em fornecer a informação oportuna e exata sobre a ocorrência de tais enzimas facilitará sua propagação. Se a pressão da seleção continuar e controle destas infecções forem ineficazes, a propagação da resistência continuará a se espalhar e haverá mais organismos que são totalmente resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis. Para evitar isto, será necessário mudar os comportamentos atuais como o diagnóstico e a terapêutica. A prioridade principal deveria ser o incentivo financeiro aos laboratórios clínicos, por parte do governo, com objetivo de atualizar sua equipe técnica e equipamentos necessários para se detectar estas enzimas, além de outros mecanismos de resistência emergentes.

REFERÊNCIAS

- Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 1991 May 15;276 (Pt 1):269-70.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289 (1036):321-31.
- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H., Yaggi T., Fujiwara H., Goto M. Convenient test for screening metal-beta-lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000 38(1): 40-43.
- Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J*. 1998 Dec;39(6):520-5.
- Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN; SENTRY APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;42(3):193-8.
- Biedenbach DJ, Lewis MT, Jones RN. In vitro evaluation of cefepime and other broad-spectrum beta-lactams for isolates in Malaysia and Singapore medical centers. The Malaysia/Singapore Antimicrobial Resistance Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999 Dec;35(4):277-83.
- Bisson G, Fishman NO, Patel JB, Edelstein PH, Lautenbach E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002 May;23(5):254-60.
- Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, Mariano N, Rasmussen BA, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Apr;39(4):899-905.
- Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Rossolini GM, Amicosante G, Toniolo A. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Feb;25(2):157-62.
- Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2001 Apr 1;32(7):1085-9. Epub 2001 Mar 21.
- Bush LM, Calmon J, Johnson CC. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. : *Infect Dis Clin North Am*. 1995 Sep;9(3):653-86.
- Caron F, Gutmann L, Bure A, Pannon B, Vallois JM, Pechinot A, Carbon C. Ceftriaxone-sulbactam combination in rabbit endocarditis caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-broad-spectrum TEM-3 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Nov;34(11):2070-4.
- Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum beta-lactamases: frequency, risk factors, and outcomes. *Pharmacotherapy*. 2002 Jan;22(1):14-20.
- French GL, Shannon KP, Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol*. 1996 Feb;34(2):358-63.
- Gales AC, Sader HS, Jones RN; SENTRY Participants Group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Nov;44(3):289-99.
- Garner JS. Guideline for isolation precautions in hospitals. Part I. Evolution of isolation practices, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control*. 1996 Feb;24(1):24-31.
- Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jun;55(6):1050-1. Epub 2005 May 4.
- Ho PL, Chan WM, Tsang KW, Wong SS, Young K. Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes. *Scand J Infect Dis*. 2002;34(8):567-73.
- Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 May;34(5):858-62.
- Johnson DM, Biedenbach DJ, Jones RN. In vitro evaluation of broad-spectrum beta-lactams in the Philippines medical centers: role of fourth-generation cephalosporins. The Philippines Antimicrobial Resistance Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999 Dec;35(4):291-7.
- Jones RN, Pfaller MA, Doern GV, Erwin ME, Hollis RJ. Antimicrobial activity and spectrum investigation of eight broad-spectrum beta-lactam drugs: a 1997 surveillance trial in 102 medical centers in the United States. Cefepime Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998 Mar;30(3):215-28.
- Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH, Kim EC. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 May;46(5):1481-91.
- Kitzis MD, Billot-Klein D, Goldstein FW, Williamson R, Tran Van Nhieu G, Carlet J, Acar JF, Gutmann L. Dissemination of the novel plasmid-mediated beta-lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Jan;32(1):9-14.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983 Nov-Dec;11(6):315-7.
- Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Dec;39(12):2593-601.
- Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001 Apr 15;32(8):1162-71. Epub 2001 Mar 26.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH., Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Feb; 7(2):88-91.
- Livermore DM. Acquired carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Jun;39(6):673-6.
- Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Oct;8(4):557-84.
- Lucet JC, Chevret S, Decre D, Vanjak D, Macrez A, Bedos JP, Wolff M, Regnier B. Outbreak of multiply resistant enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis*. 1996 Mar;22(3):430-6.
- MacKenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John T, Amyes SG, Gould IM. Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*. 1997 Sep 13;350(9080):783.
- Martinez-Martinez L, Garcia I, Ballesta S, Benedi VJ, Hernandez-Alles S, Pascual A. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jul;42(7):1850-2.
- Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Feb;40(2):342-8.
- Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, Alvarez-Diaz D, Suarez AI, Tran J, Benedi VJ, Jacoby GA. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1669-73.
- Mathai D, Jones RN, Pfaller MA; SENTRY Participant Group North America. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001 Jul;40(3):129-36.
- Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*. 1997 Jan;24 Suppl 1:S19-45.
- Menashe G, Borer A, Yagupsky P, Peled N, Gilad J, Fraser D, Riesenber K, Schlaeffer F. Clinical significance and impact on mortality of extended-spectrum beta lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in nosocomial bacteremia. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(3):188-93.
- Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. Characterization of In53, a

- class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol.* 2001 Jan;183(1):235-49.
39. NCCLS – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth Informational Supplement. M100-S14, Wayne, Pa. NCCLS, 2004.
 40. Neuwirth C, Siebor E, Lopez J, Pechinot A, Kazmierczak A. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):76-9.
 41. Oplustil, C.P. *et al.*, *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. 2ª. Ed., São Paulo, Sarvier, 2004.
 42. Oteo J, Campos J, Baquero F; Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *J Antimicrob Chemother.* 2002 Dec;50(6):945-52.
 43. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Oct;44(4):489-99.
 44. Pangon B, Bizet C, Bure A, Pichon F, Philippon A, Regnier B, Gutmann L. In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 beta-lactamase. *J Infect Dis.* 1989 May;159(5):1005-6.
 45. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2000 Mar;30(3):473-8.
 46. Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, Ariza J, Gudiol F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jan;42(1):53-8.
 47. Pena C, Pujol M, Ricart A, Ardanuy C, Ayats J, Linares J, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1997 Jan;35(1):9-16.
 48. Piroth L, Aube H, Doise JM, Vincent-Martin M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? *Clin Infect Dis.* 1998 Jul;27(1):76-80.
 49. Pitout JD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug;41(8):3933-5.
 50. Poirel L, Guibert M, Girlich D, Naas T, Nordmann P. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):769-76.
 51. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Apr;44(4):891-7.
 52. Rahman MM, Haq JA, Hossain MA, Sultana R, Islam F, Islam AH. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Nov;24(5):508-10.
 53. Rasmussen BA, Bradford PA, Quinn JP, Wiener J, Weinstein RA, Bush K. Genetically diverse ceftazidime-resistant isolates from a single center: biochemical and genetic characterization of TEM-10 beta-lactamases encoded by different nucleotide sequences. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Sep;37(9):1989-92.
 54. Rice LB, Carias LL, Etter L, Shlaes DM. Resistance to cefoperazone-sulbactam in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for enhanced resistance resulting from the coexistence of two different resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 May;37(5):1061-4.
 55. Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Jacoby GA. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Nov;34(11):2193-9.
 56. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001 Aug;5(4):200-14. Epub 2003 Mar 7.
 57. Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, Biedenbach DJ; SENTRY Participants Group (Latin America). Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 Nov;44(3):273-80.
 58. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Shubert C, Thomson KS, Boeufgras JM, Sanders WE Jr. Ability of the VITEK 2 advanced expert system To identify beta-lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb;38 (2):570-4.
 59. Sanders CC, Sanders WE Jr. beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 1992 Nov;15(5):824-39.
 60. Saurina G, Quale JM, Manikall VM, Oydná E, Landman D. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Jun;45(6):895-8.
 61. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol.* 2004;30(1):25-32.
 62. Shannon K, Fung K, Stapleton P, Anthony R, Power E, French G. A hospital outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* investigated by RAPD typing and analysis of the genetics and mechanisms of resistance. *J Hosp Infect.* 1998 Aug;39(4):291-300.
 63. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987 Sep;20(3):323-34.
 64. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug;10(4):879-84.
 65. Steward CD, Wallace D, Hubert SK, Lawton R, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000 Sep;38(1):59-67.
 66. Stuenkel E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect.* 2003 Nov;47(4):273-95.
 67. Stuenkel E, Sobottka I, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Jan;51(1):51-5.
 68. Szabo D, Mathe A, Filetoth Z, Anderlik P, Rokusz L, Rozgonyi F. In vitro and in vivo activities of amikacin, cefepime, amikacin plus cefepime, and imipenem against an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1287-91.
 69. Tallis E, Rudensky B, Attias D, Raveh D, Schlesinger Y, Yinnon AM. In-vitro activity of cefepime and other broad-spectrum antimicrobials against several groups of gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999 Oct;35(2):121-6.
 70. Thomson KS, Smith Moland E. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* 2000 Aug;2(10):1225-35.
 71. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 1995 Oct;21(4):915-23.
 72. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15;32 Suppl 2:S94-103.
 73. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9): 3121-6.
 74. Yong D, Lim Y, Song W, Choi YS, Park DY, Lee H, Yum JH, Lee K, Kim JM, Chong Y. Plasmid-mediated, inducible AmpC beta-lactamase (DHA-1)-producing *Enterobacteriaceae* at a Korean hospital: wide dissemination in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* and emergence in *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Jun 1.
 75. Yong D., Lee K., Yum JH., Shin HB., Rossolin GM., Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002 40(1): 3798-3801.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Eduardo Monguilhott Dalmarco - eduardodal@furb.br
Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS – FURB,
CAMPUS III, Itoupava Seca - Rua Iguatçu, 2171 – CEP. 89030-000
Blumenau - SC

Susceptibilidade antimicrobiana de *Moraxella catarrhalis* isolada de infecções do trato respiratório

Antibiotic-susceptibility of *Moraxella catarrhalis* isolated from respiratory tract infections

Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva

RESUMO - *Moraxella catarrhalis* pode normalmente ser encontrada no trato respiratório superior. Esta bactéria, entretanto, pode causar infecções como otite média aguda, sinusite, conjuntivite, bronquite crônica, pneumonia, endocardite, septicemia e meningite. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *M. catarrhalis* foram os agentes etiológicos principais nas infecções do trato respiratório neste estudo. Os maiores problemas de resistência associados com estas espécies são aqueles associados à resistência aos beta-lactâmicos. A enzima beta-lactamase foi produzida por mais de 80% das cepas de *M. catarrhalis*. A susceptibilidade a ampicilina, amoxicilina/clavulanato, cefuroxima, eritromicina e ciprofloxacina foi testada em 137 cepas de *M. catarrhalis*. Todas as cepas resistentes a ampicilina produziram beta-lactamase e foram sensíveis a combinação amoxicilina/clavulanato. Para *M. catarrhalis* os antimicrobianos mais ativos foram a cefuroxima (99%), ciprofloxacina (99%) e eritromicina (93%).

PALAVRAS-CHAVE - *Moraxella catarrhalis*, infecção do trato respiratório, beta-lactamase.

SUMMARY - *Moraxella catarrhalis* may normally be found in the upper respiratory tract. This bacterium, however, may cause infections such as acute otitis media, sinusitis, conjunctivitis, bronchitis chronica, pneumonia, endocarditis, septicemia and meningitis. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *M. catarrhalis* were the main causative agents responsible for respiratory tract infections in this study. The major resistance problems associated with these species are those which cause resistance to beta-lactams. Beta-lactamase was produced by >80% *M. catarrhalis* strains. The susceptibility to ampicillin, amoxicillin/clavulanate, cefuroxime, erythromycin, and ciprofloxacin was tested in 137 *M. catarrhalis* strains. All the strains resistant to ampicillin produced beta-lactamase and were sensitive to amoxicillin/clavulanate. For *M. catarrhalis*, the most active antimicrobials included cefuroxime (99%), ciprofloxacin (99%) and erythromycin (93%).

KEYWORDS - *Moraxella catarrhalis*, respiratory tract infection, beta-lactamase.

INTRODUÇÃO

Moraxella catarrhalis é um cocobacilo Gram-negativo, catalase e oxidase negativo. É frequentemente encontrada como comensal no trato respiratório superior humano, particularmente em crianças². Esta bactéria, entretanto, pode causar certas infecções tais como otite média, sinusite e conjuntivite em crianças e adultos⁵. Além disso, *M. catarrhalis* tem sido relacionada a diversos episódios de infecções do trato respiratório inferior tais como bronquite crônica, particularmente em pacientes idosos. Em condições de baixa imunidade, *M. catarrhalis* pode causar pneumonia, endocardite, septicemia, artrite e meningite¹. Há diversas publicações descrevendo infecções hospitalares causadas por *M. catarrhalis*, as quais definitivamente aumentam a significância destas bactérias como agentes etiológicos importantes em infecções humanas tanto comunitárias quanto hospitalares^{4,21}.

Em pacientes com neoplasias, doenças crônicas de pulmão e com deficiência no sistema imunológico, a *Moraxella* pode ser causadora de doenças sistêmicas como bacteriemias, sepse, endocardites, meningites e infecções do trato urinário, embora essas sejam mais raras^{12,17}.

O aumento da resistência destas bactérias aos antibióticos beta-lactâmicos tem se tornado um problema constante e preocupante em todo o mundo⁷. O único mecanismo significativo de resistência aos beta-lactâmicos encontrado em *M. catarrhalis* é a produção constitutiva de beta-lactamase BRO-1 (mais de 90% dos casos) e BRO-2, fazendo com que esta bactéria seja resistente à penicilina, ampicilina e amoxicilina^{11,14}. Todas estas beta-lactamases são inibidas pela presença de inibidores de beta-lactamase como sulbactam e clavulanato de potássio^{8,20}.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade de cepas de *M. catarrhalis* aos antibióticos comumente utilizados em sua erradicação.

MATERIAL E MÉTODOS

O material para análise incluiu 137 cepas de *M. catarrhalis* isoladas de janeiro de 2003 a dezembro de 2004 a partir de 137 pacientes, dos quais 23% ambulatoriais e 77% hospitalizados, atendidos pelo Laboratório Marcos Daniel (Vitória/ES) com sinais e sintomas de várias doenças do trato respiratório, tais como: rinite crônica (45), faringite (29), bronquite crônica (53), pneumonia (9) e broncopneumonia (1). A média de idade dos pacientes variou entre 3 e 16 anos (31 pacientes), 28-32 anos (13 pacientes) e 45-82 anos (83 pacientes). Os materiais analisados (escarro [61], lavados brônquicos [2], swabs de orofaringe [28] e swabs nasais [46]) foram inoculados em placas contendo ágar chocolate suplementado e ágar sangue de carneiro a 5%. A identificação foi baseada em características bioquímicas de *M. catarrhalis* (AutoScan-4® Dade Behring). O perfil de sensibilidade foi determinado pelo método de disco-difusão utilizando-se os seguintes antibióticos: ampicilina 10µg, amoxicilina/clavulanato 20/10µg, cefuroxima 30µg, eritromicina 15µg, ciprofloxacina 5µg e meio de Mueller-Hinton (Merck) com incubação das placas a 35°C durante 20 horas. A produção de beta-lactamase foi determinada pelo uso de discos de cefalosporina cromogênica (nitrocefina, bioMérieux).

Recebido em 22/06/2005

Aprovado em 06/02/2006

Farmacêutico-Bioquímico-Microbiologista

Universidade Federal do Espírito Santo; Centro Tecnológico de Análises (CETAN) – Vitória/ES

RESULTADOS

Oitenta e nove (65%) das 137 cepas de *M.catarrhalis* incluídas neste estudo foram obtidas a partir de monocultura, enquanto 48 (35%) foram isoladas a partir de cultivos com flora microbiana acompanhante (Figuras 1 e 2). Cinquenta e quatro por cento das cepas foram isoladas a partir de espécimes clínicos do trato respiratório superior (33,5% a partir de swabs nasais, 20,5% de swabs de orofaringe) enquanto 46% das cepas foram isoladas a partir do trato respiratório inferior (44,5% a partir de escarro e 1,5% de lavados brônquicos).

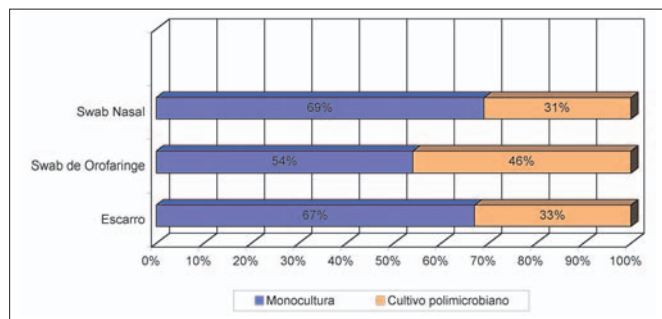


Figura 1: *M.catarrhalis* isoladas em infecções do trato respiratório.

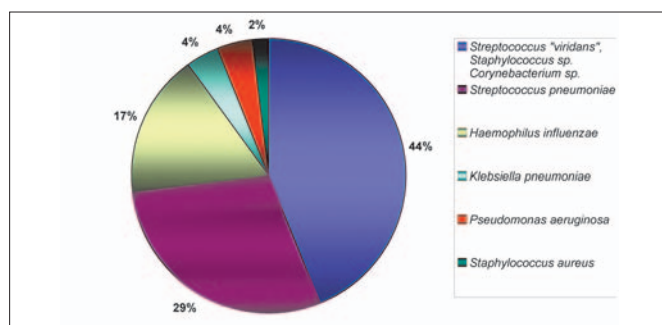


Figura 2: Bactérias isoladas juntamente com *M.catarrhalis* nas infecções do trato respiratório.

Sessenta e três por cento das cepas isoladas a partir do trato respiratório inferior foram resistentes à ampicilina, além de cepas isoladas também demonstrarem resistência à cefuroxima, eritromicina e ciprofloxacina. Das cepas isoladas da nasofaringe, 26% foram resistentes à ampicilina, 12% foram resistentes à eritromicina e todas elas foram sensíveis ao ciprofloxacina e à cefuroxima. A diferença na sensibilidade à eritromicina observada nas cepas de *M.catarrhalis* isoladas dos tratos respiratórios superior e inferior foram estatisticamente significantes ($p=0,02$).

No total, 57% das cepas demonstraram sensibilidade à ampicilina, 100% das cepas foram sensíveis à amoxicilina/clavulanato, 99,3% foram sensíveis à cefuroxima, 93,5% foram sensíveis a eritromicina e 99,3% foram sensíveis ao ciprofloxacina.

As cepas isoladas a partir de escarro produziram beta-lactamase mais frequentemente do que aquelas cepas isoladas de swabs nasais e de orofaringe ($p=0,001$).

DISCUSSÃO

O papel da *M.catarrhalis* nas infecções do trato respiratório inferior continua sendo discutido como de grande importância. Devido à presença da *M.catarrhalis* na cavidade oral e na nasofaringe, não se pode excluir a possibilidade de contaminação do escarro durante a coleta^{6,9,22}.

M.catarrhalis tem recebido mais atenção recentemente como agente etiológico importante em casos de bronquites agudas e crônicas. Isso pode ser observado principalmente pelo fato desta bactéria ser encontrada no trato respiratório superior de mais de 50% das crianças com menos de 10 anos de idade e somente em cerca de 5% dos adultos^{16,19}. A colonização da nasofaringe é um fator de risco significativo no desenvolvimento de otite média em crianças e sinusite e bronquite em adultos. Além disso, *M.catarrhalis* é responsável por aumentar a severidade da doença no caso de infecção conjunta com *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*^{3,8,15}.

S.pneumoniae, *H.influenzae* e *M.catarrhalis* juntos somam mais de 80% dos isolados obtidos a partir de espécimes clínicos dos tratos respiratórios inferior e superior de pacientes ambulatoriais e cerca de 35% dos isolados obtidos a partir de pacientes hospitalizados^{13,15}, inclusive a infecção conjunta destes microrganismos tem um papel altamente significativo na patogênese das infecções do trato respiratório humano¹. É também conhecido o comum envolvimento de *M.catarrhalis* em infecções do trato respiratório em pacientes com mais de 60 anos de idade^{8,12}.

No material clínico analisado neste estudo, as cepas mais comumente isoladas foram de pacientes adultos hospitalizados devido a bronquites crônicas e pneumonia. As cepas de pacientes ambulatoriais foram isoladas principalmente de crianças com sintomas de rinite e faringite. Cerca de 60% das cepas de *M.catarrhalis* foram isoladas em monocultura (Figura 1), o que confirma os dados referentes à colonização das vias respiratórias das crianças e pacientes hospitalizados por esta bactéria^{1,9,14,22}. De forma semelhante aos estudos de outros autores^{6,7,11,20}, foi observado em nosso trabalho que *M.catarrhalis* foi isolada mais frequentemente associada com *S.pneumoniae* e *H.influenzae* quando comparado com o seu isolamento concomitante com *Staphylococcus aureus* e bastonetes Gram-negativos (Figura 2).

Atualmente, o problema mais importante é associado com o aumento da resistência de *M.catarrhalis* aos antibióticos beta-lactâmicos, determinada pela presença de beta-lactamase, considerado o fator de virulência mais importante desta bactéria. No presente estudo, 43% das cepas analisadas foram produtoras de beta-lactamase, sendo 63% das cepas beta-lactamase positivas isoladas do trato respiratório inferior e 26% isoladas a partir do trato respiratório superior. A média das cepas resistentes à ampicilina observadas no presente estudo foi menor do que os achados de outros autores. Nos Estados Unidos, a resistência à ampicilina chega a mais de 90% das cepas de *M.catarrhalis* isoladas¹³, enquanto que em vários países da Europa este índice chega a 100% (França, Espanha e Polônia)¹⁰.

Este estudo revelou que a *M.catarrhalis* responsável por infecções do trato respiratório inferior produziram beta-lactamase mais frequentemente do que as cepas isoladas da nasofaringe, onde esta bactéria também pode ser encontrada como parte da microbiota comensal. Entretanto, todas as cepas de *M.catarrhalis* isoladas foram sensíveis à combinação amoxicilina/clavulanato, mais de 96% foram sensíveis à cefuroxima e mais de 99% foram sensíveis ao ciprofloxacina, drogas geralmente utilizadas no Brasil na terapêutica de infecções respiratórias.

Quase todas as cepas de *M.catarrhalis* são sensíveis a grupos de antibióticos como as fluorquinolonas, macrolídeos, tetraciclina e sulfas. Somente algumas cepas isoladas a partir de escarro e analisadas neste estudo foram resistentes à cefuroxima, eritromicina e ciprofloxacina, enquanto

12% das cepas isoladas da nasofaringe foram resistentes à eritromicina e todas as cepas foram sensíveis à cefuroxima e ao ciprofloxacina. O fato de que as cepas isoladas a partir de pacientes ambulatoriais foram mais frequentemente resistentes à eritromicina quando comparadas àquelas isoladas de pacientes hospitalizados provavelmente reflete o aumento da popularidade dos novos macrolídeos no tratamento ambulatorial das infecções respiratórias^{6,14}.

CONCLUSÕES

Dentre as cepas analisadas, aquelas produtoras de beta-lactamase foram mais frequentemente isoladas do trato respiratório inferior em relação àquelas obtidas a partir do trato respiratório superior. A resistência à ampicilina observada nas cepas isoladas foi prontamente evidenciada como sendo devido à produção de beta-lactamase. Cefuroxima, eritromicina e ciprofloxacina mostraram quase 100% de atividade contra as cepas de *M. catarrhalis* isoladas neste estudo. As cepas isoladas da nasofaringe foram frequentemente mais resistentes à eritromicina do que as cepas isoladas do trato respiratório inferior. Apesar da resistência de *M. catarrhalis* a antibióticos não beta-lactâmicos ser rara, a sensibilidade antibiótica deve ser constantemente monitorada com a finalidade de detectar o aumento dos perfis de resistências desta bactéria, o que é particularmente importante para os casos de terapia empírica.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a colaboração da Dra. Márcia Tomaz Freire pela criteriosa revisão deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Abbott, M. 1992. Neisseriaceae and Moraxella sp.: the role of related microorganisms associated with conjunctivitis in the newborn. *Int. J. STD AIDS* 3:212-213.
- Abuhammour, W. M.; Abdel-Haq, N. M.; Asmar, A. I.; Dajani, A. S. 1999. Moraxella catarrhalis bacteremia: a 10-year experience. *South. Med. J.* 92:1071-1074.
- Aebi, C.; Stone, B.; Beucher, M.; Cope, L. D. *et al.* 1996. Expression of the CopB outer membrane protein by Moraxella catarrhalis is regulated by iron and affects iron acquisition from transferrin and lactoferrin. *Infect. Immun.* 64:2024-2030.
- Aebi, C.; Lafontaine, E. R.; Cope, L. D. *et al.* 1998. Phenotypic effect of isogenic uspA1 and uspA2 mutations on Moraxella catarrhalis 035E. *Infect Immun.* 66:3113-3119.
- Ahmed, K.; Rikitomi, N.; Ichinose, A.; Matsumoto, K. 1991. Possible presence of a capsule in Branhamella catarrhalis. *Microbiol. Immunol.* 35:361-366.
- Ahmed, K.; Nakagawa, T.; Nakano, Y. *et al.* 2000. Attachment of Moraxella catarrhalis occurs to the positively charged domains of pharyngeal epithelial cells. *Microb. Pathog.* 28:203-209.

- Arkwright, J. A. 1997. On the occurrence of the Micrococcus catarrhalis in normal and catarrhal noses and its differentiation from the other Gram-negative diplococci. *J. Hyg.* 7:145-154.
- Bootsma, H. J.; van Dijk, H.; Verhoef, J.; Fleer, A.; Mooi, F. R. 1996. Molecular characterization of the BRO beta-lactamase of Moraxella (Branhamella) catarrhalis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:966-972.
- Bovre, K. 1984. The Genus Moraxella, p.296-303. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Boyle, F. M.; Georgioui, P. R.; Tilse, T. H.; McCormack, J. G. 1991. Branhamella (Moraxella) catarrhalis: pathogenic significance in respiratory infections. *Med. J. Aust.* 154:592-596.
- Brook, I. 1986. Direct and indirect pathogenicity of Branhamella catarrhalis. *Drugs* 31(Suppl. 3):97-102.
- Brook, I. 1991. In vitro susceptibility vs. in vivo efficacy of various antimicrobial agents against the Bacteroides fragilis group. *Rev. Infect. Dis.* 13:1170-1180.
- Brook, I. 1997. Aerobic and anaerobic microbiology of bacterial tracheitis in children. *Pediatr. Emerg. Care* 13:16-18.
- Cohen, R. 1997. The antibiotic treatment of acute otitis media and sinusitis in children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 27:35-39.
- Collazos, J.; de Miguel, J.; Ayarza, R. 1992. Moraxella catarrhalis bacteremic pneumonia in adults: two cases and review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:237-240.
- Cook, P. P.; Hecht, D. W.; Snyderman, D. R. 1989. Nosocomial Branhamella catarrhalis in a paediatric intensive care unit: risk factors for disease. *J. Hosp. Infect.* 13:299-307.
- Goldenherhsh, M. J.; Rachelefsky, G. S.; Dudley, J. *et al.* 1990. The microbiology of chronic sinus disease in children with respiratory allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85:1030-1039.
- McGregor, K.; Chang, B. J.; Riley, T. V. 1998. Moraxella catarrhalis: clinical significance, antimicrobial susceptibility and BRO beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:219-234.
- McLeod, D. T.; Ahmad, F.; Capewell, S. *et al.* 1986. Increase in bronchopulmonary infection due to Branhamella catarrhalis. *Br. Med. J.* 292:1103-1105.
- Thornsberrry, C.; Jones, M. E.; Hickey, M. L. *et al.* 1999. Resistance surveillance of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis isolated in the United States, 1997-1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:749-759.
- Thorsson, B.; Haraldsdottir, V.; Kristjansson, M. 1998. Moraxella catarrhalis bacteraemia. A report on 3 cases and a review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 30:105-109.
- Wood, G. M.; Johnson, B. C.; McCormack, J. G. 1996. Moraxella catarrhalis: pathogenic significance in respiratory tract infections treated by community practitioners. *Clin. Infect. Dis.* 22:632-636.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva
Rua Lúcio Bacelar, 16/803 - Praia da Costa
CEP: 29101-030 - Vila Velha / ES
carloshenrique@speedup.com.br

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Caracterização e correlação do fenômeno pró-zona com títulos de sororeatividade do VDRL e reação de imunofluorescência indireta em soros de pacientes com sífilis

Characterization and correlation of prozone phenomenon with seroreactivity and indirect immunofluorescence in sera from patients with syphilis

Luciana Karla Araújo de Azevedo¹; Paulo Sergio Gomes Fernandes¹; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva (MSc)^{1,2}; Manoel Josué Batista Neto³; Maria Gorete Lins de Queiroz⁴; Valéria Cristina Ribeiro Dantas (MSc)⁵; Valéria Soraya de Farias Sales (MD, MSc, PhD)⁶ & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc, PhD)⁶

RESUMO - Introdução: *Treponema pallidum* é o agente etiológico da sífilis uma doença sexualmente transmissível. No imunodiagnóstico dessa doença utilizam-se dois diferentes tipos de testes sorológicos. Inicialmente, as amostras são triadas qualitativamente e quantitativamente por um teste não treponêmico como o *veneral disease research laboratory* (VDRL) e, em seguida, os soros reagentes são testados para a detecção de anticorpos específicos para o *Treponema pallidum*, como a reação de imunofluorescência indireta através do *fluorescent treponemal antibody absorption assay* (FTA-ABS). Objetivos e Metodologia: Avaliar através do VDRL quantitativo e qualitativo a sororeatividade de 40 pacientes com sífilis e comparar com a presença do fenômeno pró-zona e resultados obtidos pelo FTA-ABS. Resultados e Discussão: Os níveis de reatividade das amostras testadas pelo VDRL variaram de 1:2 a 1:256. O fenômeno pró-zona foi observado em 8/40 soros (20%) se correlacionando com altos títulos de reatividade na maioria dos casos. O FTA-ABS foi reagente em 39/40 amostras (97,5%) apresentando forte e moderada reatividade independente dos títulos obtidos pelo VDRL e a presença ou ausência do fenômeno pró-zona na maioria dos casos, demonstrando uma maior sensibilidade desse exame quando comparado com o VDRL. Conclusão: Nossos resultados mostraram a importância da realização do VDRL quantitativo e qualitativo na investigação seguida pelo FTA-ABS na investigação sorológica da sífilis.

PALAVRAS-CHAVE - Sífilis, *Treponema pallidum*, *Veneral Disease Research Laboratory*, *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Assay*.

SUMMARY - Introduction: *Treponema pallidum* is the aetiological agent of syphilis, a sexually transmitted disease and the serology is essential for screening and diagnosis. In the immunodiagnosis of this disease, two different sorts of serological tests are used. First the sera are screened in a quantitative and qualitative manner by a nontreponemal test such as the *veneral disease research laboratory* test (VDRL), then the reactive sera are tested for specific treponemal antibodies using the *fluorescent treponemal antibody absorption assay* (FTA-ABS). Objectives and Methodology: To evaluate, using quantitative and qualitative VDRL, the sera reactivity of 40 patients bearing syphilis and compare these results to presence of prozone phenomenon and FTA-ABS. Results and discussion: The levels of sera reactivity in the VDRL test ranged from 1:2 to 1:256. The prozone phenomenon was observed in 8/40 samples (20%) and was correlated with high levels of VDRL in most of the cases. The FTA-ABS test was reactive in 39/40 cases (97,5%) with strong and moderate fluorescence intensity in most of the samples and it was independent of the VDRL reactivity levels and the presence or absence of prozone phenomenon in most of the cases, demonstrating a higher sensibility of this method when compared to the VDRL test. Conclusion: Our results showed the importance of qualitative and quantitative VDRL assay in the serological investigation of syphilis.

KEYWORDS - Syphilis; *Treponemal pallidum*; *Veneral Disease Research Laboratory* and *fluorescent treponemal antibody absorption assay*.

INTRODUÇÃO

A sorologia para sífilis compreende basicamente dois tipos. Após testes com princípios distintos. Um teste não-treponêmico e, portanto, não específico e um mais específico em que se utiliza o próprio *Treponema pallidum* ou seus produtos antigênicos¹⁻⁵.

Dentre as provas não-treponêmicas, destaca-se o "*Veneral Disease Research Laboratory*" (VDRL) que emprega como antígeno a cardiolipina, isto é, lipídio purificado de coração de boi adicionado de colesterol e lecitina, em álcool etílico que são aglutinados em presença de soro reagente¹⁻⁶.

Dentre as provas treponêmicas, destaca-se a reação de imunofluorescência indireta, (IFI) com o teste "*Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption*" (FTA-ABS), realizado

após absorção para bloqueio de anticorpos não específicos, eventualmente presentes no soro, a reação de hemoaglutinação ou "*Treponema pallidum* Hemoaglutinação Assay" (TPHA) e os testes imunoenzimáticos que são mais específicos e sensíveis, sendo, no entanto, inadequados para avaliar a eficácia do tratamento, pois, na maioria dos casos, a reação permanece positiva para o resto da vida, apesar da cura clínica^{1-5, 7-8}.

Quando um indivíduo se infecta, o *Treponema pallidum* determina a formação de dois tipos de anticorpos: i) anticorpos não específicos, denominados de "reagentes", que reconhecem os lipídios originários do treponema e liberados dos tecidos lesionados do indivíduo infectado; os testes para detecção destes anticorpos são do tipo não-treponêmicos como o VDRL e, ii) anticorpos específicos (anti-treponema)

Recebido em 27/07/2005

Aprovado em 16/02/2006

Trabalho apresentado ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT/UFRN) para elaboração de monografia de conclusão do Curso de Farmácia na habilitação de Farmacêutico-Bioquímico, Analista Clínico.

¹Ex-alunos da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT/UFRN; ²Ex-bolsista de iniciação científica da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT/UFRN;

³Farmacêutico-Bioquímico responsável pelo Setor de Sorologia do Hemocentro do Rio Grande do Norte - HEMONORTE; ⁴Farmacêutica-Bioquímica responsável pelo Laboratório de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Norte - LACEN / RN; ⁵Professora do Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Potiguar (UNP); ⁶Professores Adjunto da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT/UFRN.

que são evidenciados através dos testes treponêmicos com o FTA-ABS, TPHA ou os métodos imunoenzimáticos¹⁻⁵. Embora o VDRL não seja imunologicamente específico para a sífilis e também não seja o mais sensível, é o teste de triagem mais empregado no Brasil graças a sua facilidade de execução e baixo custo. É utilizado em larga escala nos laboratórios de análises clínicas e serviços de hemoterapia, sendo também o teste de escolha para a avaliação da eficácia do tratamento de indivíduos infectados com o *Treponema pallidum*¹⁻⁵.

O VDRL, no entanto, está sujeito a resultados falso negativos e falso positivos. Uma grande produção de anticorpos, principalmente na sífilis secundária, pode determinar o chamado "fenômeno pró-zona", que ocorre devido a uma grande quantidade de anticorpos presentes no soro puro, tornando-se reagente quando o teste é feito a partir do soro previamente diluído. O "fenômeno pró-zona" ocorre em cerca de 1% dos pacientes com sífilis secundária, não sendo observado nos testes treponêmicos¹⁻⁵. Resultados falsos positivos, por sua vez, podem ser observados em algumas condições como em doenças auto-imunes como no lúpus eritematoso sistêmico (LES) em algumas doenças febris e em alguns casos de gestações¹⁻⁵.

O FTA-ABS constitui ainda hoje o método treponêmico mais empregado na sorologia para sífilis, sendo a sua execução dividida em duas etapas: ii) A primeira fase consiste em absorver os anticorpos inespecíficos resultantes de outros treponemas não patogênicos que são sarprofitas do homem. Este procedimento se faz diluindo o soro do paciente em uma solução de extrato de treponema sarprofita (treponema de Reiteri). ii) Na segunda fase, incuba-se o soro absorvido em retículos de uma lâmina de imunofluorescência contendo treponema pallidum fixados. A reação antígeno-anticorpo é revelada após a adição de um anticorpo antiimunoglobulina humana conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). Em caso de reação positiva, a presença de anticorpos antitreponema é evidenciada pela emissão de fluorescência verde dos treponemas marcados na lâmina quando visualizadas no microscópio de imunofluorescência^{3-5, 7-8}.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar através do VDRL a presença do fenômeno pró-zona em soros de indivíduos com sífilis e a correlação desses resultados com o obtidos no FTA-ABS.

MATERIAIS E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Foram analisadas amostras de soro de 40 indivíduos descritos com sorologia positiva para sífilis, oriundas do Laboratório de Sorologia do Hemocentro do Rio Grande do Norte Dalton Cunha Bezerra e do Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Almino Fernandes, para realização do VDRL quantitativo e qualitativo e também o FTA-ABS.

METODOLOGIA

1. Coleta de Amostras

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa e acondicionadas em tubos de tipo vacutainer sem anticoagulante (Tubos Vacutaine; Becton Dickinson and Company, USA). Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados, o soro separado da parte sólida, acondicionado em tubos do tipo Eppendorf (Tubos Eppendorf; Bec-

ton Dickinson and Company, USA) devidamente identificados e estocados em um freezer a -20° C até o momento das análises.

2. Reação do Veneral Diseases Research Laboratory (VDRL)

A realização do VDRL foi realizada inicialmente em amostras não diluídas. Em uma escavação da placa de Kline foi pipetado 20 µL de soro puro e 20 µL de suspensão antigênica para o VDRL (Kit para determinação do VDRL; WAMA Diagnóstica, Brasil). As placas foram colocadas em um agitador de placas (Agitador orbital, Fanen, Brasil) e submetidos a uma leve agitação por um período de 5 minutos, sendo em seguida levadas para análise em um microscópio óptico, usando uma objetiva de 10x (Microscópio Óptico, Olympus, Brasil).

Os resultados foram expressos da seguinte forma:

- 1- Não reagentes: sem floculação ou (-)
- 2- Fracamente reagente: floculação leve ou borderline (+)
- 3- Moderadamente reagente: floculação moderada ou (++)
- 4- Fortemente reagente: floculação forte ou (+++)

Após a análise preliminar com os soros puros, as amostras foram submetidas a um VDRL quantitativo, através de uma diluição seriada, dobrando-se as diluições a partir de 1:2 (100 µL de soro para 100 µL de salina), até o título final onde ocorreu a floculação. Considerou-se positivo o último título onde se observou a presença de floculação.

3. Reação de imunofluorescência indireta ou *Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption* (FTA-ABS)

3.1. Preparo das lâminas para o teste

As reações de IFI foram realizadas em lâminas de microscopia próprias para reação de imunofluorescência (Lâminas para imunofluorescência com 10 microcírculos de 7 mm de diâmetro; Biolab-Mériex SA, Brasil).

Procedeu-se à reconstituição do antígeno (*Treponema Pallidum* - cepa Nicols; Biolab-Meriex SA, Brasil) em água destilada estéril, no volume indicado pelo fabricante, homogeneizando por inversão.

Após lavar, desengordurar e secar as lâminas, espalhou-se 10 µL da suspensão antigênica em cada área circular das lâminas, deixando-as secarem a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a secagem das lâminas, procedeu-se à fixação das mesmas com acetona PA (Acetona PA; Reagem, Brasil) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram embaladas em papel alumínio e conservadas em freezer a -20° C, até a ocasião das análises.

3.2. Processo de absorção (FTA sorbent)

1. Procedeu-se à identificação dos tubos para cada soro a ser testado;
2. Adicionou-se 200 µL do sorbente em cada tubo, preparado a partir de cultura de *Treponema de Reiter*, (FTA-Sorbent; Biolab-Meriex SA, Brasil), pipetando-se em seguida 50 µL do soro, homogeneizando a mistura (diluição final de 1:5). Posteriormente, os tubos contendo a mistura foram colocados em banho-maria a 37° C (Banho maria, Fanen, Brasil), por 30 minutos.

3.3. Técnica de imunofluorescência indireta

No momento das análises, as lâminas foram retiradas do freezer e descongeladas à temperatura ambiente por 15 minutos ainda sob proteção do papel alumínio. Esta proteção foi então retirada, sendo realizada a identificação das mesmas. Recobriu-se os círculos das lâminas previamente identificadas e contendo *Treponema pallidum* com 20 µL do soro diluído na solução sorbente.

As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em uma estufa a 37° C (Estufa bacteriológica, Fanen, Brasil) por 60 minutos.

Após este período, as lâminas foram retiradas da estufa, e rinsadas com solução salina tamponada com fosfatos ou *phosphate buffer saline* (PBS) e incubadas por 5 minutos em uma jarra de coplin contendo água destilada, procedendo-se à secagem das mesmas com papel absorvente.

Adicionou-se sobre cada orifício das lâminas 20 µL do conjugado (imunoglobulina de cabra anti fração FC da IgG humana, marcada com FITC (Fluoline G, Biolab-Mérieux SA, Brasil), previamente diluído na proporção de 1:100 em uma solução contendo 1 mg de azul de Evans, diluído em PBS e contendo 2% de Tween -20 e incubadas novamente e câmara úmida a 37°C por 30 minutos.

Após esta etapa, as lâminas foram retiradas da estufa, rinsadas com PBS e incubadas por 5 minutos em uma jarra de Coplin contendo água destilada, procedendo-se em seguida à secagem das lâminas com papel absorvente e jato de ar. Após esse procedimento, as lâminas foram cobertas com uma lamínula em glicerina tamponada pH 8.7 e examinadas no microscópio dotado de luz ultravioleta, utilizando objetiva de 40x ou de imersão, com filtros para FITC e filtro barreira laranja (Microscópio de Imunofluorescência, Olympus modelo BX41, Brasil).

Os resultados foram expressos de acordo com o brilho relativo da fluorescência dos treponemas, conforme observado na figura 1:

- 1- Não reagentes: sem fluorescência ou (-);
- 2- Fracamente reagente: fluorescência fraca ou *boderline* (+);
- 3- Moderadamente reagente: fluorescência moderada ou (++);
- 4- Fortemente reagente: fluorescência forte ou (+++)

4- Análise estatística

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

Para correlação dos resultados dos títulos de reatividade do VDRL e a presença do fenômeno pró-zona e também com a reação do FTA-ABS, empregou-se os testes estatísticos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, respectivamente, através do *software* estatístico *Statistic Pack for Social Sciences* (SPSS for Windows versão 9.0; Copyright © SPSS, INC), sendo considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Ainda, para análise da correlação entre a os valores da titulação dos soros pelo VDRL nas amostras e presença ou não do fenômeno pró-zona, empregou-se gráficos de dispersão demonstrativo da distribuição dos valores dos títulos reagentes, empregando o *software* Microsoft® Excel 2000 versão 9.0.

RESULTADOS

Oito das 40 amostras de soro analisadas (20%) apresentaram o fenômeno pró-zona. Dois destes casos apresentaram um padrão não reagente (ausência de floculação) na amostra não diluída e floculação intensa quando diluídas a 1:8. Os outros seis soros apresentaram reação *boderline* nas amostras não diluídas, contrastando, também, com os resultados fortemente reagentes quando diluídas a 1:8 (Tabelas I e II). Os títulos dos soros reagentes variaram de 1:2 a 1:256, sendo observado uma correlação entre a presença do fenômeno pró-zona e títulos elevados nas análises do VDRL ($p < 0,000$), demonstrando o mecanismo competitivo entre os anticorpos pelos antígenos que impedem a formação de agregados antígeno-anticorpo o que caracteriza o fenômeno pró-zona (Tabela 2 e Figura 2).

As análises dos resultados do FTA-ABS demonstraram reação fortemente reagente em 18 e moderada em 14 amostras analisadas, correspondendo a 45% e 35% dos casos, respectivamente, não sendo observado, no entanto,

correlação estatisticamente significativa entre intensidade da fluorescência do FTA-ABS e títulos de reatividade do VDRL ($p = 0,57$). Reações do tipo *boderline* e não reagentes foram observados em 7 (17,5%) e 1 (2,5%) das amostras, respectivamente, correlacionando-se com baixos títulos de reatividade do VDRL (Tabela III).

Tabela I
Frequência de sororeatividade para o VDRL em amostras diluídas e não diluídas

Amostras (Soros)	Reagentes nº (%)	Não reagentes nº (%)	Total nº (%)
Não Diluídos	38 (95,5%)	2 (5,0%)	40 (100)
Diluídos	40 (100%)	0 (-)	40 (100)

Tabela II
Intensidade da reatividade e respectivos títulos nas 8 amostras com fenômeno pró-zona determinado pela reação do VDRL.

Amostras nº	Não diluído (Reatividade)	Diluído 1:8 (Reatividade)	Título Final (Diluição)
# 02	(+)	(+++)	1:128
# 13	(+)	(+++)	1:64
# 17	(+)	(+++)	1:256
# 24	(+)	(+++)	1:256
# 26	(-)	(+++)	1:256
# 27	(-)	(+++)	1:128
# 32	(+)	(+++)	1:128
# 33	(+)	(+++)	1:32

Padrões de reatividade para o VDRL: (-) não reagente, (+) fracamente reagente ou *boderline*, (++) moderadamente reagente, (+++) fortemente reagente.

Tabela III
Correlação entre os títulos obtidos pelo VDRL e intensidade da fluorescência do FTA-ABS nas amostras de pacientes com sífilis.

Amostras	VDRL (Título)	FTA-ABS	Amostras	VDRL (Título)	FTA-ABS
# 01	1:8	+	# 21	1:8	++
# 02	1:128	+++	# 22	1:64	+++
# 03	1:64	+++	# 23	1:8	++
# 04	1:32	+++	# 24	1:256	+++
# 05	1:128	+++	# 25	1:8	++
# 06	1:32	++	# 26	1:256	+++
# 07	1:16	+++	# 27	1:128	+++
# 08	1:128	+++	# 28	1:2	+
# 09	1:32	++	# 29	1:32	+++
# 10	1:16	+++	# 30	1:2	++
# 11	1:2	+	# 31	1:2	++
# 12	1:32	+++	# 32	1:128	+++
# 13	1:64	+++	# 33	1:32	+++
# 14	1:32	+	# 34	1:32	+
# 15	1:8	++	# 35	1:2	+
# 16	1:16	++	# 36	1:16	+++
# 17	1:256	++	# 37	1:16	++
# 18	1:8	+	# 38	1:8	-
# 19	1:16	++	# 39	1:16	++
# 20	1:32	+++	# 40	1:16	++

Padrões de fluorescência para o FTA-ABS: (-) não reagente, (+) fracamente reagente ou *boderline*, (++) moderadamente reagente, (+++) fortemente reagente.



Figura 1- Resultado de uma reação do FTA-ABS fortemente reagente de uma amostra de soro de um paciente com sífilis. (objetiva no aumento 100x)

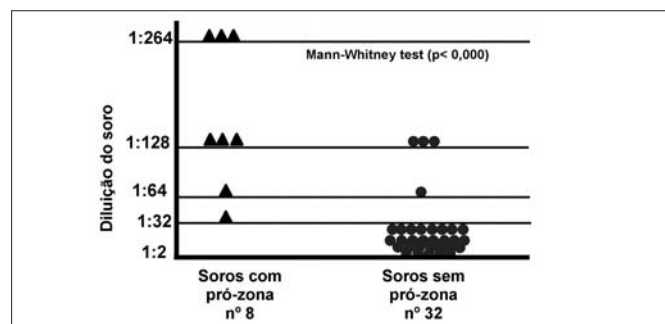


Figura 2- Correlação entre níveis de titulação de reatividade para o VDRL e a presença de fenômeno pró-zona nas amostras analisadas

DISCUSSÃO

Estudos sorológico da infecção pelo *Treponema pallidum* é um ponto crucial no estudo epidemiológico, estágio evolutivo, diagnóstico diferencial e eficácia do tratamento dessa doença¹⁻⁵. O diagnóstico laboratorial da sífilis deve ser efetuado de acordo com o estágio da infecção. Na sífilis primária, a prova laboratorial de escolha é a demonstração do *Treponema pallidum* em amostras das lesões primárias (protossifiloma) por microscopia de campo escuro ou após a coloração pela prata¹⁻⁵. Nessa fase, inicialmente o FTA-ABS e posteriormente o VDRL se positivam depois do surgimento mas, ainda, na vigência do protossifiloma, com sensibilidade maior para o FTA-ABS e para o VDRL (85%) e menor no TPHA^{1-5, 7-9}.

Na sífilis secundária e na sífilis latente recente, todos os testes sorológicos (treponêmicos ou não treponêmicos) são igualmente sensíveis e específicos, alcançando reatividade em 99% a 100% dos casos, porém na sífilis tardia cai para 70% no VDRL, mantendo-se elevada no FTA-ABS, devendo desta forma os pacientes com suspeita clínica de sífilis cardiovascular ou neurosífilis serem avaliados através do FTA-ABS ou outro teste treponêmico e não pelo VDRL^{1-5, 7-9}.

No entanto, a positividade do FTA-ABS pode permanecer para o resto da vida do paciente mesmo após o término do tratamento em virtude da permanência dos anticorpos do tipo IgG de memória, razão pela qual este exame se torna inadequado para avaliação da eficácia do tratamento para sífilis^{1-5, 7-9}.

FTA-ABS com resultados falso positivo ocorrem mais raramente que nos testes não-treponêmicos^{5, 9}. Enquanto no VDRL resultados falsos negativos estão relacionados a anticorpos formados frente a lipídios do próprio organismo³⁻⁵, no FTA-ABS eles podem estar relacionados a um sorbente ineficiente, ou seja, quando não foram absorvidos todos os anticorpos anti-treponema sarpofitas, tratando-se, desta forma, de um erro técnico. Nestes casos, a reação apresenta-se fracamente reagente ou *borderline*, devendo nestes

casos os testes serem repetidos com nova amostra e também investigada a presença de fator reumatóide e de anticorpos antinucleares^{3-5, 10}.

Resultados falsos positivos para o FTA-ABS também podem ser evidenciados em doenças causadas por espiroquetas, tais como na *Borrelia* (Doença de Lyme), leptospirose e febre recidivante^{4, 11}.

Resultados falsos negativos, por sua vez podem ser evidenciados em pacientes imunossuprimidos. Indivíduos com sífilis co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana que podem, algumas vezes, retardar o surgimento de uma reação positiva no FTA-ABS e também no VDRL^{4-5, 12-16}.

Os testes do VDRL, por sua vez, também podem apresentar-se reativos, mesmo na ausência da sífilis. Algumas dessas situações são permanentes durante toda a vida do indivíduo e outras vezes podem ser reativos somente durante determinado período. Dentre as causas permanentes de reações inespecíficas, destacam-se as doenças do colágeno, especialmente o LES, insuficiência hepática e cirrose hepática, na lepra e malária. Pacientes, especialmente mulheres, com o VDRL permanentemente positivo, podem preceder meses ou anos as manifestações clínicas de doenças auto-imunes, como o LES. Dentre as causas transitórias, o VDRL pode ser falso reagente após imunizações, no curso de doenças febris e em alguns casos de gestações³⁻⁵.

Ainda com relação ao VDRL, na sífilis secundária a reação é quase invariavelmente reagente (98% dos casos)¹⁻⁵. Alguns casos negativos são raramente evidenciados e o fenômeno pró-zona é explicado pela grande quantidade de anticorpos que competem entre si, inibindo a formação de flocos da suspensão cardiolipínica. Esta afirmativa foi constatada neste trabalho onde, em 8 amostras com fenômeno pró-zona, observou-se a presença de elevados títulos de reatividade para o VDRL, na maioria deles, quando comparadas com os soros analisados sem a presença do fenômeno pró-zona os quais apresentaram títulos menores de reatividade para o VDRL na maioria dos casos (Figura 2).

Comparando-se ao FTA-ABS, o VDRL é menos sensível e específico, devendo os seus resultados serem confirmados pelos testes treponêmicos, principalmente, quando existe suspeita de resultados falsos positivos ou nos casos de soros com baixos títulos de reatividade¹⁻⁵.

No presente artigo, observamos resultados do FTA-ABS fortemente ou moderadamente reagentes na maioria das amostras, independentemente dos títulos obtidos pelo VDRL, sendo, porém, observado uma correlação entre reações do tipo *borderline* e não reagentes com baixos títulos do VDRL, bem como, na amostra com FTA-ABS negativa, confirmando desta forma uma maior sensibilidade do FTA-ABS quando comparando ao VDRL.

Apesar dessa afirmativa, vale a pena salientar que os testes não-treponêmicos, como o VDRL, são os métodos mais adequados para a avaliação terapêutica da sífilis, em virtude da tendência dos títulos das reaginas sífilíticas desaparecerem rapidamente com a eficácia do tratamento^{3-5, 17}, fato não observado nos testes treponêmicos, em especial no FTA-ABS, em virtude da permanência pelo resto da vida dos anticorpos específicos do tipo IgG anti *Treponema pallidum* pré-formados na fase ativa da doença¹⁻⁵.

CONCLUSÕES

A presença do fenômeno pró-zona foi detectada pelo VDRL em 8/40 amostras, estando mais presentes nas amostras com elevados títulos de reatividade.

Resultados do FTA-ABS fortemente ou moderadamente re-

agentes estavam presentes na maioria dos casos, independentemente do título obtido pelo VDRL e presença ou não do fenômeno pró-zona, demonstrando dessa forma uma maior sensibilidade do FTA-ABS em relação ao VDRL. Apesar disso, as amostras com resultados do FTA-ABS fracamente reagentes ou não reagentes estarem mais presentes nas amostras com baixos títulos do VDRL. Estes dados chamam a atenção da importância do emprego de amostras diluídas na realização do VDRL como forma de evitar a presença de resultados falso negativos em virtude de eventual presença de fenômeno pró-zona.

REFERÊNCIAS

1. Larsen AS, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory Diagnosis and interpretation for syphilis. *Clin Microbiol* 8: 1-21, 1995.
2. Eggleston SI, Turner AJL. Serologic diagnosis of syphilis. *Commun. Dis Public Health* 3:158-162, 2000.
3. Kelly RT. Espiroquetas e Bactéria Espiral in: Henri JB - Diagnóstico Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais. Cap 44, pág 1277-1283; Editora Manole, 18ª edição, 1995.
4. Ravel R. Infecção por Espiroquetas e Riquétsias in: Laboratório Clínico Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais. Cap 15, pág 198-213; Editora Guanabara Koogan, 6ª edição, 1997.
5. Camargo ME. Sífilis in: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2ª Edição. Cap 19, pág 215-220; Editora Guanabara Koogan, 2001.
6. Portnoy J, Brewere HH, Haris A. Rapid plasma reagin card test for syphilis and other treponematoses. *Public Health Rep.* 77: 645-652, 1962.
7. Hunter EF, Deacon WE, Meyer PE. An improved FTA test for syphilis; the absorption procedure (FTA-ABS). *Public Health Rep.* 79: 410-412, 1964.
8. Marangoni A, Sambri V, Storni E, D'Antuono A, Negosanti M, Cevenini R. Treponema pallidum surface immunofluorescence. Assay for serologic diagnosis of syphilis. *Clin Diag Lab Immunol*, 7 (3): 417-421, 2000.

9. Larsen SA, Farshy CE, Pender BJ, Adans MR, Petit DE, Hambie EA. Staining intensities in the fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-Abs) test: association with the diagnosis of syphilis. *Sex Transm Dis.* 13: 221-227, 1986.
10. Kraus SJ, Haserick JR, Lants M. Fluorescent Treponemal antibody-absorption test reactions in lupus erythematosus. Atypical beading pattern and pro-blastic false positive reactions. *N. Engl J. Med.* 333: 1247-1251, 1970
11. Hunter EF, Russel CE, Farshy CE, Sampson JS, Larsen. Evaluation of sera from patients with lyme disease in the fluorescent Treponemal antibody-absorption test for syphilis. *Sex Transm Dis.* 13: 233-236, 1986.
12. Rompalo AM, Cannon RO, Quinn TC, Hook EW. Association of biological false-positive reaction for syphilis with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 165: 1124-1126, 1992.
13. Johnson PDR, Graves L, Stewart R, Warren B, Dwyer, Lucas CR. Specific syphilis serological test may become negative in HIV infection. *AIDS* 5: 419-423, 1991.
14. Erbeling EJ, Vlahov KE, Nells AM, Rompalo AM. Syphilis serology in human immunodeficiency virus infection: evidence of false negative fluorescent Treponemal testing. *J Infect Dis.* 176: 1397-1400, 1997.
15. Sjoval P. HIV infection and loss of Treponemal test reactivity. *Acta Dermat-Ven.* 71: 458, 1991.
16. Frisoli A, Castelo Filho A. Sífilis em indivíduos infectados pelo HIV. *Rev Ass Méd Brasil.* 42 (1): 46-50, 1996.
17. Schroeter AL, Lucas JB, Prince EV, VH Falcone. Treatment of early syphilis and reactivity of serologic tests. *JAMA* 221: 471-476, 1991.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior; Disciplina de Imunologia Clínica; Faculdade de Farmácia; Centro de Ciências da saúde / UFRN.
Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N.
Petrópolis, Natal-RN; CEP: 59010-180. e-mail: gbcjunior@hotmail.com



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Cromoblastomicose: Doença presente na realidade populacional brasileira

Chromoblastomycosis: present disease in brazilian population reality

Evandro Leão Ribeiro¹, Ailton José Soares², Wesley Magno Ferreira³, Clever Gomes Cardoso⁴,
Plínio Lázaro Faleiro Naves⁵ & Sueli Meira da Silva Dias⁶

RESUMO - A cromoblastomicose é uma infecção localizada crônica da pele e tecido subcutâneo preferencialmente envolvendo membros inferiores e caracterizada por lesões geralmente verrucosas. Em muitos casos, as lesões são unilaterais e são causadas por fungos dematiáceos. A doença é muito comum em regiões tropical e subtropical. Os agentes etiológicos de cromoblastomicose são dispersos no meio ambiente, sendo encontrados no solo e na vegetação em decomposição. A infecção ocorre pela inoculação traumática do fungo na pele e a micose é muito prevalente entre indivíduos com ocupações ao ar livre e que andam descalços, sendo comum nos homens. Ainda é uma doença fúngica presente principalmente na população rural brasileira.

PALAVRAS-CHAVE - Cromoblastomicose, micose subcutânea

SUMMARY - The chromoblastomycosis is a chronic localized infection of the skin and subcutaneous tissue most often involving the limbs and usually characterized by crusted lesions. In most cases, the lesions are unilateral, they are caused by dematiaceous fungi. The disease is most common in tropical and subtropical regions. The aetiological agents are widespread in the environment, being found in soil and in the vegetation in decomposition. The infection follows the traumatic inoculation of the fungus into the skin and the mycosis is most prevalent among individuals with outdoor occupations and those who go barefoot, being common in the men. It is still a present fungal disease in the brazilian rural population.

KEYWORDS - Chromoblastomycosis, subcutaneous mycosis

INTRODUÇÃO

Cromoblastomicose (CBM) é uma infecção crônica, granulomatosa da pele e tecido subcutâneo, decorrente da implantação traumática transcutânea de propágulos de diversas espécies de fungos pertencentes à família *Dematiaceae*⁴. Essas espécies fúngicas caracterizam-se por apresentar pigmentação escura em sua parede celular, comumente detectada pela presença de melanina (diidroxinaftalenomelanina), sendo assim denominados de fungos escuros ou demácios. O pigmento negro da parede celular fúngica dos agentes da CBM, além de favorecer a capacidade fotoprotetora, permitindo o fungo desenvolver-se em ambientes ensolarados, atua também como um dos fatores de virulência desses elementos fúngicos. A sobrevivência de um fungo dematiáceo no hospedeiro humano, tido como um habitat hostil, é favorecido não somente pela presença de melanina na parede celular, mas também pela ocorrência de lipídios nessa estrutura celular e a termotolerância a 37°C¹.

Nos seres humanos e outros animais, os fungos demácios induzem a um amplo quadro de micoses, cujos aspectos clínico-laboratoriais são decorrentes das interações dinâmicas que se estabelecem entre o agente patogênico e o hospedeiro. Nesse aspecto cabe ressaltar três grupos de doenças: CBM (cromomicose), feohifomicose (micose com micélio escuro)⁹ e eumicetoma (tumoração multifistulosa com drenagem de grãos). Embora mais recentemente esse leque patogênico tenha ampliado com a constatação de infecções por fungos negros associados a quadros de sinusite e fungemias hospitalares. Diante do exposto, ainda é a CBM a patologia fúngica mais relevante dentro do quadro

das doenças infecciosas que compõem o vasto quadro nosológico da população rural brasileira, devido a sua capacidade de morbidade¹³.

Sinonímia e aspectos históricos

É micose com ampla sinonímia: Doença de Carrion, Doença de Fonseca, Doença de Fonseca-Carrion, Micose de Pedroso, Cromomicose, "Cromoblastomicose", "Blastomicose Negra", Pé Musgoso, Espúndia, Figueira, Formigueiro, Sunda, Susna, Chapa etc¹.

As primeiras descrições dessa enfermidade fúngica datam do início do século passado. Em 1911, Pedroso a descreveu pela primeira vez na cidade de São Paulo/Brasil. A segunda referência é de Medlar e Lane, nos Estados Unidos, com menção da espécie *Phialophora verrucosa*. Doze anos mais tarde, Fonseca e Leão apresentaram o gênero *Acroteca*. Em 1936, Negroni fundiu os aspectos morfológicos de *Acroteca* e *Hormodendrum* e criou o gênero *Fonsecaea*. Uma nova espécie foi descrita em 1936 por Carrion em Porto Rico, hoje denominada *Fonsecaea compacta*. Finalmente, uma nova espécie foi descrita por Trejos, em 1954, *Cladosporium carrionii*, que tem como particularidade o fato de ser a única espécie que é isolada dos casos australianos dessa micose.

Da grande quantidade de denominações propostas para os agentes da CBM, temos hoje como elementos patogênicos: *Phialophora verrucosa* Medlar, 1915, mais comum nos Estados Unidos e Canadá; *Fonsecaea pedrosoi* Negroni, 1936 – universal; *Fonsecaea compacta* – espécie rara, Carrion, 1935; *Cladosporium carrionii* Trejos, 1954 – Venezuela, Sul da África e Austrália e *Rhinocladiella aquaspersa* – (Borelli) Schell, McGinnis et Borelli, 1983⁶.

Recebido em 10/06/2005

Aprovado em 29/03/2006

Laboratório de Fungos Patogênicos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG)

¹Professor Assistente da disciplina Micologia do IPTSP/UFG e Doutorando em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB)

²Farmacêutico-Bioquímico do LACEN/GO e Especialista em Micologia pelo IPTSP/UFG

³Farmacêutico Hospitalar e Assistencial pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF/UFG)

⁴Doutorando em Patologia Molecular pela UnB

⁵Professor Assistente da disciplina Biologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG)

⁶Mestranda em Medicina Tropical pelo IPTSP/UFG

Habitat, ciclo da doença e epidemiologia

Na natureza, os agentes da CBM vivem saprobioticamente decompondo a matéria orgânica proveniente de diversos substratos oriundos do solo, restos de vegetais, água contaminada etc. É o contato comumente acidental do homem com o meio ambiente contaminado com esses fungos que contribuem para o desencadeamento dessa infecção fúngica. Essa ação é favorecida principalmente pelas atividades agrícolas que, por ocasião de macro ou microtraumas na superfície da pele, é capaz de veicular o agente por meio de solução de continuidade epidérmica¹³. Dentro do tecido converte sua fase filamentosa em estruturas globosas de paredes espessas e acastanhadas, por intermédio da capacidade de dimorfismo morfológico. Essas estruturas são arredondadas e possuem de 4 a 12 µ de diâmetro, que se multiplicam por septos ou trabéculas, em um ou dois planos distintos, diante de uma reação inflamatória, granulomatosa e purulenta. São as denominadas células escleróticas (células muriformes ou fumagóides) observadas em exame direto com KOH¹⁵.

Diversos fatores interferem no processo evolutivo da infecção fúngica. Esses fatores decorrem da interação entre o hospedeiro (idade, sexo, suscetibilidade genética, resistência natural e competência imunológica) e o parasita (grau de virulência, viabilidade e quantidade de inóculo). Ressalta-se ainda nessa relação, o grau de incapacidade digestiva das células escleróticas pelos neutrófilos que interagem diretamente no estabelecimento do processo fúngico. Esse comprometimento imunológico celular favorece a liberação de enzimas tóxicas que atuam sobre os neutrófilos, prejudicando a funcionalidade do sistema imunológico do indivíduo infectado¹².

A CBM é classificada dentre as micoses subcutâneas. Essa patologia é de caráter endêmico e prevalece basicamente dentre a população rural de zonas de climas tropicais e subtropicais, acometendo geralmente os membros inferiores de maneira unilateral¹¹. Trata-se de uma enfermidade fúngica considerada uma doença ocupacional para a Medicina do Trabalho¹³. Relatos da micose ocorrem em todo mundo, entretanto é na ilha de Madagascar (Oceano Índico/África) onde é detectada a maior incidência de casos (1/6.819 habitantes). Com base no censo populacional do Brasil do ano de 2000, temos uma população rural de 31,9 milhões de habitantes e uma estimativa de acometimento de CBM de 1/196 mil habitantes, o que levaria a uma detecção dessa micose em aproximadamente 163 mil habitantes (0,51% da população rural brasileira) (Tabela 1)¹⁴.

Tabela I
Estimativa do número de casos de cromoblastomicose na população rural brasileira

Grupo de Idade (anos)	Número de habitantes	Número estimativo de casos (%)
0 a 4	3.636.893	18.555 (11,38)
5 a 9	3.788.326	19.328 (11,86)
10 a 14	3.843.740	19.611 (12,03)
15 a 19	3.548.282	18.103 (11,11)
20 a 24	2.784.915	14.209 (8,72)
25 a 29	2.274.887	11.607 (7,12)
30 a 34	2.118.366	10.809 (6,63)
35 a 39	1.943.297	9.915 (6,08)
40 a 44	1.638.848	8.361 (5,13)
45 a 49	1.416.505	7.227 (4,43)
50 a 54	1.228.390	6.267 (3,84)
55 a 59	1.056.156	5.388 (3,31)
60 a 64	886.253	4.522 (2,77)
65 a 69	655.536	3.345 (2,05)
70 a 74	489.082	2.495 (1,53)
75 a 79	314.269	1.603 (0,98)
80 a 84	186.745	953 (0,58)
85 a 89	93.648	478 (0,30)
90 a 94	29.522	151 (0,10)
95 a 99	8.732	44 (0,03)
≥ 100	5.226	27 (0,02)
Total	31.947.618	162.998(100,00)

Censo populacional de 2000 IBGE 2000

Quanto ao sexo, a CBM acomete indivíduos adultos masculinos numa proporção de 15/1 caso feminino¹⁴. Essa realidade é decorrente das atividades rurais serem mais exercidas pelos homens e os traumatismos relacionados ao início dessa doença fúngica terem como fator principal à lapação com a vegetação rural, seguindo, em percentuais muito inferiores, porém, igualitários, manuseio de instrumentos agrícolas e animais e outras causas diversas. Desse modo, levando ainda em consideração o censo populacional rural brasileiro, a idade de 18 anos como faixa etária adulta e a proporção do número de casos do sexo masculino em relação ao sexo feminino, teríamos uma estimativa de 49.941 (0,51%) homens propensos a serem acometidos por agentes da CBM, dentro da população rural masculina brasileira, para 2.950 (0,03%) mulheres. A CBM é detectada em todas as regiões geográficas brasileiras, destacando-se em prevalência de suposta ocorrência de casos a região sudeste (Tabela 2).

Tabela II
Estimativa da prevalência de cromoblastomicose por região geográfica do Brasil

Grandes Regiões e Unidades da Federação	População total	Estimativa do número de casos (%)
Norte	12.911.170	65.873 (7,60)
Acre	555.882	2.846 (0,33)
Amapá	477.032	2.434 (0,28)
Amazonas	2.817.252	14.374 (1,66)
Pará	6.195.965	31.612 (3,65)
Rondônia	1.380.952	7.046 (0,81)
Roraima	324.397	1.655 (0,19)
Tocantins	1.157.690	5.906 (0,68)
Nordeste	47.782.488	243.788 (28,13)
Alagoas	2.827.856	14.428 (1,67)
Bahia	13.085.769	66.764 (7,70)
Ceará	7.431.597	37.916 (4,38)
Maranhão	5.657.552	28.865 (3,33)
Paraíba	3.444.794	17.575 (2,03)
Pernambuco	7.929.154	40.456 (4,67)
Piauí	2.843.428	14.507 (1,67)
Rio Grande do Norte	2.777.509	14.171 (1,63)
Sergipe	1.784.829	9.106 (1,05)
Centro-Oeste	11.638.658	59.381 (6,85)
Distrito Federal	2.051.146	10.465 (1,21)
Goiás	5.004.197	25.532 (2,95)
Mato Grosso do Sul	2.078.070	10.602 (1,22)
Mato Grosso	2.505.245	12.782 (1,47)
Sul	25.110.349	128.114(14,78)
Paraná	9.564.643	48.799 (5,63)
Rio Grande do Sul	10.187.842	51.975 (6,00)
Santa Catarina	5.357.864	27.336 (3,15)
Sudeste	72.430.194	369.541(42,64)
Espírito Santo	3.097.498	15.803 (1,83)
Minas Gerais	17.905.134	91.353 (10,54)
Rio de Janeiro	14.392.106	3.429 (8,47)
São Paulo	37.035.456	188.956 (21,80)
Brasil	169.872.859	866.697(100,00)

Censo populacional de 2000 IBGE 2000

Aspectos clínicos

Observa-se inicialmente no local de implantação dos agentes da CBM, a presença de lesão(ões) papular(es) de superfície eritematosa e descamativa, podendo gradativamente aumentar de tamanho. Em seguida, um notável polimorfismo clínico é geralmente observado, tendo como tipos básicos de lesão os aspectos: nodular, verrucosa, em placa (infiltrativa ou eritematosa), tumoral e cicatricial. Embora haja o predomínio dos tipos verrucoso e tumoral. Essa diversidade polimórfica de lesão por elementos da CMB dificulta um diagnóstico médico preciso, em decorrência de similaridade clínica com outras entidades de caráter dermatológico.

lógico. Evidenciando assim, a importância do diagnóstico micológico e histopatológico para a demonstração do agente etiológico. Trata-se de uma infecção limitada à epiderme e ao tecido subcutâneo. A disseminação ocorre por contigüidade, podendo também ser presenciada nos vasos linfáticos superficiais. A sintomatologia comumente descrita pelos pacientes abrange a sensação de dor e prurido (formigueiro)⁴. A ausência de um manejo terapêutico adequado favorece o acometimento de infecção bacteriana secundária e edema devido à fibrose do tecido celular subcutâneo. Relatos de casos de longa evolução, que propiciaram a conversão da lesão em neoplasia, têm sido também encontrados na literatura¹³. Critérios de descrição das formas clínicas dessa micose permitem ainda que as lesões induzidas pelos fungos da CBM possam ser agrupadas quanto à gravidade, visando assim auxiliarem o delineamento da conduta terapêutica a

Tabela III
Descrição das formas de cromoblastomicose quanto à gravidade das lesões

Formas	Descrição
Leve	Presença de lesão única Tipo nodular ou placa Diâmetro inferior a 5 cm
Moderada	Presença de lesão única ou múltipla Tipo nodular, placa ou verruciforme Em caso de múltipla, ocorrência de um ou inúmeros tipos de lesão Detecção em uma ou duas regiões cutâneas adjacentes Diâmetro inferior a 15 cm
Grave	Ocorrência de lesão (única ou múltipla, adjacente ou não) com comprometimento de grandes área do tegumento Detecção de lesão múltipla com associação de um ou vários tipos de lesões

ser aplicada ao paciente (Tabela 3)^{2,3}.

Mesmo diante da diversidade de agentes da CBM, as manifestações clínicas caracterizam-se, comumente, por serem semelhantes e terem aspectos teciduais idênticos.

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo é decorrente da interação das características clínicas e epidemiológicas apresentadas pelo paciente. Essa avaliação deve ser ratificada pela presença de células muriformes no exame micológico direto e/ou histopatológico. A coleta do material biológico deve ser realizada na área lesional rica em pontos negros. Tais pontos escuros compreendem pequenas crostas sero-hemáticas que recobrem o óstio de microfistulas que conduzem os parasitas de regiões mais profundas à superfície por um mecanismo de eliminação transepitelial. Ocorrência de outras estruturas pigmentadas pode ser presenciada como elementos globosos, unisseptados ou não, comumente agrupados. Ocasionalmente, hifas escuras e septadas são observadas na superfície epidérmica das lesões⁶. O diagnóstico micológico completa-se pelo isolamento do fungo em meio de cultura ágar Sabouraud com acréscimo de antibióticos (penicilina e estreptomicina) ou meio de ágar Czapack, evidenciando geralmente colônias filamentosas verde escuras e a identificação das espécies se dá pela observação das características microscópicas dos elementos de frutificação dos agentes da CBM. Tais elementos compreendem os tipos: a) *Cladosporium*: estruturas fúngicas (conidióforos) que formam cadeias de conídios e que se ramificam através de brotamento apical, que dependendo do tamanho e da densidade de suas cadeias permitem a diferenciação das espécies; b) *Phialophora*: estruturas em forma de jarro (fiálides), formadas ao longo das hifas e que se originam os conídios, ficando dispostos de forma aglomerada na parte superior das fiálides e c) *Rhinocladiella*: estruturas alongadas (conidióforos), geradas ao longo das hifas, for-

mando conídios ovais, que se localizam na extremidade superior (acroteca) e nos lados desses conidióforos⁵. Imunologicamente, não há até o presente momento, testes sorológicos padronizados que permitam seu emprego como método de diagnóstico que venham a auxiliar as condutas dos procedimentos terapêuticos⁸.

Uma resposta inflamatória de padrão misto e de natureza supurativa e granulomatosa são presenciadas em nível tecidual diante do parasitismo causado pelos os agentes da CBM. Embora a reação tissular seja inespecífica, pode ser observada em outras infecções micóticas subcutâneas (esporotricose) e sistêmicas (paracoccidioidomicose, blastomicose e coccidioidomicose). Hiperplasia pseudoepiteliomatosa ou a acantose e, ocasionalmente, hiperqueratose e abscessos queratinolíticos, caracterizam os aspectos histológicos que podem ser detectados na epiderme de indivíduos acometidos de CBM. Todavia na derme, o infiltrado inflamatório contém nódulos granulomatosos confluentes, compostos por células epitelióides e células gigantes do tipo Langhans e de corpo estranho. Os processos granulomatosos, comumente, contém neutrófilos e restos celulares nos microabscessos observados. Detecção de células muriformes e outras formas parasitárias podem ser encontradas no interior das células gigantes ou fora dessas estruturas celulares¹³.

Diagnóstico Diferencial

É o grande polimorfismo apresentado pelas lesões de CBM nos pacientes que induzem a necessidade de diferenciá-las quanto à natureza dos diversos processos cutâneos infecciosos e não-infecciosos. Com relação, às patologias não infecciosas, as neoplasias são os principais diagnósticos diferenciais de CBM, além da sarcoidose e da psoríase. Todavia, entre as enfermidades infecciosas, cabe destacar no campo da microbiologia e parasitologia humanas: as verrugas e os papilomas virais, a tuberculose cutânea e demais outras micobacterioses, hanseníase e as formas verrucosas de leishmaniose cutânea. De maneira toda singular, outras micoses, que devem ser diferenciadas pelo aspecto similar que apresentam, são: esporotricose, micetomas, lobomicose e feohifomicose entre as doenças fúngicas de natureza subcutâneas e paracoccidioidomicose, histoplasmoses, blastomicose norte americana e coccidioidomicose entre as micoses profundas ou sistêmicas¹⁰.

Tratamento

A CBM é uma das micoses mais recalcitrantes em termos de tratamento. A terapia é longa e podem ocorrer recidivas, em alguns casos, dependendo da situação clínica e da extensão das lesões, os procedimentos terapêuticos podem variar. Portanto, cabe ao médico assistente escolher o tratamento adequado, utilizando-se de técnicas terapêuticas e do elenco de drogas antifúngicas dispostas atualmente no mercado. As lesões iniciais específicas devem, quando possível, ser tratadas por exérese cirúrgica. Para as lesões irrecessíveis, a terapêutica é efetuada com o emprego de drogas antifúngicas, cujo sucesso depende principalmente da gravidade das manifestações clínicas e da aplicação de critérios de cura para interrupção do tratamento³. Assim, faz-se uso ainda de iodeto de potássio ou de sódio, anfotericina B, 5-fluocitosina, itraconazol, vitamina D₂ intralesional ou oral e tiabendazol, vinculado ou não a outros métodos de tratamento como, por exemplo, eletrocoagulação, termoterapia (42-45°C) e crioterapia³. No entanto, em lesões mais extensas, a utilização de medidas medicamentosas impõe-se como conduta básica. Nessa perspectiva, a flucitosina (100-150 mg/Kg/dia) é a droga de escolha, observando-se uma remissão rápida dos casos. Entretanto, não raro, observa-se o aparecimento de recidivas ou de resistência secun-

dária. Dessa forma, deve-se sempre que possível associar a fluocitosina a outras drogas, como, por exemplo, anfotericina B [anfotericina B (50 mg/dia) + fluocitosina (70-100 mg/Kg/dia), por um período de 3 a 4 meses], tiabendazol [tiabendazol (1g/dia) + fluocitosina (3g/dia), por 6 a 12 meses] e itraconazol [itraconazol (200mg/dia) + fluocitosina (100mg/Kg/dia), durante 6 meses]¹³.

É importante frisar ainda que medidas terapêuticas visando combater as infecções secundárias, geralmente bacterianas, devem ser preconizadas com a utilização de antibioterapia ou com medidas antissépticas tópicas (Tabela 4)².

Tabela IV
Critérios de cura em cromoblastomicose

Crítérios	Descrição
Clínico	Desaparecimento de odor e prurido Cicatrização completa de todas as lesões
Micológico	Ausência de fungos no exame direto com KOH Não houve crescimento de agente em meio de cultura apropriado
Patológico	Ausência de formas parasitárias no tecido Atrofia da epiderme Desaparecimento de granulomas e microabscessos Substituição do infiltrado granulomatoso por inflamação crônica e fibrose

CONCLUSÃO

A CBM continua sendo uma micose subcutânea de relevância na Saúde Pública no País. Assim sendo, se faz necessária a continuidade de pesquisas nessa área para que se compreenda melhor o mecanismo de patogenicidade desses fungos e defesa imunológica do paciente.

REFERÊNCIA

1. Arenas, R. Micologia Médica. México. Nueva Editorial Interamericana. 1993.
2. Bolzinger, T.; Pradinaud, R.; Sainte-Marie, D.; Dupont, B.; Chwetzoff, E. Traitement quatre cas de chromomycose à *Fonsecaea pedrosoi* pour l'association 5-fluorocytosine - itraconazole. Les Nouvelles Dermatologiques, 10: 426-466, 1991.
3. Castro, L. G. M. Mecanismo de cura da cromoblastomicose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. Anais Brasileiros de Dermatologia 64: 297-300, 1989.

4. Carrion, A. L. Chromoblastomycosis. Annals of New York Academy of Sciences 50:1255-1282, 1950.
5. Carvalhaes, J. Micologia Médica. Rio de Janeiro. Editora Control Lab, 1999.
6. Emmons, C. W.; Binford, C. H.; Utz, J. P.; Kwong-Chung, K. J. Medical mycology. Philadelphia. Lea & Febiger. 1977.
7. Lacaz, C. S.; Porto, E.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. Guia para identificação de interesse médico - Fungos, Actinomicetos e Algas. São Paulo; Editora Savier, 1998.
8. Londero, A. T.; Ramos, C. D. Chromomycosis: clinical and mycological studies of thirty-five cases observed in the hinterland of Rio Grande do Sul, Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 25: 132-135, 1976.
9. McGinnis, M. R. chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. Journal of the American Academy of Dermatology 8: 1-6, 1983.
10. Richardson, M. D.; Warnock, D. W. Fungal infection Diagnosis and management. Oxford. Blackwell Science Ltd. 1997.
11. Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro; Editora Guanabara, 2004.
12. Silva, C. M. P. Estudo clínico e epidemiológico da cromoblastomicose no Estado do Maranhão. Dissertação de Mestrado em Saúde e Ambiente apresentada à Universidade Federal do Maranhão (UFMA); 1999.
13. Queiroz-Telles, F.; Nucci, M.; Colombo, A. L. Cromoblastomicose. Sociedade Brasileira de Infectologia. Janssen-Cilag: 1-11, 1980.
14. www.ibge.gov.br Censo demográfico 2000.
15. Zaitz, C.; Campbell, I.; Marques, S. A.; Ruiz, L. R. B.; Souza, V. M. Compendio de micologia médica. Rio de Janeiro. Editora Medsi. 1998.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Evandro Leão Ribeiro
R.85-A, 60/1501 - Ed. Estoril - Setor Sul
CEP. 74080-020 Goiânia - GO

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Parasitismo intestinal em índios da reserva indígena Rio das Cobras*

Intestinal parasitism in indians of the reservation indigenous Rio das Cobras

Josimara Gilio¹; Sônia de Lucena Mioranza² & Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa³

RESUMO - Os parasitas intestinais infectam mais da metade da população mundial, sendo mais prevalentes nas regiões pobres. Sabe-se que o ambiente das aldeias é altamente propício a disseminação das parasitoses devido aos maus hábitos de higiene, falta de infra-estrutura, saneamento básico, hábitos culturais, entre outros. O objetivo deste trabalho foi verificar a incidência das parasitoses nos indígenas da Reserva Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras-PR. Foram realizados exames coproparasitológicos em 59 índios, com faixa etária entre 0 a 20 anos, de ambos os sexos, empregando-se as metodologias de Hoffmann, Pons & Janner e Ritchie para verificar a ocorrência de parasitos na amostra. Os resultados revelaram 69,5% de parasitismo na população. Os parasitos mais frequentes foram: *Ascaris lumbricoides* (36,5%), *Entamoeba coli* (36,5%), *Hymenolepis nana* (24,4%), *Giardia lamblia* (22,0%), *Entamoeba histolytica/dispar* (19,5%), *Endolimax nana* (19,5%) e *Trichuris trichiura* (17,0%). Neste estudo o grupo etário predominante foi o infantil, onde 95% dos exames realizados eram de crianças. A alta incidência de parasitos entre os indígenas desta aldeia (69,5%), é justificada, pois estes indivíduos possuem uma maior suscetibilidade às infecções parasitárias, uma vez que habitam em condições inadequadas, têm contato contínuo com ambiente altamente contaminado, sem água potável e sem condições higiênicas-sanitárias mínimas.

PALAVRAS-CHAVE - índios, enteroparasitas, doença parasitária

SUMMARY - The intestinal parasites infect more of the half of the world population, being more prevalentes in the poor areas. It is known that the atmosphere of the villages is highly favorable the spread of the parasitoses due to the bad hygiene habits, infrastructure lack, basic sanitation, cultural habits, among others. The objective of this work was to verify the incidence of the parasitoses in the natives of the Reservation Rio das Cobras, municipal district of Nova Laranjeiras-PR.. Parasitologics exams were accomplished in 59 Indians, with age group among 0 to 20 years, of both sexes, being used the methodologies of Hoffmann, Pons & Janner and Ritchie to verify the occurrence of parasites in the sample. The results revealed 69,5% of parasitism in the population. The most frequent parasites were: *Ascaris lumbricoides* (36,5%), *Entamoeba coli* (36,5%), *Hymenolepis nana* (24,4%), *Giardia lamblia* (22,0%), *Entamoeba histolytica/dispar* (19,5%), *Endolimax nana* (19,5%) and *Trichuris trichiura* (17,0%). In this study the predominant age group was the infantile, where 95% of the accomplished exams belonged to children. The high incidence of parasites among the natives of this village (69,5%), it is justified, because these individuals possess a larger susceptibility to the parasitic infections, once they inhabit in inadequate conditions, they have continuous contact with highly polluted atmosphere, without drinking water and without minimum hygienic-sanitary conditions.

KEYWORDS - Indians, enteroparasites, parasitic disease

INTRODUÇÃO

Segundo a FUNASA – Fundação Nacional de Saúde, no Brasil vivem cidadãos que compartilham índices de saúde assustadores até para os baixos padrões nacionais. Só no ano de 2001, foram registrados 88 mil casos de infecções intestinais e 87 mil de parasitoses entre os 374 mil índios brasileiros. A taxa de mortalidade infantil nas três mil aldeias do país é de 56 óbitos em mil nascimentos, sendo muito acima da média brasileira que é de 29 por mil. A incidência de malária entre os indígenas é 10 vezes maior que a taxa nacional (GARDA, 2002).

Existem no estado do Paraná aproximadamente 9015 indígenas, habitando cerca de 82.264,30 hectares de terra. Esta área está distribuída em 17 terras abrigando as etnias Kaingang, Guarani e remanescentes do grupo Xetá (GOVERNO DO PARANÁ, 2003).

A reserva indígena Rio das Cobras possui uma área de 18.681.9806 hectares, sendo a maior do Estado, onde vive uma população de 3.150 índios, das etnias Kaingang, Guarani e remanescentes do povo Xetá. Os meios de subsistência desta reserva são: confecção e vendas de artesanato, lavouras familiares e comunitárias de milho, feijão, mandioca, batata, soja, arroz e pecuária. Cada etnia possui sua língua e costumes próprios e totalmente diferenciados, os Guaranis pertencem ao tronco Tupi Guarani e os Kain-

gangs ao Macro-Jê. Mas como a população de índios Kaingang é maior, a língua mais falada na terra indígena é a Kaingang (FUNAI, 2003).

O interesse de realizar um estudo, com os indígenas do aldeamento Trevo da reserva indígena Rio das Cobras, surgiu em virtude de haver poucos estudos com os ameríndios, especialmente no Paraná, e os que existem relatam grandes índices de parasitismo intestinal nestes povos. E também, pelo mesmo apresentar um grande número de habitantes, as condições de moradia e subsistência serem mais precárias em relação aos outros 11 aldeamentos que constituem a Reserva e estarem em zona de risco devido à localização às margens da rodovia federal BR-277. O objetivo deste estudo foi verificar a incidência de parasitoses intestinais nos índios da reserva indígena Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras-PR.

Segundo LINHARES (1992), dados sobre a ocorrência de enteroparasitoses entre indígenas são escassos, embora configurem a sua relevância na origem dos quadros de gastroenterite aguda ou crônica. De uma maneira geral, tanto a transmissão direta como a indireta decorre da contaminação fecal do meio ambiente, condição que prevalece amplamente nas aldeias.

Situação potencialmente grave foi registrada por CONFALONIERI *et al.* apud LINHARES, 1992, entre os índios Yanomami, na Serra das Surucucus, estado de Roraima. Entre

Recebido em 02/03/2005

Aprovado em 14/11/2005

*Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – Cascavel-PR

¹Bióloga; ²Professora da disciplina de Parasitologia do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas – Unioeste; ³Biomédica

outros achados, registrou-se a ocorrência de *E. histolytica/dispar* em 12 (40%), das 30 amostras de fezes analisadas. Estudo realizado por WIEBBELLING (2002), em índios Mbyá-Guarani da aldeia Cantagalo, no município de Viçosa-RS, apresentou os seguintes dados: das 82 amostras analisadas, 56 (69,5%) estavam parasitadas e 87,5% das casas possuíam estrutura de taquara e cobertura com lona plástica.

De acordo com FONTBONNE *et al* (2001), foram realizados exames coprológicos em 417 pessoas de uma comunidade indígena de Pernambuco, os resultados constatarem uma incidência de 82,4% de amebíase, 51,2 % de ascaridíase e 62,0% de giardíase.

MIRANDA, XAVIER e MENEZES (1998) em um estudo na aldeia indígena Parakanã em 1995, no Pará, encontrou uma frequência de parasitismo por *Ascaris lumbricoides* de 37,9%. A alta prevalência pela espécie *A. lumbricoides* tem sido evidenciado em estudos tanto em comunidades indígenas, como em não indígenas; isto pode ser observado no trabalho de MACEDO, COSTA e ALMEIDA (1999), que trata do parasitismo por *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos, no estado do Rio de Janeiro. As prevalências de infecção por *A. lumbricoides* observadas foram 3,3% em crianças menores de 12 meses, 30,7% para as crianças com 12 meses de idade e 42,3% para as mães. Ressaltando a necessidade de aprofundamento na investigação desta parasitose também na população materno-infantil.

FERRARI *et al* (1992), realizou exames coproparasitológicos em índios Karitiana, estado de Rondônia e encontrou parasitas intestinais em 38,7% das amostras, sendo o *Ascaris lumbricoides* o parasita mais prevalente (18,9%), sugerindo uma distribuição super dispersa das cargas parasitárias na população hospedeira.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período compreendido entre maio e setembro/2003, na aldeia denominada Trevo, dentre as doze existentes nesta área indígena, foram realizados exames coproparasitológicos em 59 índios, com faixa etária entre 0 a 20 anos, de ambos os sexos, empregando-se as metodologias de Hoffmann, Pons & Janner e Ritchie (NEVES *et al*, 2000) para verificar a ocorrência de parasitos na amostra. As amostras fecais obtidas para análise parasitológica foram coletadas em frascos coletores apropriados, contendo conservante formol 10%. Foram feitas duas análises: a macroscópica e a microscópica. Na primeira observou-se a consistência, coloração e o aspecto do material fecal. Na Segunda foi realizada a pesquisa de parasitos pelos métodos supracitados.

Através de observação *in loco* do local onde os índios viviam e trabalhavam, bem como através da aplicação de questionário (quadro 1) foi possível constatar aspectos importantes relacionados ao modo de vida desta comunidade. Entre outros podemos citar: tipo de casa, energia elétrica, água consumida e destino do lixo.

RESULTADOS

TIPO DE CASA	n
Tijolo	0
Taipa revestida	0
Taipa não revestida	26
Madeira	0
Material aproveitado	86
Número de cômodos	1 ou 2
Total de casas	112
ENERGIA ELÉTRICA	
Sem energia	112
TRATAMENTO DA ÁGUA NO DOMICÍLIO	
Filtração	0
Fervura	0
Cloração	0
Sem tratamento	112
ABASTECIMENTO DE ÁGUA	
Rede geral	0
Poço ou nascente	112
Outros	0
DESTINO DE FEZES E URINA	
Sistema de esgoto	0
Fossa	0
Céu aberto	112
DESTINO DO LIXO	
Coletado	0
Queimado/Enterrado	112
Céu aberto	0

Quadro 1- Condições de habitação na aldeia Rio das Cobras

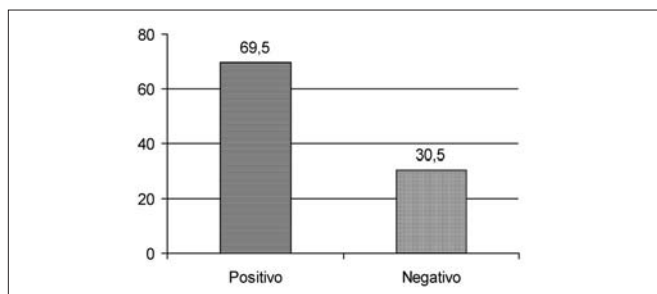


Gráfico 1 - Incidência de enteroparasitismo entre os indígenas

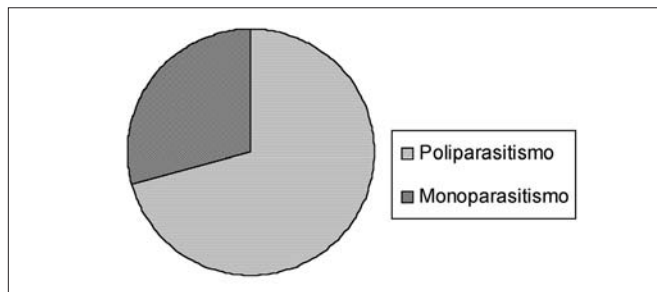


Gráfico 2 - Frequência de mono e poliparasitismo

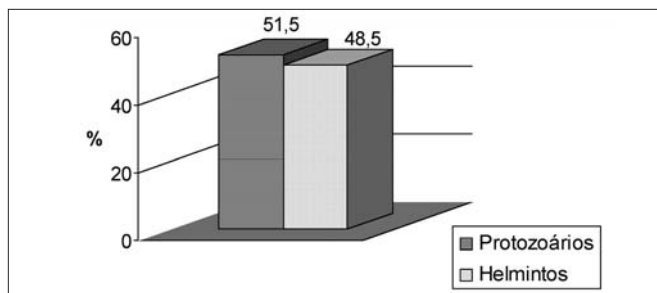


Gráfico 3 - Ocorrência de protozoários e helmintos

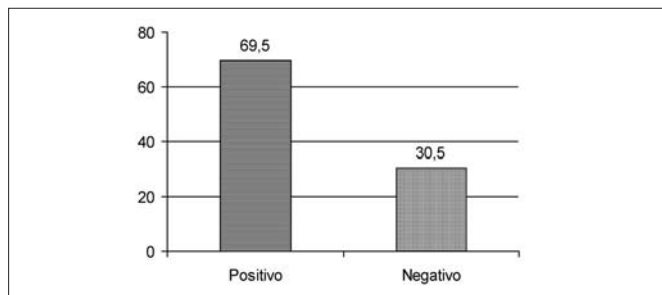


Gráfico 4 – Agentes parasitários encontrados na amostra

Tabela I
Aspecto macroscópico da matéria fecal

Resultado das amostras (59)	Consistência das fezes		Coloração das fezes	
	Sólidas ou Semisólidas	Líquidas	Castanho-parda	Outras*
Positivos (41)	82,7%	17,3%	90,2%	9,8%
Negativos (18)	72,2%	27,8%	72,2%	27,8%

* Lientérica, amarelada ou melânica

DISCUSSÃO

Como mostra o gráfico 1, a alta incidência de parasitos (69,5%) era esperada devido à inexistência de tratamento de água e de saneamento básico, tendo a maioria das casas estrutura de materiais reaproveitados - papelão, plástico, lona, palha, etc., o que deixa os indígenas mais expostos e vulneráveis a contaminação ambiental, também no seu local de trabalho às margens da rodovia ao confeccionarem produtos artesanais para subsistência.

Os indivíduos infestados apresentaram alta incidência de poliparasitismo (70,7%), conforme o gráfico 2. Entre as espécies patogênicas, havia maior associação de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (28,6%). Esta associação é freqüente e relatada em diversos trabalhos, pois as condições ambientais requeridas para o desenvolvimento do *Ascaris lumbricoides* são as mesmas que para o *Trichuris trichiura* (oxigênio, temperatura em torno de 28-32°C, solo arenoso e umidade alta – acima de 80%).

Analisando-se o gráfico 3, notou-se que a freqüência de protozoários (51,5%) e de helmintos (48,5%) foi praticamente a mesma, enfatizando que a contaminação não é só devida as baixas condições higiênicas, solo contaminado, ausência de fossas sanitárias, como também pela transmissão interpessoal e água contaminada.

O gráfico 4 revelou que 36,5% encontravam-se parasitados por *Ascaris lumbricoides* e *Entamoeba coli*, 24,4% por *Hymenolepis nana*, 22% pela *Giardia lamblia*, 19,5% pela *Entamoeba histolytica/dispar* e *Endolimax nana*, 17% pelo

Trichuris trichiura, 4,9% pelo *Ancylostomideo sp. e Strongyloides stercoralis* e 2,4% pelo *Iodamoeba butschilii*. A maioria dos indivíduos não apresentou alterações na coloração e consistência das fezes mesmo infestados por helmintos ou protozoários, podendo-se sugerir que os mesmos sejam portadores assintomáticos.

O estudo apresentado revelou a necessidade da implantação de medidas governamentais voltadas para as comunidades indígenas a fim de que as mesmas possam exercer melhor a sua cidadania através da melhoria da sua qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- FERRARI, J. O.; FARREIRA M. U.; CAMARGO L. M. A.; FERREIRA C. S. Intestinal Parasites among Karitiana Indians from Rondonia State, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 34:223-225, 1992.
- FONTBONNE, A.; CARVALHO, E. F.; ACIOLI, M. D.; SÁ, G. A.; CESSE, E. P. Fatores de risco para poliparasitismo intestinal em uma comunidade indígena de Pernambuco, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v. 17, n 2. Rio de Janeiro, 2001.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO (FUNAI). Guarapuava, 2003. Disponível em: <funai@almix.com.br>. Recebido em: 13 Nov 2003.
- GARDA, C. Brasil tem dívida com seus índios. Jornal do Brasil, 25 Ago 2002. Disponível em: <http://www.soropositivo.org/pdf/25_08_2002_ed1.pdf>. Acesso em: 03 Jun 2003.
- GOVERNO DO PARANÁ. Paraná é Indígena. Secretaria de Estado da Justiça e da Cidadania. Disponível em: <http://www.pr.gov.br/prindigena>. Acesso em: 03 Jun 2003.
- LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções diarreicas entre populações indígenas da Amazônia. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 8(2):121-128, 1992.
- MACEDO, L.M.C.; COSTA, M. C. E.; ALMEIDA, L. M. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos: estudo populacional em comunidade do estado do Rio de Janeiro. Cadernos Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 15(1): 173-178, jan-mar, 1999.
- MIRANDA, R. A.; XAVIER, F. B.; MENEZES, R. C. Parasitismo intestinal em uma aldeia indígena Parakanã, sudeste do Estado do Pará, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v. 14, n 3. Rio de Janeiro, 1998.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Parasitologia Humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- WIEBBELLING, A. M. P. Estudo etnoepidemiológico sobre as parasitoses intestinais em índios Mbyá-Guarani da aldeia do Cantagalo, município de Viçosa-RS. 2002. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva). Faculdade Federal de Ciências Médicas. Porto Alegre. Disponível em <http://www.fffcmpta.tche.br/catprod04/>. Acesso em: 10 Jun 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Sônia de Lucena Mioranza
Rua Fortaleza, 1233, Centro
CEP. 85810-050 Cascavel - PR
e-mail: smioranza@unioeste.br

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica
28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Uso do teste com cloridrato de trifênil tetrazólio (CTT) para detecção de bacteriúria sintomática e assintomática

Use of the triphenil tetrazolium chloride (TTC) test to detect symptomatic and asymptomatic bacteriuria

Tatiana Zampiero Ramos^{1,3}; Elisabeth Loshchagin Pizzolitto^{2,3} & Antonio Carlos Pizzolitto^{2,3}

RESUMO - A infecção do trato urinário é geralmente definida como a presença de 10^5 ou mais UFC/mL de urina, obtida sem contaminação, na presença ou não de sintomatologia. É um grande problema clínico, especialmente entre as mulheres adultas. Usando métodos convencionais, o diagnóstico laboratorial dessas infecções é caro, consome muito tempo e é trabalhoso. Há necessidade de se obter um teste simples capaz de detectar números significantes de bactérias na urina. Com este objetivo, pretendeu-se reavaliar o teste com cloridrato de trifênil tetrazólio (CTT). Os resultados mostraram que o teste apresentou 84,3% de sensibilidade, 96,5% de especificidade, VPP (valor preditivo positivo) 94,6% e VPN (valor preditivo negativo) 96,7%. Esse teste pode, então, ser utilizado como método de triagem, principalmente em programas de prevenção, para detectar bacteriúria assintomática em gestantes, crianças e idosos.

PALAVRAS-CHAVE - bacteriúria, diagnóstico laboratorial, cloridrato de trifênil tetrazólio.

SUMMARY - Urinary tract infection is generally defined as the presence of 10^5 or more CFU/mL in the urine, revealed without contamination, with or without symptoms. Urinary infection is a major clinical problem especially among adult women. Using conventional methods, laboratory examination of urine is expensive, time-consuming and labour-intensive. The need for a simple test capable of detecting significant numbers of bacteria in the urine is well established. With this goal, we reevaluate the triphenil tetrazolium chloride (TTC) test. The results show that the test has sensitivity 84.3%, specificity 96.5%, PPV (positive predictive value) 94.6% and NPV (negative predictive value) 96.7%. The TTC test can be use as a laboratory trial, especially in health care programs, to detect asymptomatic bacteriuria of pregnancy, children and elderly.

KEYWORDS - bacteriuria, laboratory examination, triphenil tetrazolium chloride

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das doenças mais frequentes na população. Cerca de 3 a 4% das consultas médicas anuais em mulheres nos EUA são devidas às queixas de disúria, urgência e frequência miccional. Em aproximadamente 80% destes casos, são realizados exames laboratoriais e prescritos antimicrobianos⁵. Aproximadamente 48% das mulheres apresentam, pelo menos, um episódio de ITU ao longo da vida¹⁶.

As ITU são comumente causadas por bacilos Gram-negativos e resultam da ascensão de microrganismos da uretra para a bexiga e da bexiga para os rins. *Escherichia coli* é responsável por 75 a 85% dessas infecções, em todos os períodos da vida, independentemente da população estudada⁹.

A cultura quantitativa de urina é o método padrão para a análise da ITU^{1,10}, porém, este é um método caro e trabalhoso². Esforços têm sido feitos para encontrar um teste simples, que possibilite o exame de várias amostras de urina, mais facilmente⁷.

Pessoas idosas, mulheres grávidas e crianças apresentam infecções assintomáticas, que são detectadas apenas pela realização de culturas das amostras de urina no laboratório. Isto se torna importante, pois o desconhecimento do estado de portador destes indivíduos pode levar futuramente à lesão renal crônica e/ou naqueles submetidos à instrumentação do trato urinário, a bacteriúria pode levar à bacteriemia¹⁴.

A prevalência da bacteriúria assintomática é de até 10% na gravidez, podendo ser observada durante toda a gestação. Uma ampla faixa, 25 a 57%, destas bacteriúrias não tratadas podem evoluir para infecção sintomática, inclusive pielonefrite, devido à dilatação fisiológica do ureter facilitando o refluxo⁹. A ITU na infância permanece sub-diagnosti-

cada e, conseqüentemente, é causa de lesão renal, hipertensão e até mesmo falência renal⁴.

Devido a esses fatos, existe a necessidade do desenvolvimento de serviços de saúde para aumentar a detecção da ITU.

Embora a urocultura seja importante para o diagnóstico laboratorial das ITU, é de grande interesse a utilização de outros métodos que tenham um resultado mais rápido, com maior praticidade e economia e que possam contribuir para com essa mesma finalidade¹³. Para isso, podem ser utilizados testes de triagem, entre os quais uma opção seria a utilização do teste com cloridrato de 2,3,5 trifênil tetrazólio (CTT).

O teste com CTT foi relatado por Simmons e Williams¹⁷, mostrando que este foi capaz de detectar 85% das urinas contendo mais de 10^5 UFC/mL, sendo o reagente comercial utilizado na forma sólida, como tabletes, e sem especificação da concentração utilizada¹⁸.

No presente trabalho, a proposta é reavaliar o teste, apenas com modificação da forma do reagente, sendo o CTT usado em solução; além de fornecer dados epidemiológicos a respeito da ITU em pacientes que utilizam o Centro de Referência Diagnóstica (CRD) do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara/SP - UNESP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas 458 amostras de urina, colhidas após antissepsia, do jato médio urinário ou por meio de saco coletor, de pacientes que vieram ao Centro de Referência Diagnóstica (CRD) com pedido médico para realização de urocultura, durante o período de agosto de 2004 a janeiro de 2005. As uroculturas foram realizadas em laminocultivo URILAB (Laborclin), que contém os meios de cultura ágar CLED e ágar MacConkey e incubadas em estufa bacteriológica a

Recebido em 10/06/2005

Aprovado em 13/02/2006

¹Aluna do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas.

²Docente do Departamento de Análises Clínicas.

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara/SP - UNESP.

35-37°C, durante 18-24h. Após a incubação, o crescimento foi analisado segundo o gabarito fornecido pelo fabricante. Contagens de 10⁵ ou mais UFC/mL de uma única espécie de microrganismo foram consideradas positivas.

Nas uroculturas consideradas positivas, os microrganismos isolados foram identificados segundo a metodologia aplicada no Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro de Referência Diagnóstica (CRD).

O teste com CTT (Mallinckrodt) foi realizado concomitantemente com a urocultura. Aliquotas de quatro mL de cada amostra de urina foram incubadas com um mL da solução aquosa estéril de CTT a 1,0% em estufa bacteriológica a 35-37°C, durante quatro horas. Após esse período, foram feitas leituras para a verificação da formação de um precipitado vermelho ou da coloração vermelha da mistura no tubo, que indica teste positivo para a presença de 10⁵ ou mais UFC/mL. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados da urocultura para avaliação do teste.

Para a avaliação da qualidade diagnóstica do teste com CTT, empregado nesse estudo, foram estabelecidos os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), de acordo com as equações definidas por Ferreira e Ávila⁶.

RESULTADOS

Do total de 458 uroculturas realizadas, 70 (15%) foram consideradas positivas e 388 (85%) foram consideradas negativas. Na Tabela 1 observamos que a porcentagem de pacientes mulheres é maior tanto entre as culturas positivas como entre as negativas. A Tabela 2 mostra que a maioria dos pacientes atendidos eram gestantes.

Tabela I
Pacientes atendidos

PACIENTES	UROCULTURAS POSITIVAS		UROCULTURAS NEGATIVAS	
	Nº	%	Nº	%
HOMENS	9	13	48	12
MULHERES	61	87	340	88
TOTAL	70	100	388	100

Tabela II
Porcentagem de gestantes e não gestantes, entre um total de 401 mulheres atendidas

PACIENTES	UROCULTURAS POSITIVAS		UROCULTURAS NEGATIVAS	
	Nº	%	Nº	%
NÃO GESTANTES	30	49	137	40
GESTANTES	31	51	203	60
TOTAL	61	100	340	100

Na Tabela 3, observamos a frequência dos microrganismos isolados das 70 uroculturas positivas, sendo que *Escherichia coli* foi isolada em 71,4% das uroculturas.

Tabela III
Microrganismos isolados das 70 uroculturas positivas.

MICROORGANISMO ISOLADO	Nº	%
<i>E. coli</i>	50	71,4
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	6	8,6
<i>Enterobacter</i> sp.	5	7,1
<i>Enterococcus</i> sp.	3	4,3
<i>Providencia</i> sp.	2	2,9
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,4
<i>Proteus penneri</i>	1	1,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1,4

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados do teste com CTT, que foi capaz de identificar 81,4% das uroculturas positivas. Nos 13 testes negativos em 4 horas, com cultura positiva, os microrganismos isolados e identificados foram: *Escherichia coli* (6), *Staphylococcus coagulase negativa* (2), *Citrobacter freundii* (1), *Providencia* sp. (1), *Proteus penneri* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1) e *Acinetobacter baumannii* (1).

Tabela IV
Representação dos resultados do teste com TTC, nos casos com urocultura positiva

RESULTADO	Nº	%
CULTIVO + e TTC +	57	81,4
CULTIVO + e TTC -	13	18,6
TOTAL	70	100

Tabela V
Representação dos resultados do teste com TTC, nos casos com urocultura negativa

RESULTADO	Nº	%
CULTIVO - e TTC -	384	99
CULTIVO - e TTC +	4	1
TOTAL	388	100

Quanto a qualidade diagnóstica do teste, os valores obtidos foram: 84,3% de sensibilidade, 96,5% de especificidade, VPP 94,6% e VPN 96,7%.

DISCUSSÃO

A infecção urinária é a infecção de origem bacteriana mais freqüente na população e a urocultura é um dos exames mais solicitados ao laboratório de Microbiologia Clínica. Segundo a literatura, *Escherichia coli* é o microrganismo responsável pela maioria das ITU⁹, dado confirmado neste estudo, onde esta bactéria foi isolada em 71,4% das culturas consideradas positivas.

No presente trabalho, 87,14% dos pacientes com infecção urinária eram mulheres, sendo 51,0% gestantes. ITU em gravidez está relacionada a diversos fatores como: maior índice de prematuridade, baixo peso e mortalidade perinatal, além de maior morbidade materna⁹.

Classicamente, o diagnóstico laboratorial das infecções do trato urinário pode ser realizado por meio da urocultura^{1,10}. Métodos de triagem, como tiras reativas ou o teste com CTT podem ser empregados para a análise de amostras de urina com um custo menor do que a urocultura. Optamos pela realização do teste com CTT com o reagente em solução aquosa a 1,0%. Essa concentração foi escolhida com base na literatura, onde esse composto é utilizado para outras finalidades¹². O CTT é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido. Microrganismos vivos reduzem o CTT por ação enzimática, originando trifênil formazan, o qual é mantido dentro de grânulos nas células, as quais se tornam vermelhas¹³.

A avaliação de Simmons e Williams¹⁸ mostrou que em muitos laboratórios esse teste foi capaz de detectar 85% das urinas contendo mais de 10⁵ UFC/mL, dado confirmado nesta pesquisa, onde o teste foi capaz de detectar 81,5% das urinas consideradas positivas.

Segundo Cordova *et al.*³ o teste com CTT possui índice de sensibilidade de 75,72%, VPP de 78,80% e VPN de 56,52%. Os valores obtidos em nosso estudo, com o reagente em solução, foram superiores: 84,3% de sensibilidade, 96,5% de especificidade, VPP 94,6% e VPN 96,7%.

Alguns fatores, como pH, temperatura, luz e concentração do corante interferem na redução do CTT, sendo esta mais intensa em pH alcalino¹¹. O CTT também pode ser deletério para muitos microrganismos⁸. Obteve-se quatro resultados falso-positivos, que podem ser explicados pela presença de mais de uma espécie bacteriana na urina, com contagem total de 10⁵ UFC/mL. A urina alcalina foi implicada como um fator para resultados falso-positivos por Cordova *et al.*³. Entretanto, essa informação não pode ser confirmada, pois todas as urinas analisadas apresentaram pH entre 5,5 e 7,0.

Obteve-se 13 resultados falso-negativos, sendo que em 46,0% dos casos a bactéria isolada em cultura foi *E. coli*. Simmons e Williams atribuem resultados falso-negativos à presença de antibióticos na urina, e indicam o pH e a osmolaridade da urina como fatores que influenciam a sensibilidade do teste¹⁸. Neste estudo, nenhum dos pacientes relatou estar fazendo uso de antimicrobianos. Segundo Cordova *et al.*³, a presença de agentes redutores na urina podem destruir completamente a molécula de CTT, não permitindo o aparecimento de coloração.

Apesar da cultura quantitativa de urina ser considerada o método padrão para a análise da ITU, ela consome muito tempo e é cara. O teste com CTT avaliado neste trabalho apresenta bons índices de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, além de ser de fácil execução, podendo ser utilizado como método de triagem para detecção de pacientes assintomáticos em grupos que necessitem de acompanhamento, como gestantes, crianças e idosos; bem como o acompanhamento pacientes com infecções crônicas ou em tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Aspevall, O.; Forsum, U.; Kjertadius, T.; Hallander, H. Evaluation of two methods for improving quality of diagnosis of bacteriuria by culture in primary healthcare. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 60: 381-386, 2000.
2. Casadevall, A. Crisis in infectious diseases: time for a new paradigm. *Clin. Infect. Dis.*, 23: 790-794, 1996.
3. Cordova, M.; Saez, C. G.; Saieh, C.; Puga, F. Triphenyl tetrazolium chloride test (TTC). Useful or useless? *Rev. Chil. Pediatr.*, 49: 61-62, 1978.
4. Cunningham, A. M.; Edwards, A.; Jones, K. V.; Boudeaux, K.; Willock, J.; Bar-

nes, R. Evaluation of a service development to increase detection of urinary tract infections in children. *J. Eval. Clin. Pract.*, 11: 73-76, 2005.

5. Fernandes, A. T.; Fernandes, M. O. V.; Ribeiro Filho, N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu, 2000. 1721 p.
6. Ferreira, A. W.; Ávila, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443p.
7. Goodacre, R.; Timmins, E. M.; Burton, R.; Kaderbhai, N.; Woodward, A. M.; Kell, D. B.; Rooney, P. J. Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology*, 144: 1157-1170, 1998.
8. Gunz, F. W. Reduction of tetrazolium salts by some biological agents. *Nature*, 163: 98, 1949.
9. Heilberg, I. P.; Schor, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário-ITU. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 49: 109-116, 2003.
10. Horii, T.; Morita, M.; Kamen, Y.; Kanno, T.; Maekawa, M. Comparison of a new system with conventional methods for quantitative urine cultures. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35: 499-503, 2002.
11. Jones, P. H.; Prasad, D. The use of tetrazolium salts as a measure of sludge activity. *J. Water Poll. Control Fed.*, 41: 441-449, 1969.
12. Macfaddin, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. 912p.
13. Martino, M. D. V.; Toporovski, J.; Mimica, I. M. Métodos bacteriológicos de triagem em infecções do trato urinário na infância e adolescência. *J. Bras. Nefrol.*, 24: 71-80, 2002.
14. Mims, C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Wakelin, D.; Williams, R. Microbiologia médica. 2. ed. São Paulo: Manole, 1999. 584 p.
15. Mustakallio, K. K.; Aho, E. O. Tetrazolium reduction test for milk. *Science*, 122: 971-972, 1955.
16. Nicolle, L. E. Epidemiology of urinary tract infection. *Infect. Med.*, 18: 153-162, 2001.
17. Simmons, N. A.; Williams, J. D. A simple test for significant bacteriuria. *Lancet*, 11: 1377, 1962.
18. Simmons, N. A.; Williams, J. D. Use of a solid reagent in the triphenyl tetrazolium chloride test for bacteriuria. *J. Clin. Path.*, 20: 767-769, 1967.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Tatiana Zampiero Ramos
Rua Luis Saska, 116, Jardim Celiarnar
CEP. 14806-152 Araraquara - SP
e-mail: gframos@ig.com.br

IFCC WORLDLAB

Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Avaliação da dosagem de interleucina-5 e imunoglobulina e em pacientes com giardíase com ou sem eosinofilia

Evaluation of dosage of interleucina-5 and immunoglobulin e in patients with giardíase with or without eosinophilia

Ana Lúcia A. Fontenele¹; Paulo Germano de Carvalho¹; Cláudio H. de A. Ferreira²; Alísio B. Girão³; Maria Jania Teixeira⁴; José Ajax Nogueira Queiroz⁵ & Yacy M. Almeida⁵

RESUMO - Giardíase é uma protozoose intestinal causada por *Giardia lamblia*. A eosinofilia ($> 500/\text{mm}^3$) nas parasitoses é geralmente encontrada nas infecções por nematódeos e raramente é referida na literatura em relação à infecção por *G. lamblia*. Este estudo foi desenhado a fim de determinar a relação entre IL-5 e presença de eosinofilia em crianças e adolescentes com giardíase. Foram selecionadas 38 crianças e adolescentes na faixa etária de 0-18 anos portando exclusivamente *G. lamblia* e 32 crianças e adolescentes saudáveis como controles. Foram excluídas nesta fase do projeto pacientes portadoras de outros parasitas. No momento da entrega do material fecal era coletado sangue para a realização do hemograma, dosagem da IgE e IL-5. A casuística foi dividida em 3 grupos. Grupo 1: portadores de giardíase e eosinofilia (N: 20), Grupo 2: portadores de giardíase sem eosinofilia (N:18) e Grupo 3: pacientes com ausência de parasitose (N:32). Resultados: Nos casos de giardíase, 52,6% apresentaram eosinofilia. Grupo 1: 100% (20/20) apresentaram uma IgE elevada ($>100\text{UI/ml}$) e 45% (9/20) pacientes deste grupo produziram IL-5. Grupo 2: 72% (13/18) IgE acima de 100UI/ml . Não se detectou IL-5. Grupo 3: 65,6% (21/32) IgE acima de 100UI/ml . Não se detectou IL-5. Pacientes com giardíase e eosinofilia (Grupo 1) apresentaram produção de IL-5 enquanto o grupo 2 e o controle não apresentaram

PALAVRAS-CHAVE -

SUMMARY - Giardiasis is an intestinal protozoal disease caused by *Giardia lamblia*. The eosinophilia ($>500/\text{mm}^3$) among the parasitosis, is usually caused by infections by nematodes, being rarely described in the literature in relation to *Giardia lamblia*. This study was designed in order to determine the relationship between (IL-5) and the presence of eosinophilia in children and young patients with giardiasis. Written consent was obtained before blood sampling, to obtain hematological data, dosage of IgE and IL-5. Thirty eight patients aging from 0 to 18 years old having exclusively *G. lamblia* were compared to 32 patients in the same range of age as control. In this phase of the were excluded patients infected with other parasites. Patients were divided into 3 groups: Group I: 20 patients with giardiasis and eosinophilia; Group II: 18 patients with giardiasis, no eosinophilia; group III 32 patients without parasitosis. Results: In the cases of giardiasis, 52,6% had absolute Eosinophils. Group I: 100% presented IgE over 100UI/ml and 45% (9/20) presented IL-5. Group II: 72% had IgE over 100UI/ml and no IL-5 Group III: 65,6 had IgE over 100UI/ml and no IL-5. Patients with giardiasis and eosinophilia (group I) had IL-5 while group II and control didn't.

KEYWORDS -

INTRODUÇÃO

1. Giardíase - *Giardia lamblia*

A giardíase é uma doença parasitária intestinal causada pelo protozoário *Giardia lamblia*, que tem a seguinte sinonímia: *Giardia duodenalis* e *Giardia intestinalis*. (REY, 2001). Este parasito foi primeiramente descrito por Anton von Leewenhoek em 1681 sendo responsável por diversas manifestações gastrintestinais, inclusive má absorção crônica, entre outras. Nos adultos, na maioria das vezes a parasitose não determina sintomas (SMITH, 1985 & ELIA, 2001), na infância, uma infecção prolongada, pode acarretar retardo no crescimento (FARTHING, 1990).

G. lamblia é um parasito extracelular que adota duas formas evolutivas no seu ciclo biológico: a cística e a trofozoítica. A forma cística é a forma de resistência do parasito e é ela que infecta o homem através da ingestão de água e alimentos contaminados. (NEVES, 2000; SMITH, 1985).

A forma trofozoítica, flagelar, é a responsável pelo desenvolvimento da doença. O processo de infecção se inicia no estômago onde, pela ação dos ácidos a membrana cística, sofre um processo de digestão, sendo o desencistamento

completado no intestino delgado, onde ocorre a colonização do parasito facilitada pela fixação dos trofozoítas nas microvilosidades das células da mucosa intestinal. Os trofozoítas se reproduzem por divisão binária, como os protozoários mastigóforos o ciclo biológico se completa com o encistamento do parasito e sua eliminação para o meio exterior juntamente com o bolo fecal (SMITH, 1985; FARTHING, 1989). O mecanismo de invasão do parasito aos tecidos não está claro; trabalhos relatam que *G. lamblia* tem o poder de invadir a mucosa do intestino do homem. Estudos histológicos demonstraram claramente a presença de trofozoítas invadindo a mucosa e correlacionaram esse processo com sintomas gastrintestinais e/ou esteatorréia. (BRANDBORG *et al.*, (1967) e SAHA *et al.*, (1977). Farthing (1989) atribui que uma das razões da invasão seja a destruição das microvilosidades da membrana durante o processo de fixação.

2. Patogênese

Em algumas pessoas a presença do parasito pode não determinar sintomas mas, em outras, pode ocasionar severa diarreia, hipogamaglobulinemia e má absorção dos nutrientes. Afeta particularmente a assimilação de gorduras, vita-

Recebido em 11/11/2005

Aprovado em 02/08/2006

Trabalho realizado nos Hospitais Dr. Abelardo Rocha e Santa Terezinha - Caucaia Ceará

¹Mestre em Patologia tropical, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

²Acadêmico do Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

³Técnico de Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Ceará.

⁴Doutora em Patologia - FIOCRUZ - Bahia

⁵Professor(a) do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

mina A e B₁₂, ácido fólico, glicose, lactose e D-Xilose (REY, 2001), e menos freqüentemente os folatos. A deficiência de vitamina A também foi associada com giardíase em crianças (SMITH, 1985). A má absorção de D-Xilose ocorre em 55% dos parasitados, da vitamina B₁₂ em 60% e 64% destes apresentam esteatorréia (HARTONG *et al.*, 1979).

É possível que a má absorção seja devida à grande quantidade de parasitos forrando as mucosas intestinal, do duodeno e jejuno (REY, 2001).

Muniz-Junqueira e Queiroz (2002) relataram a relação entre a desnutrição energético-protéica, a deficiência de vitamina A e o parasitismo por *G. lamblia*. Em seu estudo, somente as crianças infectadas por *G. lamblia* mostraram deficiência de peso e altura com relação a sua idade. Este estudo confirma o trabalho de Farthing (1990), onde ele afirma que na infância uma giardíase grave pode acarretar retardamento do crescimento.

Embora fenômenos de alergia aguda, urticária e outras manifestações cutâneas em indivíduos com *G. lamblia* não sejam comuns, diversos trabalhos indicam uma relação com o parasito (DI PRISCO *et al.*, 1993; HAMIRICH *et al.*, 1983; CARPINTEIRO *et al.*, 1998). A urticária é uma manifestação típica de uma reação imunológica causada pela liberação dos mediadores químicos na interação de antígenos específicos com a IgE (HAMIRICK; MOORE 1983). *G. lamblia* durante seu desenvolvimento libera antígenos (Ag) de superfície na mucosa, induzindo a produção de IgE (FARTHING *et al.*, 1987). Pacientes com giardíase apresentam níveis de IgE total elevados, provavelmente devido estimulação policlonal dos Linfócitos B. Outra causa provável da elevação de IgE é o dano na mucosa produzido pelo parasita, quando há uma grande absorção dos antígenos de *G. lamblia* pela mucosa. (PRISCO *et al.*, 1993).

Carpinteiro *et al.*, (1998) observaram a relação da giardíase com manifestação cutânea, indicando a possível associação entre *G. lamblia* e o desenvolvimento de alergia. Observaram ainda que a dermatite atópica papilovesicular observado nos pacientes com giardíase regrediu após o tratamento específico para protozoose. No estudo dos papilomas a bacteriologia, a micologia e a virologia e a cultura foram negativas, enquanto que o estudo histológico da lesão papilovesicular revelou a presença de eosinófilos e linfócitos na epiderme. É provável que a infecção por *G. lamblia* facilite a absorção de antígenos alimentares pela mucosa intestinal, induzindo a sensibilização de pacientes, provavelmente por efeito adjuvante.

Uma variedade de antígenos (24-225KDa) tem a função no desenvolvimento da proteção imunitária; eles são detectados por técnicas de imunoprecipitação, imunoblotting. Alguns antígenos de superfície são secretados e/ou excretados durante o crescimento *in vitro* (FARTHING, 1990). Em crianças com urticária e escabiose, após diversos tratamentos sem sucesso, foi diagnosticada a presença de *G. lamblia*, níveis elevados de IgE e eosinofilia. Após tratamento com metronidazol para *G. lamblia* as lesões desapareceram e IgE e eosinófilos normalizaram (FALK, 1984; HAMIRICK *et al.*, 1983; FARTHING *et al.*, 1983).

D.Canomme *et al.*, (2000) relataram a associação entre a síndrome de Well's, uma rara dermatose caracterizada com eosinofilia nos tecidos, e giardíase recorrente. Após tratamento com metronidazol desapareceram a giardíase e os sintomas cutâneos. Ferrante, *et al.*, (1991) relataram a associação da síndrome de Churg-Straus, uma desordem pulmonar e sistêmica, caracterizada por uma pequena vasculite nos vasos sangüíneos e níveis elevados de eosinófilos, normalizados após tratamento para *G. lamblia*.

3. Diagnóstico

G. lamblia é um parasita comum e de distribuição mundial. Sua infecção é geralmente diagnosticada pela identificação ao microscópio das formas císticas ou trofozoítas presentes nas fezes. Nos esfregaços fecais, os trofozoítas de *G. lamblia* são piriformes e binucleados. Os cistos são ovais ou elipsóides; quando corados, podem mostrar uma delicada membrana destacada do citoplasma. No seu interior encontram-se dois a quatro núcleos, um número variável de fibrilas (axonemas de flagelos) e os corpos escuros em forma de meia-lua situada no pólo oposto aos núcleos. Os cistos, quando corados pela solução de iodo, apresentam uma tonalidade pardacenta, mais ou menos carregadas, os axonemas, os corpos parabasais coram-se em negro (DE CARLI, 2001).

Carvalho *et al.*, (2002) compararam os métodos Faust, Lutz, Baermann-Morais e o Kit Coprotest. Neste estudo não foi observada positividade para *G. lamblia* pela técnica Baermann-Morais nas amostras e foram observadas pequenas diferenças para parasitas intestinais, nos outros métodos utilizados. Nunes *et al.*, (1993) compararam a sensibilidade dos métodos Faust e Hoffman, Pons & Janer na detecção de parasitos intestinais. O método de Faust demonstrou ser mais adequado para a detecção de cistos de protozoários e ovos leves, enquanto que o método de Hoffman, Pons e Janer mostraram melhor desempenho para o encontro de ovos pesados e larvas de helmintos. Os métodos de Lutz e de Hoffman, Pons e Janer se baseiam no mesmo princípio o da sedimentação espontânea (DE CARLI, 2001).

4. Imunopatologia da Giardíase

Os indivíduos mais susceptíveis à giardíase são aqueles que apresentem imunodeficiência, tais como hipogamaglobulinemia e AIDS (FARTHING, 1990). Apesar de uma imunidade protetora ainda não ter sido demonstrada de forma conclusiva nas infecções humanas por *G. lamblia*, o desenvolvimento de resposta imune tem sido sugerido a partir de evidências, tais como: (1) a natureza autolimitante da infecção; (2) a detecção de anticorpos específicos *anti-G. lamblia* nos soros de indivíduos infectados; (3) a participação de monócitos citotóxicos na modulação da resposta imune; (4) a maior susceptibilidade de indivíduos imunocomprometidos à infecção, principalmente os que apresentam hipogamaglobulinemia. Anticorpos IgG, IgM e IgA *anti-G. lamblia* têm sido detectados no soro de indivíduos com giardíase. Além dos Acs. circulantes, estudos têm relacionado a participação de IgA secretória na imunidade local ao nível da mucosa intestinal, apesar da sua função ainda não ser bem conhecida (NEVES, 2000). Evidências sugerem que esse anticorpo reduz a capacidade de adesão dos trofozoítas às células do epitélio intestinal (MAYER, 2003). O sistema imune secretório foi implicado nesta proteção (SMITH, 1985). IgA é a única imunoglobulina que evita a penetração de antígenos, tendo como função primária aglutiná-los no epitélio, formando complexos que previnem o desenvolvimento de resposta imunológica adversas (WALKER, 2002).

A patogênese dessa infecção tem sido associada com alterações imunológicas sistêmicas e locais através da avaliação das respostas humoral e mediada por células. Uma resposta inflamatória ocorre no intestino delgado durante infecção humana por *G. lamblia* caracterizado pelo aumento do número de linfócitos na mucosa e epitélio. Quando a infecção está resolvida o número de linfócitos diminui. (ELIA, C; SOUZA, H. 2001).

A proteção local se desenvolve através da ativação da imu-

nidade das mucosas, onde os linfócitos T na mucosa são encontrados principalmente nas Placas de Peyer, no epitélio com Linfócitos Intra-Epitelial (LIE) e na Lâmina Própria entre as criptas da camada epitelial. Os Linfócitos Intra-Epeliais (LIE) são observados no epitélio de revestimento da superfície intestinal, especialmente no intestino delgado apresentando aspectos funcionais distintos (GOTO *et al*, 2000). A grande maioria é composta de células T com o predomínio do tipo CD8 sobre CD4 (ERLE & PABSI, 2000). Outro tipo celular presente nas mucosas é o mastócito. Esta célula tem receptores para IgE. Há algumas evidências que os mastócitos têm uma função no controle da infecção. Eles participam efetivamente no desenvolvimento da hipersensibilidade imediata e Hipersensibilidade Tipo I (ELIA, 2001). A hipersensibilidade imediata (Tipo I) produzida em resposta a antígenos liberados está relacionada com a eosinofilia que se acompanha de níveis elevados de IgE devido ao aumento de antígenos liberados no hospedeiro pelo parasito (ORTIZ *et al*, 1990).

Um dos mecanismos mais potentes do sistema imune é a reação iniciada por IgE ligados aos mastócitos. Inicialmente os linfócitos B, sob o comando de linfocinas Th-2 (IL-4 e IL-5), produzem IgE em resposta à exposição inicial a um antígeno, alérgeno (ELIA, 2001). Posteriormente, estas imunoglobulinas ligam-se aos receptores Fc dos mastócitos e eosinófilos desencadeando sua ativação por ocasião de uma segunda exposição ao mesmo alérgeno. A ligação do antígeno à IgE aderida ao mastócito leva à ativação do mesmo, com consequência liberação dos mediadores que possuem diversas atividades tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa das vias aéreas, ativação dos eosinófilos entre outros (ELIA, 2001; ABBAS, 2002).

Níveis elevados de IgE (IgE 100UI/ml) no soro ocorrem em muitas doenças parasitárias e alérgicas, principalmente em criança, dentre elas destacamos a giardíase. *Giardia lamblia* influencia o nível de IgE em pacientes clinicamente sintomáticos. A giardíase está associada com redução de IgA secretória (intestinal) e níveis baixos de IgE encontradas em pacientes com hipogamaglobulinemia (GELLER *et al*, 1978). O macrófago, monócito e neutrófilo apresentam citotoxicidade espontânea contra *G. lamblia* (SMITH *et al*, 1993, FARTHING, 1990).

O eosinófilo é uma das células presentes no intestino, sendo alvo de grande importância na investigação da resposta imune anti-parasitária. Participam no mecanismo inflamatório podendo agir tanto no recrutamento quanto na ativação dos linfócitos. A eosinofilia periférica e tecidual induzida pela presença de parasitas é primariamente dependente do linfócito Th-2 e da produção da IL-5 (ROTHENBERG, 1998).

A eosinofilia (eosinófilo >500/mm³) causada por parasitos é geralmente encontrada nos pacientes infectados com trematódeos, cestódeos e nematódeos. *G. lamblia* como causa de eosinofilia é referida raramente na literatura. No entanto, alguns trabalhos principalmente da literatura espanhola citam a associação entre a giardíase e eosinofilia particularmente em crianças (ARDUAN *et al*, 1990; SOTILLOS *et al*, 1991; DOS SANTOS *et al*, 1996).

Os eosinófilos são originados na medula óssea e contém dois tipos de grânulos: primários e específicos. Os grânulos primários são poucos característicos e nos grânulos específicos predominam as proteínas catiônicas, das quais há quatro tipos. O core do grânulo é quase exclusivamente constituído da proteína básica maior (MPB) e na matriz estão outras três proteínas básicas: proteína catiônica eosi-

nófila (ECP), neurotóxica eosinófila (EDN), e a peroxidase eosinófila (EPO) (PEAKMAN, 1999; HENRY, 1995). Os grânulos específicos do eosinófilo e em particular a MBP, ECP e EPO podem lisar as larvas de certos helmintos *in vitro* (OLIVEIRA *et al*, 1997). Elas possuem propriedades físico-químicas semelhantes às substâncias tóxicas. A interação destas proteínas com a membrana celular alvo conduz à desorganização da camada lipídica e à alteração de proteínas. Estas proteínas dos eosinófilos perturbam a osmolaridade e os constituintes celulares induzindo a morte celular quer por necrose ou por apoptose. A MBP, por exemplo, age diretamente no epitélio conduzindo a formação de bolhas. A ECP e EDN têm propriedade neurotóxica. Elas possuem uma atividade enzimática de ribonuclease, agem em baixa concentração e ativam as células que participam do processo inflamatório. A MPB ativa também o macrófago e neutrófilos polinucleares aumentando sua capacidade fagocitária e seu metabolismo oxidativo. A EPO estimula a histamina liberada dos mastócitos e em contrapartida, os mastócitos podem modular a agressão inflamatória do eosinófilo (DUBUCQUI *et al*, 2000).

Três citocinas são responsáveis por regular a maturação dos eosinófilos: Interleucina-3 (IL-3), GM-CSF (do inglês: *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) e a Interleucina-5 (IL-5). A IL-5 é a citocina mais específica para o eosinófilo, responsável pela sua diferenciação e liberação da medula óssea para o sangue periférico (GREGORY *et al*, 2003). Esta função é bem demonstrada por estudos de manipulação genética em camundongos. A super produção de IL-5 em camundongos transgênicos resulta em uma eosinofilia acentuada. Por outro lado, a remoção do gene da IL-5 leva a uma redução significativa de eosinófilo no sangue e no pulmão após um estímulo alérgico (FOSTER *et al*, appud ELIA, 2001). A IL-5 pode ser produzida pela subpopulação de células T helper2 (Th2), das células T CD4 e eosinófilo. Ela é a chave da regulação das doenças intestinais principalmente parasitose ou gastroenterite eosinófila (LORENTZ *et al*, 1999). A IL-5 também é produzida pelos mastócitos ativados (ABBAS, 2002).

A IL-5 tem sido identificada como fator importante na produção de IgA produzida pela célula B, auxiliando na diferenciação destas para plasmócitos. Estudo *in vitro* tem demonstrado que IL-5 age sinergicamente com IL-2 e IL-4 para promover a secreção de IgA. A IL-5 é distribuída na lâmina própria do intestino mapeando a distribuição de IgA secretória. Estudos *in vivo* revelam que camundongos deficientes em IL-5 (IL-5^{-/-}) têm uma pequena, mas significativa, redução na concentração de IgA intestinal, comparando com os camundongos IL-5^{+/+} que são capazes de manter uma resposta normal de IgA para ovalbumina (HUSBOND, 2002).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Casuística

A população desse estudo foi composta de crianças e adolescentes de 0 a 18 anos, portadoras exclusivamente de *Giardia lamblia*. O recrutamento foi feito no próprio laboratório onde após consulta médica as crianças e os adolescentes se dirigiam a fim de realizar seus exames. Para execução deste trabalho foram utilizados o laboratório e posto de coleta dos Hospitais: Dr. Abelardo Rocha e Santa Terezinha respectivamente, ambos pertencentes à Prefeitura de Caucaia. O propósito do estudo era explicado aos responsáveis pelos pacientes antes de uma entrevista e aqueles que concordavam em participar do estudo e se enquadra-

vam nos critérios previstos, eram pré-selecionados. Foram excluídas na pré-seleção, pacientes com uso de medicamentos nos últimos 30 dias, com história de alergia, gestante e nutrízes. Foram excluídos na fase final do projeto pacientes portadores de outros parasitas.

2. Métodos

2.1 Processamento das amostras fecais

As amostras fecais foram colhidas sem conservantes em dias alternados e imediatamente processadas. Entre a coleta de cada amostra foi dado um intervalo de 2 a 3 dias.

Preparação das lâminas

Para o exame do material fecal foram utilizados os seguintes métodos: direto e os de enriquecimento, Faust, Lutz e Baermann-Morais modificado (DE CARLI, 2001; PISCANÇO, 1993).

2.2 Processamento das amostras sangüíneas

As amostras sangüíneas foram coletadas em tubos estéreis a vácuo com e sem anticoagulante. Para a coleta do sangue total a fim de realizar os hemogramas completos foram utilizados tubos com EDTA-k3, e para obtenção do soro, o sangue foi colhido em tubo com ativador de coágulo, mas sem anticoagulante. Ambos da marca Vacuette.

Após coletadas as amostras, o soro foi separado em alíquotas e congelado numa temperatura de 70°C negativos para, posteriormente, serem realizadas as dosagem de IL-5 e IgE.

- Metodologia para realização do hemograma

As amostras sangüíneas para realização dos hemogramas foram processadas no mesmo dia, sendo realizadas as contagens em sistema de automação ADVIA 70, pertencente ao laboratório Bayer com revisão de lâminas.

- Metodologia para dosagem da IgE.

As dosagens de IgE total foram realizadas em sistema de automação IMMULITE Automated Analyzer, em aparelho pertencente ao laboratório DPC (Diagnostic Products Corporation). Esta técnica baseia-se na reação de quimioluminescência.

- Metodologia da dosagem da IL-5

Os níveis de interleucina-5 (IL-5) foram determinados pelo Método ELISA, conforme recomendação do fabricante do kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Trezentos indivíduos sem história de alergia e sem uso de medicamento foram pré-selecionados para estudo. Destes, trinta e oito (38) pacientes portadores exclusivamente de *G. lamblia* foram selecionados para a pesquisa e trinta e dois (32) pacientes saudáveis como controle.

Os pacientes estudados foram agrupados em três grupos: Grupo 1 composto por vinte pacientes portadores de giardíase e eosinofilia.

Grupo 2 composto por dezoito pacientes portadores de giardíase sem eosinofilia.

Grupo 3 composto por trinta e dois pacientes saudáveis, não portadores de protozoose ou helmintoses.

Conforme podemos observar na tabela 1, a maior prevalência de giardíase é na faixa etária de cinco a nove anos, seguindo de zero a quatro anos.

Tabela I
Variação de giardíase na faixa etária.

Faixa etária	Giardíase
0-04	10 (26, 3%)
05-09	18 (47, 4%)
10-14	08 (21, 0%)
15-18	02 (5,3 0%)
Total	38 (100 ,0%)

Quanto à prevalência de eosinofilia, em pacientes com giardíase, 12 (31,5%) estavam na faixa etária de cinco a nove anos. Na faixa etária de zero a quatro anos e dez a quatorze anos houve a mesma prevalência com 3 (7.9%) pacientes em cada uma. Conforme podemos observar na tabela 2.

Encontramos na tabela 3 a população selecionada com relação à presença de eosinofilia, segundo a faixa etária e o sexo. A maioria dos pacientes infectados com eosinofilia são crianças do sexo masculino.

Tabela II
Presença de eosinofilia segundo a faixa etária.

Faixa etária	Com Eosinofilia	Sem Eosinofilia
0-04	03 (7,9%)	07 (18, 4%)
05-09	12 (31, 5%)	06 (15, 8%)
10-14	03 (7,9%)	05 (13, 2%)
15-18	02 (5,3%)	00 (0%)
Total	20 (52, 6%)	18 (47,4)

No grupo com giardíase sem eosinofilia houve um equilíbrio entre as faixas etárias. Dos 18 casos apresentados 18,4% estavam na faixa etária de zero a quatro anos, 15,8% na faixa de cinco a nove anos e 13,2 na faixa etária de dez a quatorze anos. Neste grupo, a distribuição de sexo também é superior no sexo masculino sobre o feminino. A distribuição por sexo, com relação a sua faixa etária, foi a seguinte: zero a quatro anos 18.4% foram do sexo masculino; na faixa etária de cinco a nove anos 7.9% foram do sexo feminino e 7.9% do sexo masculino e na faixa etária de dez a quatorze anos 5.3% foram do sexo masculino e 7.9% do sexo feminino.

Tabela III
Variação da eosinofilia conforme o sexo e a idade

Faixa etária	Feminino	Masculino	Total
0-04	00 (0%)	03 (15%)	03 (15%)
05-09	03 (15%)	09 (45%)	12 (60%)
10-14	03 (15%)	00 (0%)	03 (15%)
15-18	01 (5%)	01 (5%)	02 (10%)
Total	07 (35%)	13 (65%)	20 (10 0%)

No terceiro grupo composto por pacientes saudáveis a distribuição por faixa etária mostrou um predomínio naquela de cinco a nove anos com 25% de casos do sexo masculino e 15.6% de casos do sexo feminino totalizando um total de 40.6% de casos. Na faixa de zero a quatro anos encontramos com 21.9% de casos do sexo feminino e 9.4% casos do sexo masculino num total de 31.3% de casos, na faixa etária de dez a quatorze anos apresentou uma igualdade com

12.5% de casos para cada sexo num total de 25% de casos e na faixa etária de quinze a dezoito anos tivemos apenas 3.1% de caso do sexo feminino.

Com base nos resultados verificou-se que houve produção de IL-5 em 9/20 (45%) dos pacientes do Grupo 1, com uma maior produção a faixa etária de 5 a 9 anos conforme podemos observar na tabela 4.

Tabela IV
Produção de IL-5 e a faixa etária

Faixa etária	Produção de IL-5	Ausência de produção de IL-5
0-04	02(10%)	01 (5%)
05-09	06 (30%)	06 (30%)
10-14	01 (5%)	02(10%)
15-18	00 (0%)	02(10%)
Total	09 (45%)	11 (55%)

Níveis elevados de IgE foram detectados em 20/20 (100%) dos pacientes do Grupo 1. Dos 20 pacientes estudados podemos observar que naqueles onde a contagem absoluta de eosinófilos era mais elevada houve produção de IL-5 e também elevadas concentração de IgE.

No Grupo 2 podemos observar que não houve produção de IL-5, mas houve uma elevação relativa nas concentrações de IgE (72%), apresentando uma grande elevação nas concentração de IgE, em que os eosinófilos estavam acima de 400 seus valores absolutos.

O Grupo 3 apesar de todos os pacientes serem saudáveis, não portadores de parasitose, a concentração de IgE foi elevada em 21/32 (65,6%) e não houve produção de IL-5.

DISCUSSÃO

G. lamblia é um parasito cosmopolita, de região temperada e tropical, sendo considerado o protozoário mais prevalente no mundo inteiro (FERREIRA, 2001). Como seus cistos não são destruídos por tratamento com cloro, muitas vezes *G. lamblia* é endêmica em reservatórios de água pública, onde não há tratamento por filtro de areia e em córregos freqüentados por praticantes de campismo (ROBBINS, 2000). A giardíase é uma das principais parasitoses intestinais entre as crianças brasileiras (ASSIS *et al* 2003).

O presente estudo confirma a grande prevalência de *G. lamblia* em nosso meio, onde em 300 pacientes pré-selecionados verificou-se 19% de casos de giardíase, tanto isolados como associados com demais parasitas.

Neste estudo teve-se a grande preocupação em utilizar vários métodos coproparasitológicos onde e tivesse a certeza de que os pacientes selecionados eram portadores exclusivamente de *G. lamblia*.

Carvalho *et al.* (2002), comparando diversos métodos coproparasitológicos revelaram pequenas diferenças na capacidade de detecção para a maioria das estruturas parasitárias. Em contra partida, Nunes *et al.*, (1993) verificaram uma maior sensibilidade para detecção de cistos de protozoários e ovos leves quando utilizado o método Faust *et al* e melhor desempenho na técnica de Hoffman, Pons e Janner na detecção de ovos pesados.

Este trabalho observou-se, igualmente, uma maior sensibilidade do método de Faust para detecção de *G. lamblia* que não foi encontrada quando da utilização dos métodos de sedimentação. Observamos uma boa sensibilidade para alguns ovos de helmintos como, por exemplo, de: *A. lumbricoides* (ovos férteis), *Ancylostomideos*, *E. vermicularis*,

T. trichiura, estando de acordo com De Carli, (2001).

O encontro de eosinofilia relacionada à infecção por protozoários ainda não está muito bem compreendida. Arduan *et al.*, (1990) avaliaram uma gastroenterite causada por *G. lamblia* com grave desidratação acompanhada de eosinofilia e elevação de IgE. Em seu trabalho eles discutiram a relação de giardíase com eosinofilia e as manifestações alérgicas e concluíram que a inexistência de eosinofilia por protozoários tem três exceções possíveis: *E. histolytica*, *G. lamblia* e *Isospora belli*, e que este fato se deve a uma reação de hipersensibilidade imediata devido ao aumento de antígenos liberados para o hospedeiro sensibilizado. Nesse trabalho, os autores citam um trabalho de Cerezo *et al.*, (1986) que demonstra a associação de eosinofilia e giardíase intestinal em 111 casos de crianças com giardíase, dos quais 15% possuem eosinofilia. Trabalho semelhante foi realizado por Sotillos *et al.*, (1991) mostrando que pacientes com giardíase desenvolveram eosinofilia. Nesse trabalho, os autores citam dois casos de crise alérgica onde os pacientes não tinham história anterior de alergia e foi detectado o protozoário *G. lamblia* nas fezes. Relataram, também, que após o tratamento com metronidazol a eosinofilia desapareceu.

Neste estudo analisou-se a presença de eosinófilos em crianças e adolescentes; encontrou-se uma prevalência de 52,6% de casos com eosinofilia em pacientes exclusivamente portadores de *G. lamblia*, confirmando os estudos citados na literatura espanhola feitos por Arduan *et al.*, (1990) Sotillos *et al.*, (1991) Cerezo *et al.*, (1990).

Dos Santos e Vituri (1996), estudando 42 crianças parasitadas exclusivamente por *G. lamblia*, observaram que a contagem absoluta dos eosinófilos variou no intervalo de 563-912. Esse encontro sugere que *G. lamblia* secretaria alguns tipos de alérgenos, os quais poderiam atingir as camadas mais profundas da mucosa intestinal, sendo responsáveis pelo aumento dos eosinófilos no sangue periférico. Segundo estes mesmos autores, essa liberação na mucosa intestinal desenvolveria uma reação de hipersensibilidade, elevando além dos eosinófilos a concentração de IgE.

Falk, 1984 relata dois casos de crianças com escabiose, história de diarreia e infecção por *G. lamblia*, onde a concentração de IgE em ambos os casos estava maior que 1000UI/ml e os valores absolutos dos eosinófilos era de 1250/mm³ e 550mm³, respectivamente. O autor verificou que, após o tratamento com metronidazol, o número de eosinófilos e a concentração de IgE caíram. Hamrich e Moore (1983) relatam igualmente uma associação entre giardíase e urticária crônica em uma criança com elevada concentração de IgE, onde após o tratamento específico para a protozoose o problema ficou resolvido.

Neste trabalho constatou-se que todos os pacientes (100%) do Grupo 1 (pacientes com giardíase e eosinofilia) apresentaram concentração elevada de IgE (387 a >2000UI/ml); dos pacientes do grupo 2 (giardíase sem eosinofilia) 72% apresentaram IgE acima de 100UI/ml e os pacientes do Grupo3 (grupo controle) apresentaram níveis elevados de IgE em 65,6%. Estes resultados estão em concordância com o trabalho de Geller *et al.*, (1978). Estes autores compararam 14 pacientes exclusivamente com giardíase e 14 pacientes saudáveis (grupo controle), onde, ambos os grupos, não tinham história de alergias. Observou-se que a concentração média de IgE não apresentou diferenças nos seus níveis em pacientes com giardíase (média 1217UI/ml) e seus respectivos controles (média 1433UI/ml). Geller *et al.*, (1978) atribuíram o aumento dos níveis de IgE a fatores externos e a etnia da população.

Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho relacionando giardíase com a produção de IL-5. Em alguns trabalhos estão relatados os aumentos de eosinófilos e concomitantemente da IL-5. Lorentz *et al.*, (1999) observaram, *in vitro*, mastócitos contribuindo para a produção de IL-5 na mucosa intestinal humana, verificando que os pacientes com IL-5 positiva apresentavam eosinofilia (70 +/-13%). Foster *et al.*, 1996 demonstraram por estudos de manipulação genética em camundongos, que a super produção de IL-5 em camundongos transgênicos resulta numa eosinofilia marcante. Por outro lado, a remoção do gene da IL-5 leva à redução significativa de eosinófilos no sangue e no pulmão, após estímulos capazes de desenvolver a alergia. Este trabalho mostra resultados que estão de acordo com Lorentz *et al.*, (1999) onde 45% (9/20) dos pacientes do Grupo 1, que produziram IL-5, apresentavam eosinofilia elevada (680-1598).

Tendo em vista que nos pacientes com giardíase e sem eosinofilia não se detectou IL-5 e naqueles que apresentaram o parasito e aumento de eosinófilo, esta interleucina estava presente em altos níveis; pode-se sugerir que eosinofilia seja a responsável por este fato.

CONCLUSÕES

1. O perfil de prevalência de *G. lamblia* no meio estudado é de 19% da população pré-selecionada.
2. Houve relação entre pacientes com giardíase e eosinofilia com 52,6% dos casos.
3. A faixa etária onde a relação de giardíase e a eosinofilia ocorrem com maior frequência é 05 a 09 anos: é, também, nesta faixa etária que ocorre a maior produção de IL-5 e as maiores concentrações de IgE.
4. Em todos os grupos estudados a IgE mostrou-se elevada, havendo, no entanto, aumento significativo naquele constituído por portadores de giardíase e eosinofilia, quando comparados aos demais, sugerindo uma relação entre o aumento de eosinófilos e níveis elevados de IgE.
5. Pacientes com giardíase e eosinofilia mostraram produção de IL-5, não detectadas nos demais grupos, apontando uma efetiva relação deste interleucina com eosinofilia, tendo a *G. lamblia* como um desencadeador indireto desse processo.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. revisão técnica de MACHADO, D. C. Imunologia Celular e Molecular 4ª Ed. Ed. Revinter Ltda, RJ. Cap. 19:430-435 Cap. 11: 259-260,2000.
2. ARDUAN, O. A.; CASTILLO, J. M.; CARREIRA, J.; CUBERO, L. L.; MIRANDA, R.; CASADO, Y. M. J. Gastroenteritis con eosinofilia por *Giardia lamblia*. Rev. Clin. Esp. 197:68-70, 1990.
3. ASSIS, M.; BORGES, F. P.; SANTOS, R. C. V.; LUNARDELLI, A.; GASPARETO, P. B.; GRAZIOTTIN, C. M.; MICHEL, R. V.; TASCAT, T.; DE CARLI, G. A. Prevalência de enteroparasitos em moradores de vila periféricas em Porto Alegre, RS. RBAC vol. 35 (4): 215-217, 2003.
4. BRANDBOG, L.; CHARLETTE, A. B. B.; TANKERSLEY, STUART, G.; BARANCIK, M. AND SARTOR, V. E. Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterology Fev. vol. 52 Number 2, Part 1: 143-150,1967
5. CANONNE, D.; DUBOST-BRAMA, A.; SEGARD, M.; PIETTE, E. AND DELAPORTE, E. Wells' syndrome associated with recurrent giardiasis. British Journal of Dermatology 143: 425-427,2000.
6. CARPINTERO, I. S.; DOVAL, F. J. V. Cutaneous lesions in giardiasis. Report of two cases. British Journal of Dermatology 139:152-153, 1998.
7. CARVALHO, F. M.; FALCÃO, A. O.; ALBUQUERQUE, M. C.; SILVA, P.; BASTOS, O. M. P.; UCHOA, C. M. A. Diagnóstico coproparasitológico: estudo comparativo entre os métodos de Faust & cols., Lutz, Baermann & Moraes e Coprotest. RBAC vol.34(2): 75-77, 2002.
8. CEREZO, J. M.; GARCIA, M. T.;FRANGANILLO, A.; appud ARDUAN, O. A.; CASTILLO, J. M.; CARREIRA, J.; CUBERO, L. L.; MIRANDA, R.; CASADO, Y. M. J. Gastroenteritis con eosinofilia por *Giardia lamblia*. Rev. Clin. Esp. 197:68-70, 1990.
9. DE CARLI, G. A. Parasitologia Clínica Ed. Atheneu, Cap.2 pag.34, 49-59, 2001
10. DOS SANTOS, J.L.; VITURI, C. DE L. Some hematimetric findings in human *Giardia lamblia* infection. Rev Inst Med Trop São Paulo Mar-Abr;38(2):91-5,

- 1996.
11. DUBUCQUOI, S.; CAPRON, S. Structure et fonction des polinucleares eosinophiles. Revue du Praticien 50 (6): 597-601 2000/03/15.
12. ELIA, C. C.S. Imunologia da Mucosa Intestinal Ed. Atheneu pag137-140, 2001.
13. FALK, E. D. Scabies and Giardiasis. Dermatológica 168: 253-254 (1984)
14. FARTHING, M.J.G. Host-Parasite Interaction in Human Giardiasis. Quarterly Journal of Medicine, New Serie 70 (263): 191-204 march,1989.
15. FARTHING, M.J.G. Immunopathology of Giardiasis. Springer Semin Immunopathol 12:269-282,1990.
16. FARTHING, M. J. G.; CHONG, S. K. F.; SMITH J.A.W. Acute Allergic Phenomena in giardiasis. The Lancet, Dec. 17: 1428,1983.
17. FARTHING, M. J. G.; GOKA, A. K. J.; INGE, P. M. G.; PROKOPE, J.; EDSON, C.M.; BUTCHER, P. D. Imune Response in Himan Giardiasis QUARTELY JOURNAL OF MEDICINE 65:878, 1987.
18. FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, 2o Ed. Editora Guanabara. Pág. 250,2001.
19. FERRANTE, E.; VALENTE, S.; CORBO, G.M.; RUMI, C.; SIMONE DE C. E CIAPPI, G. Marcata ipereosinofilia ematica da infestazione da *Giardia lamblia* in um soggetto affetto da síndrome di Churg-Strauss. Minerva Méd 82:689-91,1991.
20. FOSTER, P. S.; HOGAN, S. P. RAMSAY, A. J. MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. J. appud ELIA, C. C.S. Imunologia da Mucosa Intestinal Ed. Atheneu pag 51: 2001.
21. GELLER, M.; GELLER, M.; FLAHERTY, P. B. and MADRUGA, M. Serum IgE levels in giardiasis. Clinical Allergy (8): 69-71,1978.
22. GOTO, E.; KOHROGI, H.; HIRATA, N.; TSSUMORI, K.; HIROSAKO, S.; HAMAMOTO, J.; FUJII, K.; KAWANO, O. and ANDO, M. Human Bronchial Intraepithelial T Lymphocytes as a Distinct T-Cell Subset. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (22):405-411,2000.
23. GREGORY, B.; KIRCHEM, A.; PHIPPS, S.; GEVAERT, P.; PRIDGEON, C.; RANKIN, S. M. and ROBINSON, D. S. Differential Regulation of Human Eosinophil IL-3, IL-5 and GM-CSF Receptor --Chain Expression by Cytokines: IL-3, IL-5 and GM-CSF Down- Regulate IL-5 Receptor · Expression with Loss of IL-5 Responsiveness, but Up-Regulate IL-3 Receptor · Expression. The Journal of Immunology, 170: 5359-5366, 2003.
24. HAMRICK, H. J.; MOORE, G. W. Giardiasis causing urticaria in a child. American Journal dis Child 137:761-762 ,1983.
25. HARTONG, W. A.; GOURLEY, W. K. and ARVANITAKIS, C. Giardiasis: Clinical Spectrum and Functional- Structural Abnormalities of the Small Intestinal Mucosa. Gastroenterology 77: 61-69, 1979.
26. HENRY, J.B. Diagnóstico Clínico e Tratamento- Por Métodos laboratoriais: Nelson Gomes de Oliveira Ed. Manole Ltda. 18Ed. Pag. 713-714 793-794, 1995.
27. HUSBAND, A. J. Mucosal memory- maintenance and recruitment. Veterinary Immunopathology 87: 131-136,2002.
28. LORENTZ, A.;SCHWENGBERG, S.; MIERKE, C.; MANNS, M. P. and BISCOFF, S. Human intestinal mast cell produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross- linking and in vivo in the cause of intestinal inflammatory disease. Eur. J. Immunol. 29: 1496-1503,1999.
29. MAYER, L. Mucosal Immunity. Pediatrics vol.111 (6):1595-1600 june,2003
30. MUNIZ- JUNQUEIRA, M. I. AND QUEIROZ, E. F. O. Relationship between protein -energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,35 (2):133-141, mar-abr,2002.
31. NEVES, D. P. Parasitologia Humana 10ed. Cap.14:107-113, 2000.
32. NUNES, M. P. O.; COSTA, M. S. G.; NUNES, J. F. L.; SILVA, E. M. A.; DANTAS, M. F. A. Avaliação dos métodos de Faust & cols.; de Hoffman & cols.; de Baermann modificado, utilizados na rotina sistemática, para o diagnóstico das enteroparasitoses. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 25 (1):25-26,1993.
33. OLIVEIRA, S. H. P.; FONSECA, S. G.; ROMÃO, P. R. T.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Nitric Oxide Mediates the Microbicidal Activity of Eosinophils. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol:92 Suppl II: 233-235, 1997.
34. PERKMAN, M.; VERGANI, D. Imunologia Básica e Clínica. Eiler Frilisch Toros Ed. Guanabara Pag. 28-30, 1999.
35. PISCANO, C. A. G. Diagnóstico da Estrogiloidose. Revista da Fac. de Medicina da UFC Vol. (03): 105-112,1963.
36. PRISCO, M. C. D.; HAGEL, I. LYNCH, N. R.; BARRIOS, R. M.; ALVAREZ, N. and LOPEZ, R. Possible relationship allergic disease and infection by *Giardia lamblia*. Ann. Allergy 70:210-213, 1993.
37. REY, Parasitologia 3ed. Pág. 272-276, 2001.
38. ROBBINS, Patologia estrutural e funcional 6o Ed. Editora Guanabara, Cap. 9 Pag.:322-323,2000.
39. ROTHENBERG, M. E. Mechanisms of disease. Eosinophilia. New Eng J Med 338:1592-1600,1998.
40. SAHA, T. K. AND GHOSH, T.K. Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterology 72:402-405, 1977.
41. SMITH P. D.; KEISTER, D.B.; ELSON, C.O. Human host response to *Giardia lamblia*. II. Antibody-dependent killing in vitro. Cell Immunol Dec; 82 (2): 308-315,1993.
42. SMITH, P. D. Pathophysiology and Immunology of Giardiasis. Ann. Rev. 36:295-307, 1985.
43. SOTILLOS, E. A.; GANUZA, R. F. J. y NAVARRETE, H. C. Eosinofilia y parasitación intestinal por *Giardia lamblia*. Rev. Clin. Esp. 189: 296,1991.
44. WALKER, W. A. Development of the Intestinal Mucosa Barrier. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 34:533-539 may-june, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Ana Lúcia Arruda Fontenele

Rua Silva Paulet Nº 701 apto 900

Bairro Meireles. Fortaleza. Ceará. CEP 60120020

e-mail: fonteneleana@yahoo.com.br

Características da microbiota subgengival em pacientes com periodontite

Microbiological characteristics of subgingival microbiota in patients with periodontitis

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva

RESUMO - A periodontite pode ser definida como uma infecção mista envolvendo sítios únicos ou múltiplos na cavidade oral e levando à perda dos tecidos periodontais de suporte. Este estudo descreveu a prevalência da microbiota subgengival cultivável das doenças periodontais com atenção especial à natureza polimicrobiana destas infecções. A população estudada consistiu de 95 pacientes, 51 do sexo feminino e 44 do sexo masculino, com idade entre 14 e 62 anos. Vinte e nove pacientes possuíam periodontite do adulto (PA), 6 apresentavam periodontite juvenil localizada (PJJ) e 60 possuíam periodontite de progressão rápida (PPR). Duas a quatro amostras foram obtidas de cada paciente. As amostras foram coletadas com cones estéreis de papel introduzidos no interior das bolsas subgengivais. As amostras foram cultivadas sob atmosfera anaeróbica e microaerófila usando meios de cultura seletivos e não seletivos. Os isolados foram caracterizados ao nível de espécie através de testes bioquímicos convencionais e também pelo uso de um sistema comercial rápido de identificação bacteriana. Os dados mostraram a complexidade da microbiota subgengival associada aos diferentes grupos de doenças periodontais, indicando que a frequência de detecção e isolamento de alguns microrganismos periodontopatogênicos são diferentes nos elementos dentais nas diferentes formas de doença periodontal.

PALAVRAS-CHAVE - Bactérias anaeróbicas, doença periodontal, placa subgengival.

SUMMARY - Periodontitis may be defined as a mixed infection affecting individual or multiple sites within the oral cavity and leading to the loss of the supporting periodontal tissues. This study describes the prevalence of the cultivable subgingival microbiota in periodontal diseases with special attention to the polymicrobial nature of periodontic infections. The study population consisted of 95 patients, 51 females and 44 males, aged 14-62 years. Twenty-nine patients exhibited adult periodontitis (PA), 6 localized juvenile periodontitis (PJJ), and 60 rapidly progressive periodontitis (PPR). Two to four pooled bacterial samples were obtained from each patient. Samples were collected with sterile paper points from the deepest periodontal pockets. The samples were cultured under anaerobic and microaerophilic conditions using selective and non-selective media. Isolates were characterized to species level by conventional biochemical tests and by a commercial rapid test system. The data show the complexity of the subgingival microbiota associated with different periodontal disease groups, indicating that the detection frequency and levels of recovery of some periodontal pathogens are different in teeth affected by different forms of periodontal disease.

KEYWORDS - Anaerobic bacteria, periodontal disease, subgingival plaque.

INTRODUÇÃO

A periodontite pode ser definida como uma infecção mista envolvendo sítios únicos ou múltiplos na cavidade oral e levando à perda dos tecidos periodontais de suporte. A gengivite é um processo infeccioso e inflamatório limitado à gengiva^{1,3}. As doenças periodontais são geralmente crônicas e podem persistir na ausência de tratamento. Estas doenças resultam da exposição do periodonto a placas dentais que se acumulam no dente para formar verdadeiras massas bacterianas na margem gengival ou abaixo dela^{6,17}. A destruição periodontal em geral resulta da ação de vários produtos tóxicos liberados por microrganismos patogênicos específicos localizados na placa subgengival, bem como das respostas do hospedeiro contra esta placa e seus produtos tóxicos^{4,9}. A resposta inflamatória pode resultar em ulceração gengival ao redor do dente, permitindo o acesso de bactérias e/ou seus produtos à corrente sanguínea, podendo portanto, influenciar em todo o estado de saúde do hospedeiro¹¹.

A etiologia bacteriana das doenças periodontais é complexa, com uma grande variedade de microrganismos responsáveis pelo início e pela progressão da doença²⁰. Embora mais de 400 espécies bacterianas diferentes possam ser detectadas na cavidade oral, somente um número limitado pode ser implicado como patógenos periodontais⁷. Muitos destes microrganismos podem também estar presentes em indivíduos saudáveis, podendo existir como comensais e em harmonia com o hospedeiro¹².

Tem sido evidenciado que os microrganismos da placa dental são capazes de iniciarem os mecanismos de destruição dos tecidos periodontais, enquanto seu efetivo controle tem sido demonstrado ser o meio mais apropriado no impedimento da progressão das doenças periodontais¹⁸. A natureza destes agentes patogênicos varia entre as diversas doenças, bem como entre os pacientes e até entre diferentes sítios em um mesmo paciente. Certos grupos de bactérias Gram-negativas têm sido encontrados de forma consistente em lesões periodontais. Entre elas, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Bacteroides* sp., *Selenomonas* sp. e espiroquetas tem sido associadas com periodontites refratárias do adulto^{13,18}. Além disso, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* sp., *Prevotella intermedia* e *Eikenella corrodens* têm sido associadas com periodontite de início precoce. Entretanto, alguns microrganismos Gram-positivos anaeróbios como *Peptostreptococcus micros* e certas espécies de *Enterobacterium* têm sido recentemente implicados em doenças periodontais destrutivas^{2,5}.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é registrar a prevalência de diferentes bactérias que constituem a microbiota subgengival em diferentes grupos de doenças através de cultivos anaeróbicos e obter informações da etiologia microbiana destas infecções polimicrobianas.

Recebido em 04/07/2005

Aprovado em 25/04/2006

Farmacêutico-Bioquímico-Microbiologista

Centro Tecnológico de Análises (CETAN) – Vila Velha/ES

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi baseado em dados obtidos de uma série de amostras microbianas subgengivais coletadas no Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo e processadas no setor de Microbiologia do Laboratório Marcos Daniel (Vitória/ES), em um período de 2 anos. Noventa e cinco pacientes com idade entre 14 e 62 anos encaminhados ao Departamento de Patologia para diagnóstico e tratamento de periodontite foram analisados. Destes, 6 pacientes apresentaram diagnóstico clínico de periodontite juvenil localizada (PJL), 29 pacientes com periodontite do adulto (PA) e 60 pacientes com periodontite de progressão rápida (PPR).

Amostragem microbiológica:

Antes do exame clínico, amostras de fluido subgengival foram coletadas das bolsas subgengivais. A área de amostragem foi isolada com rolos de algodão hidrófilo, cuidadosamente limpa com cones de algodão estéreis e secada com ar estéril. Para amostragem em áreas com um único elemento dentário, dois cones de papel estéreis foram inseridos até o fundo da bolsa periodontal e deixados no local por cerca de 20 segundos, sendo então transferidos para um pequeno frasco contendo fluido de transporte reduzido acrescido de 20% de glicose (elaborado no setor de Microbiologia do Laboratório Marcos Daniel). Por ser líquido, este meio de transporte possui a vantagem de diluir os microrganismos, mantendo ao mesmo tempo a viabilidade das diversas variedades de anaeróbios facultativos e aeróbios estritos. Além disso, este meio permite o congelamento das amostras para estudos posteriores. Para amostras coletadas de mais de um elemento dentário, pelo menos um cone de papel estéril por sítio foi coletado.

Procedimento microbiológico:

As amostras foram processadas dentro de 6 horas após a coleta. Para o isolamento de anaeróbios presentes no espécime clínico, as amostras foram semeadas em placas de ágar Brucella não seletivo (Biomicro Ltda., Brasil) enriquecido com 5% de sangue de cavalo, 0,5% de sangue de carneiro hemolisado e 5mg/L de menadiona. Para o isolamento de bacilos Gram-negativos anaeróbios obrigatórios foi utilizado o ágar Kanamicina-vancomicina-sangue lisado (KVLB, Becton-Dickinson, EUA). Placas com ágar Columbia acrescido de 5% de sangue de carneiro e ágar chocolate (Biomicro Ltda., Brasil) foram utilizadas para o cultivo de microrganismos microaerófilos. Placas de ágar tríptico de soja suplementado com soro de cavalo, bacitracina e vancomicina (TSBV) foram utilizadas para o isolamento seletivo de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* segundo Slots¹⁴.

As placas contendo ágar Brucella e KVLB foram incubadas por 7 dias a 35°C sob anaerobiose (BBL GasPak System, Becton-Dickinson, EUA). As placas contendo TSBV, ágar Columbia e ágar chocolate foram incubadas por 7 dias sob atmosfera microaerofílica (BBL CampyPak Plus, Becton-Dickinson, EUA).

Após 7 dias de incubação, colônias com diferentes características foram utilizadas para a realização de diversos testes bioquímicos. Uma a três colônias de cada tipo selecionado foram re-isoladas para identificações posteriores baseado na morfologia celular após coloração de Gram e produção de indol. A atividade de catalase foi testada pela adição de

2 gotas de peróxido de hidrogênio às colônias perfeitamente isoladas. Alguns testes adicionais para a identificação de microrganismos anaeróbios baseados em atividades enzimáticas foram realizados utilizando-se o painel para anaeróbios do sistema MicroScan® (Dade-Behring, EUA).

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as características demográficas dos grupos de pacientes analisados neste estudo: 29 pacientes (média de idade: 47,1 anos) com PA, 6 (média de idade: 25,1 anos) com PJL e 60 (média de idade: 39,3 anos) com PPR. A frequência de detecção e o número de isolados são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Os bacilos anaeróbios Gram negativos e microaerófilos foram as bactérias mais frequentemente detectadas nas amostras de todos os grupos (Tabela 2). *Capnocytophaga sp.* e *Prevotella intermedia* foram as espécies predominantes cultivadas em todos os grupos diagnósticos (Tabela-3). *Porphyromonas gingivalis* foi igualmente isolada das amostras de PA e PPR (6,4% e 5,9%, respectivamente). *Fusobacterium nucleatum* foi detectado com alta frequência tanto nas amostras provenientes de PPR (2,5%) quanto de PJL (2,9%) e de PA (1,3%).

Peptostreptococcus micros teve índices de detecção de 6,3% no grupo com PPR, em contraste com 5,1% de detecção no grupo com PA e 2,9% no grupo com PJL. As outras espécies de *Peptostreptococcus* foram menos frequentemente detectadas nos grupos com PJL e PPR, como mostrado na Tabela 3.

Actinobacillus actinomycetemcomitans foi detectada em amostras de pacientes com PA, PJL e PPR (9%, 11,8% e 5%, respectivamente). *Eikenella corrodens* também foi detectada nas amostras dos três grupos (AP=1,3%, PJL=2,9% e PPR=3,8%), enquanto que os bacilos Gram negativos microaerófilos como *Haemophilus aphrophilus*, *H. parainfluenzae* e *Kingella kingae* foram detectados somente no grupo de pacientes com PPR (2,1%, 1,3% e 0,4%, respectivamente). *Streptococcus intermedius* foi detectado em amostras de todos os grupos (AP=6,4%, PJL=5,9%, PPR=4,2%), bem como *S. constellatus* (AP=1,3%, PJL=5,9%, PPR=0,4%). *S. milleri* foi detectado somente em amostras dos grupos de pacientes com AP e PPR (1,3% e 0,4%, respectivamente), enquanto que *S. salivarius* foi detectada somente em pacientes do grupo com PJL (2,9%). No grupo dos bacilos anaeróbios Gram positivos, *Actinomyces naeslundii* foi a bactéria mais frequentemente detectada (AP=2,6%, PPR=2,9%), seguida por *Eubacterium sp.* e *Actinomyces meyeri* (Tabela 3).

Tabela I
Características demográficas dos pacientes estudados

GRUPO	IDADE (AN OS)	MULHERES	HOMENS
PA	48,4	17	12
PJL	23,3	4	2
PPR	39,3	30	30

PA, periodontite do adulto; PJL, periodontite juvenil localizada; PPR, periodontite de progressão rápida.

Tabela II
Frequência de detecção dos morfotipos bacterianos

	Bacilos Gram negativos anaeróbios	Bacilos Gram positivos anaeróbios	Cocos Gram negativos anaeróbios	Cocos Gram positivos anaeróbios	Bacilos Gram negativos microaerófilos	Cocos Gram positivos microaerófilos
PA	25	7	2	8	29	7
PJL	13	1	-	3	8	5
PPR	82	24	-	32	90	14

PA, periodontite do adulto; PJL, periodontite juvenil localizada; PPR, periodontite de progressão rápida.

Tabela III
Número de isolados e frequência de detecção da microbiota cultivável predominante

	PA n (%)	PJL n (%)	PPR n (%)
ANAERÓBIOS			
Bacilos Gram negativos			
<i>Bacteroides capillosus</i>	1 (1,3)	-	1 (0,4)
<i>Bacteroides gracilis</i>	-	1 (2,9)	-
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	-	-	2 (0,8)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1 (1,3)	1 (2,9)	6 (2,5)
<i>Fusobacterium russi</i>	-	-	2 (0,8)
<i>Fusobacterium varium</i>	-	-	1 (0,4)
<i>Leptotrichia buccalis</i>	-	-	1 (0,4)
<i>Porphyromonas assacharolytica</i>	-	-	2 (0,8)
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	1 (1,3)	2 (5,9)	3 (1,3)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5 (6,4)	-	14 (5,9)
<i>Prevotella buccae</i>	2 (2,6)	2 (5,9)	3 (1,3)
<i>Prevotella buccalis</i>	1 (1,3)	1 (2,9)	1 (0,4)
<i>Prevotella corporis</i>	3 (3,8)	-	3 (1,3)
<i>Prevotella denticola</i>	-	-	3 (1,3)
<i>Prevotella disiens</i>	3 (3,8)	2 (5,9)	4 (1,7)
<i>Prevotella intermedia</i>	8 (10,2)	4 (11,8)	24 (10,1)
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-	-	2 (0,8)
<i>Prevotella oralis</i>	1 (1,3)	-	5 (2,1)
<i>Prevotella oris</i>	1 (1,3)	-	-
<i>Prevotella veroralis</i>	-	1 (0,4)	-
<i>Tissierella preacuta</i>	-	-	5 (2,1)
Bacilos Gram positivos			
<i>Actinomyces israelii</i>	-	-	2 (0,8)
<i>Actinomyces meyeri</i>	-	1 (2,9)	3 (1,3)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	2 (2,6)	-	7 (2,9)
<i>Actinomyces pyogenes</i>	-	-	1 (0,4)
<i>Actinomyces viscosus</i>	-	-	1 (0,4)
<i>Clostridium glycolicum</i>	1 (1,3)	-	1 (0,4)
<i>Clostridium limosum</i>	-	-	1 (0,4)
<i>Clostridium ramosum</i>	-	-	1 (0,4)
<i>Eubacterium spp.</i>	1 (1,3)	-	4 (1,7)
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	1 (1,3)	-	-
<i>Lactobacillus spp.</i>	-	-	2 (0,8)
<i>Propionibacterium propionicus</i>	-	-	1 (0,4)
Cocos Gram negativos			
<i>Veillonella spp.</i>	2 (2,6)	-	-
Cocos Gram positivos			
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	-	1 (2,9)	7 (2,9)
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	4 (5,1)	1 (2,9)	3 (1,3)
<i>Peptostreptococcus micros</i>	4 (5,1)	1 (2,9)	15 (6,3)
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	2 (2,6)	-	6 (2,5)
<i>Peptostreptococcus tetradius</i>	-	-	1 (0,4)
MICROAERÓFILOS			
Bacilos Gram negativos			
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	7 (9,0)	4 (13,3)	12 (5,0)
<i>Capnocytophaga spp.</i>	21 (27,0)	7 (20,6)	60 (25,3)
<i>Eikenella corrodens</i>	1 (1,3)	1 (2,9)	9 (3,8)
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	-	-	5 (2,1)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	-	-	3 (1,3)
<i>Kingella kingae</i>	-	-	1 (0,4)
Cocos Gram positivos			
<i>Streptococcus constellatus</i>	1 (1,3)	2 (5,9)	1 (0,4)
<i>Streptococcus intermedius</i>	5 (6,4)	2 (5,9)	10 (4,2)
<i>Streptococcus milleri</i>	1 (1,3)	-	1 (0,4)
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	1 (0,4)
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	1 (2,9)	-

PA, periodontite do adulto; PJL, periodontite juvenil localizada; PPR, periodontite de progressão rápida.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo confirmam a complexidade da composição microbiana associada com formas distintas de periodontite com a análise da microbiota subgengival, demonstrando a detecção de 50 espécies bacterianas diferentes. Todos os grupos demonstraram um alto índice de detecção de bacilos anaeróbios Gram negativos. Estes morfotipos bacterianos tendem a estar associado com estado de doença ativa.

Prevotella intermedia e *Capnocytophaga sp.* foram detectadas com os maiores índices em todos os três grupos de pacientes com periodontite. Este dado está de acordo com aqueles de Mombelli *et al.*¹², onde *P.intermedia* foi a espécie mais prevalente em um grupo de adultos jovens com

periodontite. Como demonstrado por Conrads *et al.*³, *P.nigrescens* (anteriormente denominada *P.intermedia* genótipo 2) pode ser considerada um marcador para boas condições fisiológicas subgengivais em indivíduos saudáveis, tendo sido detectada em todos os pacientes sem doença periodontal.

Porphyromonas gingivalis é um dos microrganismos mais ativos bioquimicamente associado com periodontites do adulto e também considerado de extrema importância na patogênese de outras formas de periodontite¹⁰. Neste estudo demonstrou-se uma baixa prevalência deste periodontopatógeno em pacientes com PA e PPR. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Dahlen *et al.*⁵, que detectaram *P.gingivalis* com uma prevalência de 11%, usando métodos convencionais de cultivo mas reportaram, ainda, a prevalência de 24% quando usaram técnicas moleculares como a *Polymerase Chain Reaction*. Alguns outros estudos^{11,13,18} demonstraram alta prevalência desta bactéria, sugerindo que as diferenças reportadas são devidas aos diferentes métodos aplicados.

Actinobacillus actinomycetemcomitans e *Eikenella corrodens* foram detectadas em pacientes com PA, PJL e PPR. Há numerosas evidências associando *A.actinomycetemcomitans* com PJL e, em alguns estudos^{1,15,18}, esta bactéria em associação com *E.corrodens* foram encontradas em associação em muitas lesões de PJL.

Os *Streptococcus* também foram detectados em várias amostras. Estas bactérias são consideradas benéficas para o hospedeiro humano e, quando colonizam a bolsa subgengival em altos números, podem retardar o processo periodontal. *Actinomyces naeslundii* e *A.israelii* possuem importante papel no desenvolvimento de gengivites experimentais, mas a inflamação gengival em geral é associada com o aumento da microbiota Gram negativa e não com a presença de espécies de bacilos Gram positivos^{16,20}.

Peptostreptococcus micros é considerado um importante patógeno na etiologia das infecções anaeróbias mistas, incluindo as periodontites. Esta bactéria é isolada mais frequentemente e em grande número em pacientes com periodontite ativa. Os resultados deste trabalho estão de acordo com observações prévias feitas por outros autores^{2,8,11}, sugerindo que *P. micros* deve estar associada com formas avançadas de periodontite. Os periodontopatógenos *Bacteroides forsythus* e *Campylobacter rectus* têm sido associados a lesões progressivas em estudos de perda periodontal avançada¹⁴. É possível que a falha na detecção destes dois microrganismos pode estar na dificuldade de isolamento por métodos tradicionais de cultivo.

Os dados do presente estudo sugerem que há grande heterogeneidade na microbiota subgengival entre os pacientes classificados nos diferentes grupos de periodontite. Métodos de cultivo para o isolamento bacteriano continuam sendo o "padrão-ouro" em microbiologia. Entretanto, como nem todas as bactérias presentes na cavidade oral podem ser cultivadas, é provável que estas bactérias não detectadas possam também ter alguma importância na patogênese das doenças periodontais.

REFERÊNCIAS

1. Armitage G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999;4:1-6.
2. Bascones-Martínez A., Bascones-Ilundain C., Campo Trapero J. Aspectos microbiológicos y control antimicrobiano de las enfermedades periodontales. RCOE 1998;3(7):657-79.
3. Conrads G., Mutters R., Fischer J., Brauner A. PCR reaction and dot-blot

- hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J Periodontol* 1996; 67:994-1003.
4. Dahlen G., Wikström M., Renvert S. et al. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. A 5-year follow-up on individual patterns. *J Periodontol* 1996;67:879-87.
 5. Darby I., Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol* 2000, 2001;26:33-53.
 6. Flemmig T.F. Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4:32-8.
 7. Lindhe J., Hamp S.E., Löe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *Int Dent J* 1973;23:432-7.
 8. Löe H., Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963;21:533-51.
 9. Löe H., Theilade E., Jensen S.B. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-87.
 10. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol* 1999;4:7-19.
 11. Meng H.X. Periodontic-endodontic lesions. *Ann Periodontol* 1999;4:84-90.
 12. Mombelli A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis*;9:6-10.
 13. Slots J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res* 1977; 247-54.
 14. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982; 15:606-9.
 15. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1976; 84:1-10
 16. Slots J. The search for effective, safe and affordable periodontal therapy. *Periodontol* 2000, 2002;28:9-11.
 17. Socransky S.S, Haffajee A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002;28:12-55.
 18. Syed A.S., Loesche W.J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Apl Microbiol* 1972; 24:638-44.
 19. Tonetti M.S., Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4: 39-53.
 20. Trombelli L., Tatakis D.N. Periodontal diseases: current and future indications for local antimicrobial therapy. *Oral Dis* 2003;9:11-5.
-

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva
Rua Lúcio Bacelar, 16/803 – Praia da Costa
CEP: 29101-030 - Vila Velha / ES
carloshenrique@speedup.com.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará