

RIBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

<i>Artigo de revisão</i>	
40	Controle de qualidade em parasitologia clínica - 3094/99 159
	I. Diagnóstico microscópico dos parasitos 159
	<i>Geraldo Attilio de Carli & Osmar Luiz Magalhães de Oliveira</i>
	Quality control in medical parasitology - I. Microscopic diagnosis of the parasites
48	Contribuição para garantia da qualidade na sorologia da sífilis 175
	<i>Jansen Pacheco Nunes; Luiz Fernando de Goes Siqueira</i> 3095/99
	& Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitri
	Contribution about to quality assurance at the syphilis serology
84	Perfil de sensibilidade de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de crianças em creche 183
	<i>Daniela Deitos; Fernanda Magalhães; Viviam Tosta Borges & Carlos Alberto Granjo</i> 3096/99
	Susceptibility profile of <i>S. aureus</i> strains isolated from children in a day nursery
88	Avaliação das alterações hematológicas e imunológicas em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana 187
	<i>Maja Freire Veloso; Caio Augusto Santos Rodrigues; Valeria Soraya de Farias Sales; Eugênio França do Rego; Aldair de Souza Paiva; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior</i> 3097/99
	Evaluation of the hematological and immunological alteration in individuals infected with the human immunodeficiency virus
89	Aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de anemia falciforme 195
	<i>Rezende de Andrade, Sandra; Dantas de Brito, Gilena; Barbosa Calado, Nicácia; Passos Marcos, Christiane Maria; Serafim, Edvis Santos Soares & Macêdo, Syrlei Rodrigues</i>
	Red blood cell alloimmunization in sickle cell anemia patients
46	Identificação de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Isospora belli</i> em pacientes HIV positivo com diarreia 199
	<i>Ana Elizabete Nogueira Moreira Vasconcelos, Carlos Eurico Jataí Freitas & Maria de Fátima Oliveira</i> 3098/99
	Identification of <i>Cryptosporidium</i> and <i>Isospora belli</i> in patients HIV positive with diarrhoea
<i>Artigo de revisão</i>	
82	Aspectos morfológicos das hemoglobinopatias 201
	<i>Coelho, E. A. F. & Carvalho, M. G.</i>
	Morphological aspects of hemoglobinopathies
41	Relação entre enteroparasitoses, região ungueal e mãos contaminadas, em crianças e adolescentes da Instituição Filantrópica de Marília 205
	<i>Gatti, L. L.; Santos, C. V. & Lima, W. P.</i> 3101/99
	Relationship between intestinal parasites, nail region and contaminated hands in children and adolescents from the Instituição Filantrópica de Marília
49	Análise citológica do líquido pleural no Hospital Universitário de Florianópolis 207
	<i>Haas, P.; Tenconi, P.; Veit, M. R. & Steinwandter, S. T.</i> 3102/99
	Cytologic analysis of the pleural fluid at the University Hospital of Florianópolis
92	Um método simples e rápido para a quantificação de galactose em soro e urina 211
	<i>Eurico Camargo Neto</i> 3103/99
	A simple and rapid method for the measurement of galactose in serum and urine
63	Estudo dos níveis de colesterol total e frações e triglicerídios nos indivíduos da terceira idade praticantes e não praticantes de atividades físicas 213
	<i>Aloísio Luiz Benedetti & Tânia Bertoldo Benedetti</i> 3104/99
	Levels' study from total cholesterol and its fractions and triglyceride in old aged persons who practise or not physical exercise
49	Determinação de ferritina: plasma ou soro? 217
	<i>Guerra-Shinohara, Elvira M.; Ruvieri, Valter; Santos, Hosana G.; Paiva, Rosângela P.; Nuñez, Luz-Marina; Szar-Farc, Sophia C. & Vaz, Adelaide J.</i> 3105/99
	Ferritin determination: plasma or serum?

4

ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME

RED BLOOD CELL ALLOIMMUNIZATION IN SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

Rezende de Andrade, Sandra ⁽¹⁾ ; Dantas de Brito, Gilena ⁽²⁾ ; Barbosa Calado, Nicácia ⁽²⁾ ; Passos Marcos, Christiane Maria ⁽³⁾ ; Serafim, Édvis Santos Soares ⁽⁴⁾; Macêdo, Syrlei Rodrigues ⁽⁵⁾.

(1) Professor Adjunto IV da Disciplina de Hematologia Aplicada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; (2) Aluna do XI Período de Graduação do Curso de Farmácia - Modalidade Análises Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; (3) Aluna do X Período de Graduação do Curso de Farmácia - Modalidade Análises Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; (4) Médica Hematologista do Hospital Infantil VarelaSantiago; (5) Médica Hematologista e Hemoterapeuta do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte - HEMONORTE.

RESUMO

A anemia falciforme é uma doença hereditária na qual as moléculas de hemoglobina estão geneticamente alteradas. Ocorre quando o indivíduo herda o gene **S** para a hemoglobina e esta herança é homozigótica, ou seja, **Hb SS**. O defeito genético é devido à uma mutação no cromossomo **11** que constitui basicamente na substituição do ácido glutâmico pela valina na posição **6** do segmento **A** da cadeia polipeptídica beta. Os pacientes com anemia falciforme, têm crises dolorosas pelos microinfartos decorrentes do afoiçamento *in vivo*, têm suscetibilidade aumentada às infecções e têm significativa diminuição de sobrevida. O tratamento das complicações é feito principalmente com hidratação por via oral e/ou endovenosa, manutenção da boa diurese e o combate à acidose e, quando este não resolve, faz-se necessário a transfusão sangüínea expondo o paciente à diversas situações indesejáveis como a aloimunização provocada pela exposição do paciente à diferentes antígenos eritrocitários causando a produção de anticorpos específicos contra estes antígenos. O presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos eritrocitários irregulares em pacientes portadores de anemia falciforme. Foram testados 31 soros de pacientes do HEMONORTE e Hospital Infantil Varela Santiago (H.I.V.S.) com idades variando entre 01 e 47 anos, no período de março de 1998 a fevereiro de 1999. Estes soros foram testados pelo gel teste centrifugação LISS/COOMBS para a pesquisa de anticorpo irregular (P.A.I.) e, quando positivo, utilizou-se para a identificação do anticorpo irregular (I.A.I.), o painel de hemácias em 02 meios: LISS/COOMBS e PAPAÍNA. A prevalência do anticorpo irregular foi de 3,2% (**anti-S**), concluindo-se que este baixo índice encontrado pode ter sido devido a pouca idade dos pacientes (maioria jovens) e a realização de um tratamento baseado na hidratação, no combate a dor e na oxigenoterapia evitando-se ao máximo as transfusões.

Palavras Chaves: Aloimunização eritrocitária, Anemia Falciforme

ABSTRACT

The sickle cell anemia is an hereditary disease in which hemoglobin molecules are genetically impaired. It happens when the subject inherits the **S** gene for hemoglobin and this is a homozygotic inheritance, that is, **Hb SS**. The genetic disturbance is due to a mutation in cromossome 11 which is composed mostly in the replacement of glutamic acid for valine at position 6 of the β -polipeptides chain segment. Sickle cell anaemia patients have painful crises because of micro heart strokes caused by the sickle effect *in vivo*, have an increased likelihood for infections and present a marked decrease of lifetime. Management of the disorders is mainly administered with oral and/or endovenous hydration, maintenance of good diuresis and acidosis attack, and when this is useless, it is necessary to carry out a blood transfusion which exposes the patient to several unpleasant situations, such as the alloimmunization provoked by the patient's exposition to different erythrocytic antigens. This causes the production of specific antibodies against these antigens. The purpose of this study was to determine the incidence of irregular erythrocytic antibodies in sickle cell anemia patients. Thirtyone serums of patients from HEMONORTE and Varela Santiago Child Hospital at ages varying from 01 to 47, within the period of march 1998 and february 1999 were tested. These serums were tested by the use of Centrifugation Gel Test LISS/COOMBS for the search of irregular antibody, and when it was positive, the two-medium red blood cell panel was used for the Identification of Irregular Antibody: LISS/ COOMBS and PAPAÍNA. The irregular antibody incidence was 3,2% (**anti-S**). It was concluded that this low rate might have been found because of patient's young age (mostly youths) and the conduction of a treatment based on hydration, pain killing and oxygentherapy, thereby avoiding transfusions most of the time.

Key Words: Red Blood Cell Alloimmunization, Sickle Cell Anemia

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias por hemoglobinas anormais, constituem uma das mais freqüentes doenças genéticas que acometem o homem. As formas homozigóticas dessas doenças determinam manifestações clínicas importantes desde os primeiros anos de vida. Resultam em atividade física e produtividade limitadas, representam sobrecarga econômica e emocional para as famílias, elevados custos para os serviços de saúde e têm uma significativa redução da esperança de vida .

No Brasil acredita-se que a contínua miscigenação tenha facilitado a propagação das hemoglobinas anormais.

A **Hb S**, característica das desordens falciformes, é o resultado de uma mutação que ocorre no gene regulador da seqüência de aminoácidos que formam a cadeia globínica beta. Na posição **6** desta cadeia, o aminoácido, ácido glutâmico é substituído pela valina. Esta mutação faz com que a **Hb S** formada, apresente características físicas e químicas diferentes da **Hb A** que, em determinadas condições, resultarão no processo de falcização.

A anemia falciforme representa a forma mais grave das doenças falciformes. Seu diagnóstico precoce e adequada terapia são fundamentais na redução da sua morbidade e mortalidade devendo ser distingüida de uma doença mais branda denominada traço falcêmico (estigma falciforme), no qual o indivíduo recebe o gene anormal para a hemoglobina de apenas um dos genitores.

É importante conhecer a fisiopatologia da anemia falciforme, suas principais manifestações clínicas e seus fatores de risco a fim de que se evite um dos maiores problemas para esses pacientes que recebem transfusões sangüíneas, a aloimunização. – NAOUM, 1997.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 31 amostras de sangue obtidas de pacientes portadores de anemia falciforme vinculados ao Hospital Infantil Varela Santiago (H.I.V.S.) e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte - HEMONORTE. Estas amostras foram coletadas por punção venosa e colocadas em frascos sem anticoagulante e com anticoagulante (EDTA na proporção de 1mg/ mL de sangue).

A triagem sérica para anticorpos irregulares tem como objetivo detectar a presença de anticorpos irregulares em pacientes com anemia falciforme que serão submetidos a transfusões sangüíneas. Quando detectamos a presença desses anticorpos, se faz necessário a sua identificação. O método utilizado para a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (P.A.I.), foi o gel teste centrifugação LISS-COOMBS, utilizando dois tipos de hemácias fenotipadas (ID-DiaCell I-II para teste de Coombs), e para a Identificação de Anticorpos Irregulares (I.A.I.), utilizou-se o painel de hemácias em dois meios : LISS/COOMBS (ID-DiaPainel para testes de Coombs e aglutininas frias) e PAPAÍNA (ID-DiaPainel papainizado para teste enzimático). Além disso, incluiu-se para o presente trabalho um teste de Coombs Direto e um Auto-Controle. O sangue utilizado para o teste de Coombs Direto foi colhido com EDTA, pois nas amostras de sangue coagulado pode haver ligação com anticorpos frios ou complemento aos glóbulos do paciente *in vitro*, levando a uma interpretação errônea do resultado deste teste. A inclusão de um auto-controle permitiu diferenciar os auto-anticorpos dos aloanticorpos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo analisar a prevalência de aloimunização em 31 pacientes portadores de anemia falciforme, cujas amostras sanguíneas foram coletadas no Hospital Infantil Varela Santiago e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte - HEMONORTE, no período compreendido entre março de 1998 e fevereiro de 1999.

Tabela 1: Prevalência de aloimunização eritrocitária em pacientes falcêmicos atendidos no HEMONORTE e Hospital Infantil Varela Santiago (HIVS) no período de março 1998 a fevereiro de 1999.

TIPO DE CASO	NÚMERO DE PACIENTES	
	VALOR ABSOLUTO	VALOR RELATIVO
CASOS POSITIVOS	1	3,2%
CASOS NEGATIVOS	30	96,8%
TOTAL	31	100%

Fonte: Laboratório de Imunohematologia do HEMONORTE

Observou-se durante o período estudado, de acordo com a tabela 1, que apenas um paciente apresentou anticorpo irregular (prevalência de 3,2%), identificado como **anti-S** - utilizando-se a técnica do gel teste centrifugação LISS/COOMBS e PAPAÍNA, justificando-se assim a aloimunização.

A especificidade da aloimunização pelo **anti-S** foi confirmada através da deleção do anticorpo pelo tratamento das hemácias fenotipadas com papaína (técnica do gel teste centrifugação - PAPAÍNA), uma vez que reconhecidamente essa enzima destrói os sítios antigênicos do sistema MNS presentes na membrana eritrocitária.

Atualmente, conhece-se muitos antígenos do sistema MNS, os quais são altamente heterogêneos e de importância incontestável em transfusões. O antígeno **S** pode ser responsável por aloimunizações, no entanto é muito menos imunogênico que os antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd. Os anticorpos formados contra os antígenos **S** são aloanticorpos da classe IgG, ativos a 37°C e pouco freqüentes; são capazes de causar reações

transfusionalis e Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN), sendo de suma importância então que se faça sua detecção e identificação.

Atualmente, em relação ao tratamento, tem-se evitado a realização de transfusões sanguíneas devido à exposição do paciente a múltiplos doadores aumentando assim os fatores de risco, como: aloimunização a antígenos eritrocitários, complicações decorrentes da deposição excessiva de ferro (hemocromatose) e principalmente ao risco de contaminação por doenças transmissíveis pelo sangue, quando levamos em consideração a “janela imunológica” existente em diversas patologias, dentre elas a AIDS. O tratamento tem sido puramente de suporte, baseado na hidratação, no combate a dor e na oxigenoterapia. A hidratação e a oxigenoterapia tem por finalidade evitar que a hemácia que contém a **Hb S** se polimerize e forme a deoxi-hemoglobina, impedindo assim a sua falcização.

Estudos realizados por Coles et al (1981) em 99 pacientes portadores de anemia falciforme apresentaram 23% de aloimunização. Em estudos similares, realizados por Orlina et al (1978) e Moreira et al (1993) foram encontradas prevalências de 36% e 12,9% respectivamente ⁽⁵⁾. Em comparação com esses dados e os referentes ao nosso estudo, acreditamos que a prevalência de aloimunização vem diminuindo com o tempo principalmente devido à mudança de conduta no tratamento utilizado, onde se tem analisado o risco/benefício das transfusões sanguíneas como medida terapêutica. Não podemos deixar de ressaltar a pouca idade dos pacientes em estudo (a grande maioria constituída de jovens menores de 15 anos - 83,9% - tabela 2), onde o número de transfusões, acredita-se terem sido reduzidas.

Tabela 2 : Faixa etária dos pacientes falcêmicos atendidos no HEMONORTE e Hospital Infantil Varela Santiago (HIVS) no período de março de 1998 a fevereiro de 1999.

IDADE (ANOS)	FREQUÊNCIA (%)
00 - 05	19,3
06 - 10	32,3
11 - 15	32,3
16 - 20	6,5
21 - 25	6,5
Acima de 25	3,1

Fonte: Laboratório de Imunohematologia do HEMONORTE e H.I.V.S.

CONCLUSÃO

Apesar de se conhecer que a anemia falciforme é uma anemia hemolítica hereditária severa em que os pacientes necessitam ser transfundidos, existe hoje uma mudança na conduta terapêutica desses pacientes, evitando a transfusão, diminuindo assim o risco da **aloimunização**, hemocromatose e exposição a agentes infecciosos. O tratamento tem se baseado principalmente na hidratação venosa e oral, no combate às infecções e na oxigenoterapia. Com base nessas informações e na pouca idade dos pacientes estudados, podemos justificar a baixa prevalência (3,2%) de aloimunização nesta pesquisa e certamente concluir que o tratamento realizado tem sido de primordial importância para se evitar esta reação adversa à transfusão sanguínea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ALBUQUERQUE, Lúcia Marinho Medeiros de et al. Técnicas laboratoriais de hematologia e imuno-hematologia. Natal: Cooperativa Cultural, 1992. 186 p.(Manual)
- 2-ANDRADE, Sandra Rezende de et al. Freqüência de anticorpos eritrocitários irregulares em pacientes politransfundidos portadores de insuficiência renal crônica atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte-HEMONORTE. Tema Livre apresentado no XVI Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia de 04 à 08/11/97 em Belo Horizonte-MG.
- 3-ARAÚJO, Aderson da Silva et al. Doença falciforme. São Paulo: Marjan, [A.d.]. 17 p.
- 4-BEUTLER, Ernest; LICHTMAN, Marshall A.; COLLER, Barry S.; KIPPS, Thomas J. Williams Hematology. USA, fifth edition,1668 p.
- 5-FONSECA, Henrique Eduardo Macedo. Prevalência e especificidade de anticorpos eritrocitários em pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento hemodialítico. São Paulo, 1995. 76 p. Tese (Mestrado em Hematologia-Hemoterapia)-Escola Paulista de Medicina,Universidade Federal de São Paulo,1995.
- 6-HAYHOE, F. G. J.; FLEMANS, R. J. Atlas Colorido de Citologia Hematológica. Ed Artmed, 3 ed. 1998. 384 p.
- 7-LEHNINGER, Albert L. Princípios da Bioquímica. São Paulo, Ed.. Sarvier,1993. 725 p.
- 8-LORENZI, Therezinha F. Manual de Hematologia-Procedência e Clínica. São Paulo: Medsi, [A.d.]. 492 p.
- 9-MANUAL de técnicas. Belo Horizonte: DiaMed Brasil,1994. 50 p.

- 10-MOREIRA Jr G. et al. Antígenos e aloanticorpos eritrocitários em doença falciforme. São Paulo, ano 1, n.2, p.36, jul./set.1991.
- 11-NAOUM, Paulo Cesar; DOMINGOS, Claudia Regina Bonini. Hemoglobinas S (HbS) e as síndromes falcêmicas. In: NAOUM, Paulo Cesar. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier,1997. Cap.8, p.36-47.
- 12-NAZARIAN, Cristiane F. et al. Aloanticorpos identificados em pesquisa de parturientes em rotina pré-estabelecidas. Boletim. Rio de Janeiro: v.16, n.165, p.117, jan./abr.1994.
- 13-NUKUI, Youko et al. Aloimunização pós-transfusional em pacientes com anemia falciforme politransfundidos. Rio de Janeiro: v.16, n.165, p.146, jan./abr.1994.
- 14-OLIVEIRA, Halley P. Hematologia Clínica . Rio de Janeiro : Ed. Atheneu, 3 ed., 1988. 609 p.
- 15-OLIVEIRA, Maria do Carmo V. C. et al. Detecção de anticorpos irregulares: garantia de segurança transfusional. Rio de Janeiro: v.16, n.165, p.120, jan./abr.1994.
- 16-OLIVEIRA, Maria do Carmo V. C. et tal. Frequência de anticorpos e antígenos eritrocitários em pacientes talassêmicos e falcêmicos cadastrados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE. Rio de Janeiro: v.16, n.165, p.120, jan./abr.1994.
- 17-OLIVEIRA, Maria do Carmo V. C.; GOES, Sônia Maria Pires Meira. Práticas em Imunohematologia Eritrocitária. São Paulo: Ed. MEDSI, 267 p, 1999.
- 18-PERINA, Eliana F. et al. Frequência de anticorpos em pacientes sensibilizados com anemia falciforme segundo o grupo racial. Rio de Janeiro: v.16, n.165, p.118, jan./abr.1994.

- 19-PERINA, Eliana F. et al. Freqüência de aloimunização em pacientes laboratoriais. Rio de Janeiro: v.16, n.165, p.119, jan./abr.1994.
- 20-RAPAPORT, Samuel I. Introdução à Hematologia. São Paulo: Ed. Roca, 1990. 450 p.
- 21-RAVEL, Richard. Laboratório Clínico- Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, ed. Sexta. 626 p.
- 22-REID, Clarice D. Management and Therapy of sickle cell disease. Referência disponível na Internet. <http://www.hscbklyn.edu/SUNY/Research/PSCP/mgmtss.htm>

“Análise citológica do líquido pleural no Hospital Universitário de Florianópolis”.

^aHaas,P., ^bTenconi,P., ^bVeit, M.R., ^cSteinwandter, S.T

“Cytologic analysis of the pleural fluid at the University Hospital of Florianópolis”.

ABSTRACT: The pleura is a cavity separating the lungs from the internal part of the thoracic wall, coated with a serous membrane and with a visceral and a parietal division. Separating these membranes is the pleural fluid, working as a lubricant for the free movement of lungs in the volume exchanges which happen during respiration. This fluid is an ultra-filtered from plasma, colorless and relatively acellular under normal conditions. In the present research the authors sought to evaluate only the cytologic exams, to compare results with those from a review of references. The work, such as developed, covered the period from March of 1997 to February of 1999, with a total of 141 exams conducted. We observed a predominance of pleural fluid analyses on male patients (41%), to be followed by 36% on females. As to the cell type (differential cytology), neutrophils, mononucleates, mesothelial cells, and eosinophils were present in superior numbers between 1 and 10% of the total of fluids (neutrophils/40, mononucleates/39, mesothelial cells/50, eosinophils/16 cells per number of exams conducteds, respectively). From an analysis of global cytology, erythrocytes/mm³ presented their higher index between 1.001 - 10.001 erythrocytes/mm³ (46%), considering normal values. Quite above normal values mentioned on literature, we have the nucleated cells/mm³, between 1.001 - 10.001 nucleated cells/mm³ (38%). To arrive to conclusive data, we should continue with the follow-up of cytologic analyses.

Key words: Pleural fluid; serous cavities; cytology.

RESUMO: A pleura consiste de uma cavidade que separa o pulmão e a porção interior da parede torácica, é revestida por uma membrana serosa com uma divisão visceral e outra parietal. Separando estas membranas, está o líquido pleural, o qual serve como um lubrificante para o livre movimento dos pulmões para as trocas de volume que apresentam durante a respiração. Este líquido é um ultrafiltrado do plasma, incolor e relativamente acelular em condições normais. Nesta pesquisa em particular, tivemos como objetivo, avaliar apenas os exames citológicos e comparar estes resultados com a revisão bibliográfica. O trabalho desenvolvido, compreendeu o período de março de 1997 a fevereiro de 1999, no total de 141 exames verificados. Observamos um predomínio de análises do líquido pleural em pacientes do sexo masculino (41%), seguido de 36% de pacientes do sexo feminino. Quanto ao tipo celular (citologia diferencial), considerando neutrófilos, mononucleares, células mesoteliais e eosinófilos, foi na faixa de 1 a 10% do total dos líquidos que as mesmas apareceram em números superiores ao relatado na literatura (neutrófilos/40, mononucleares/39, células mesoteliais/50, eosinófilos/16, célula/número de exames respectivamente). Ao verificarmos a citologia global, as hemácias/mm³, apresentaram o seu maior índice entre 1.001-10.001 hem/ mm³ (46%), considerando-se valores normais. Acima dos valores normais citados na literatura, temos as células nucleadas/ mm³, entre 1.001- 10.001 células nucleadas/ mm³ (38%). Para dados conclusivos, deveríamos continuar o acompanhamento das análises citológicas.

Palavras chave: líquido pleural, citologia, cavidade pleural.

- ^a Professora de citologia Clínica - Departamento Análises Clínicas/UFSC
^b Acadêmicas do curso de Farmácia - Bioquímica / UFSC
^c Bioquímica do setor de hematologia / Hospital Universitário de Florianópolis

INTRODUÇÃO

A pleura (direita e esquerda) consiste de um espaço entre o pulmão e a porção interna da parede torácica (7). É revestida por uma membrana serosa com uma divisão visceral e outra parietal. Essa membrana é formada por uma camada simples de células mesoteliais com microvilosidades e é mais densa no lado visceral da pleura (8).

A pleura parietal recobre a superfície da parede torácica, do diafragma e do mediastino. É suprida com sangue da circulação sistêmica e contém nervos sensoriais (13).

A pleura visceral é a camada que recobre a superfície total dos pulmões, incluindo as fissuras interlobares. Seu suprimento sanguíneo origina-se da circulação pulmonar de baixa pressão, não tem nervos sensoriais e suas células tem um número menor de microvilosidades (13).

Separando estas duas membranas está o líquido pleural que serve como lubrificante para o livre movimento dos pulmões para as trocas de volume que apresentam durante a respiração (2). Essa lubrificação é reforçada pela face das células mesoteliais que tem uma espessa superfície de microvilosidades, rico ácido hialurônico e glicoproteínas. Sem as células mesoteliais, o pulmão não poderia funcionar corretamente e a cavidade pleural seria rapidamente obliterada por fibrose (12).

O líquido pleural, um ultrafiltrado do plasma, incolor e relativamente acelular (2). É produzido pela pleura parietal e absorvido pela pleura visceral como um processo contínuo. Esse processo ocorre através do endotélio capilar, à uma velocidade controlada pela pressão capilar, pressão osmótica do plasma e permeabilidade capilar (5).

O excesso de líquido, proteínas e células na cavidade pleural são removidas através

de aberturas ou estomas existentes somente na superfície parietal do baixo mediastino, da porção baixa da parede torácica e do diafragma (9,11,12). Esses orifícios e lacunas desembocam em vasos linfáticos. A quantidade normal de líquido está entre 5 a 20mL, possui uma baixa concentração de proteínas ($< 2\text{g/dL}$), com um pH e um nível de glicose similares àqueles do sangue (13).

O edema é uma acumulação patológica de líquido no espaço intercelular (11). Desenvolve-se quando há excesso de formação do líquido pleural (pela pleura parietal, espaço intersticial do pulmão, ou a cavidade peritoneal) ou quando há diminuição da remoção do líquido pelos vasos linfáticos (3). Essas alterações podem ser provocadas por certos mecanismos tais como:

1. Aumento da pressão hidrostática arterial: a formação é maior que a reabsorção e pode ser causada por fatores físicos como o calor.
2. Aumento da pressão hidrostática venosa: esse processo provoca redução na reabsorção normal e ocorre em situações de insuficiência cardíaca congestiva.
3. Diminuição da pressão oncótica das proteínas do plasma.
4. Aumento da permeabilidade capilar ocasionada por bactérias (edema inflamatório), substâncias tóxicas, agentes químicos, físicos e outros.
5. Retenção primária de sódio e água.

O líquido de derrame na cavidade pleural, é obtido por punção pleural com agulha (toracocentese). A toracocentese pode ser realizada com propósito diagnóstico ou terapêutico. É diagnóstico em cerca de 75% dos pacientes, e mesmo quando não é diagnóstica, ajuda a excluir outros diagnósticos importantes, como empiema (13). Todo derrame com causa não determinada por procedimentos clínicos ou radiológicos deve ser examinado por toracocentese tomando-se como base os dados clínicos (2). Os derrames com volume maior que 10 mL são acessíveis a toracocentese simples.

As contra-indicações para esse exame não são absolutas, mas ocorrem em casos de

anticoagulação, ventilação mecânica, derrames pequenos, relação risco/benefício diminuído e diátese hemorrágica. As complicações em geral incluem ansiedade e dor local. Mais especificamente pode ocorrer pneumotórax, líquido contaminado com sangue, empiema, punccionamento de outros órgãos, hipóxia e edema pulmonar unilateral.

A toracocentese traz como benefício o alívio da dispnéia com terapêutica leve, via redução do tamanho da parede torácica, embora ocorra hipoxímia (10).

Deve-se aspirar pelo menos 50 mL de líquido e distribuí-lo em 4 tubos para os seguintes ensaios: **1.** Bacteriológico (inclusive fungos e bactérias anaeróbicas); **2.** Citológico (tubo citratado ou heparinizado); **3.** Bioquímico; **4.** Pesquisa de células neoplásicas (5,8). O líquido deve ser examinado logo depois de colhido, o mais tardar até uma hora após a colheita (6).

O estudo do líquido é de grande importância diagnóstica na distinção entre um exsudato e um transudato (8). O edema transudativo ocorre quando fatores sistêmicos que influenciam a formação e absorção do líquido pleural estão alterados e exsudativo, quando fatores locais que influenciam estes processos estiverem alterados (3).

O líquido transudativo caracteriza-se por sua cor amarelo clara ou amarelo esverdeado, podendo ser límpido, ligeiramente turvo ou opalescente (6). Densidade menor que 1,016, não se coagula e raramente apresenta bactérias (6,8).

O exsudato caracteriza-se por um aumento na permeabilidade vascular com consequente presença de grande quantidade de proteínas (5,10). Dentre estas proteínas presentes está o fibrinogênio, o qual precipitará como fibrina formando coágulos no líquido exsudativo (5,11). Devido estas e outras características possui densidade maior que 1,016 (8).

A diferenciação portanto se faz pelos caracteres físicos, químicos, citológicos e

bacteriológicos. Esta diferenciação é quase sempre fácil, mas em alguns casos é necessário ter também em vista a evolução clínica do processo (6). A tabela abaixo apresenta os caracteres necessários a serem analisados.

Tabela 1 - Diagnóstico do derrame pleural transudativo *versus* exsudativo.

	Transudato	Exsudato
Aspecto	geralmente límpido	variável (purulento, hemorrágico)
Odor	inodoro	variável
Cor	amarelo claro	variável
Coagulação	ausente	frequente
Densidade	< 1,016	> 1,016
Proteína	< 3g/dL	> 3g /dL
LDH ^A	< 200 UI/L	> 200 UI/L
Relação proteína pleural/soro	< 0,5	> 0,5
Relação LDH pleural/soro	< 0,6	> 0,6
Causas comuns	insuficiência cardíaca congestiva ^B , síndrome nefrótica, hipoproteinemia, cirrose hepática, insuficiência renal crônica.	Pneumonia ^B , tuberculose, abscessos pulmonares, malignidade (obstrução linfática), malignidade pulmonar, infecção fúngica e viral, pleuresia, linfoma, mesotelioma pleural.

^A: desidrogenase láctica

^B: causas mais comuns

Fonte: BISHOP, M.L. *et al*, 1996; LIMA.A.D. *et al*, 1992; MILLER, O., 1995.

O citodiagnóstico é feito com o auxílio da contagem global e diferencial das células no líquido.

As contagens de células vermelhas tem pouco valor no diagnóstico diferencial. Porém, uma contagem de células vermelhas e um hematócrito fornecem dados úteis para líquidos que aparecem macroscopicamente sanguinolentos (5). O aspecto soro-hemático do líquido pleural sugere neoplasia, embolia pulmonar ou trauma (4). Nesses casos deve ser levado em consideração as possibilidades de punção traumática.

Existindo suspeita de neoplasia, muito especialmente se o líquido for hemorrágico, ele será examinado também histologicamente para pesquisa de células tumorais (8). O diagnóstico citológico de malignidade é altamente específico, sendo raro o falso-positivo. Pelo menos 25 a 50 mL do líquido devem ser retirados para avaliação, adicionando-se uma pequena quantidade de heparina, para se evitar coagulação (4).

A punção deve ser repetida quando necessário, mas é importante salientar que a repetição pode alterar alguns elementos do líquido, especialmente proteínas, leucócitos, eritrócitos, podendo sugerir um processo inflamatório inespecífico secundário à punções repetidas.

A biópsia pleural percutânea , é um exame indicado na avaliação do paciente com derrame exsudativo sem diagnóstico, especialmente linfocítico, porque as doenças mais diagnosticadas são as neoplasias e a tuberculose (3). É contra-indicado em casos de espaço pleural obliterado, anticoagulação, paciente não cooperativo, ou diátese hemorrágica, incluindo axotemia com tempo de sangramento anormal (13,10). As complicações são similares às apresentadas na toracentese. A positividade diagnóstica, de forma geral, está em torno de 60% para neoplasias malignas e 75% para tuberculose (13). A biópsia é realizada com o paciente sob anestesia local, usando uma agulha tipo gancho. A toracentese e a biópsia pleural confirmam a malignidade em 80% a 90% dos derrames.

A sintomatologia depende, geralmente da quantidade de líquido e de sua natureza. É causada por inflamação da pleura, compromisso da mobilidade respiratória e interferência com o intercâmbio gasoso (2).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL: registros do setor de hematologia do laboratório do Hospital Universitário, hospital onde foi desenvolvido o trabalho, localizado na cidade de Florianópolis. Os registros avaliados foram de pacientes internados neste hospital no período de março de 1997 a fevereiro de 1999 num total de 141 exames.

MÉTODO: foi realizado inicialmente uma seleção de registros de análise citológica do líquido pleural. Nos registros, obtivemos as seguintes informações: sexo, citologia global (células nucleadas e hemácias), citologia diferencial (neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e células mesoteliais).

A revisão bibliográfica sobre o líquido pleural no referido período de 1986 a 1998, foi realizada na Biblioteca do Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina e MEDLINE.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O objetivo deste trabalho foi de avaliação citológica (global e diferencial) de resultados de exames do Líquido Pleural, no laboratório de Hematologia do Hospital Universitário de Florianópolis. Foram avaliados 141 exames de pacientes internados no período de março de 1997 a fevereiro de 1999. A avaliação deteve-se ao diagnóstico citológico, não envolvendo outros diagnósticos laboratoriais.

Na avaliação dos dados coletados, observou-se um predomínio (41%) do sexo masculino em relação ao feminino que apresentou-se em 36% dos 141 exames, seguido de 23% ignorados, ou seja, não constava o sexo no arquivo do setor, (gráfico 1).

Em relação às contagens globais das células nucleadas (leucócitos e células mesoteliais), observou-se que 51% dos exames apresentaram valores dentro dos limites normais, conforme estabelecido na literatura. Tem sido usadas as contagens dos leucócitos na distinção dos transudatos dos exsudatos, baseado num limite de 1000 células/mm³ (4,5,6), (gráfico 2).

Devido às contagens de hemácias, frequentemente apresentarem resultados duvidosos, é preferível realizar o hematócrito do líquido. Quando maior que 1% (contagem de hemácias geralmente > 100.000mm³), é significativo (4,5). Nos dados coletados constava somente o número de hemácias, não havendo a relação com o hematócrito. Os resultados quanto ao número de hemácias apresentaram-se 100% dentro dos valores normais de referência, (gráfico 3).

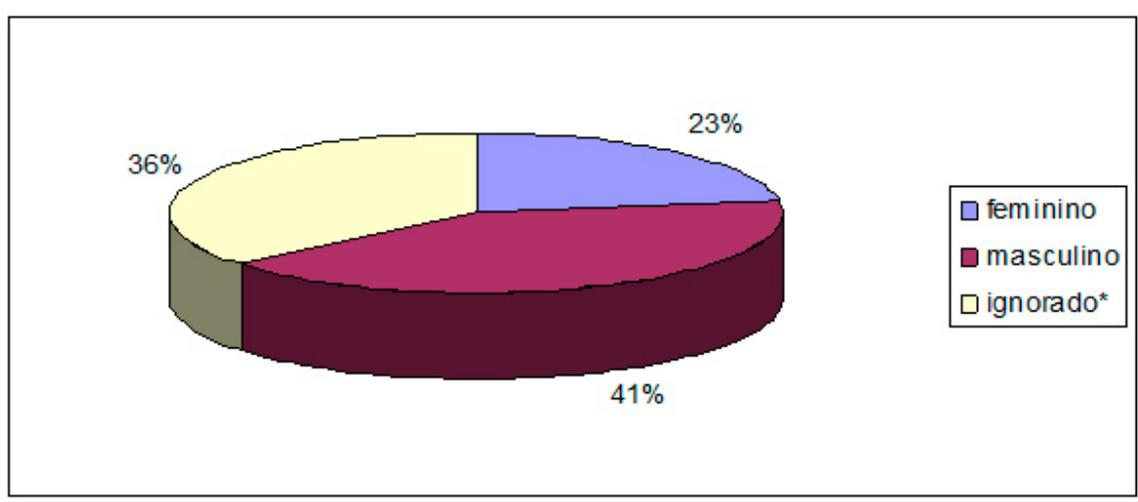


Gráfico 3 – Sexo dos pacientes para análise do líquido pleural no período de março/97 a fevereiro/99.

* Não constava no arquivo do setor.

Nas contagens diferenciais, foi observado que os neutrófilos, na porcentagem de 1-10%, predominaram em 40 dos 141 exames avaliados. Os linfócitos apresentaram-se em predomínio em 48 dos 141 exames, em uma porcentagem de 11-30%. Os eosinófilos não foram observados na maioria dos exames avaliados (123 exames). Um predomínio de

neutrófilos é relatado em aproximadamente 90% de efusões causadas por inflamação aguda, já que este é o componente celular da resposta inflamatória aguda (4,5,6). Isso ocorre devido a pneumonias, enfarto pulmonar e pancreatites (4,5).

A presença de linfocitose no derrame pleural é compatível com o diagnóstico de tuberculose (4,5,6). Na fase aguda dos derrames tuberculosos no entanto, pode haver predominância de neutrófilos (4).

Faz-se oportuno colocar que para uma avaliação segura dos líquidos e um possível diagnóstico, todos os resultados de análises devem ser avaliados.

Um estudo mais prolongado, acompanhando o paciente, seria recomendado para podermos avaliar a relação citológica *versus* clínica.

AGRADECIMENTOS: ao setor de hematologia do Hospital Universitário de Florianópolis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BISHOP, M. L.; DUBEN-ENGELKIRK, J. L.; FODY, E. P. - Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations. 3 th. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1996, 478 - 479 p.
2. DERRAME PLEURAL. Causas, fisiopatología y concideraciones pronósticas. www.redmedica.com.mx/medicina/derrame.
3. FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E. B.; ISSELBACHER, K. J.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; KASPER, D L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.- Harrison's Principles of Internal Medicine. 14 th, International Edition, 1998, 1472-1473 p. V.1.
4. GUIMARÃES, R. X.; GUERRA, C. C. C. - Clínica e Laboratório: Interpretação Clínica das Provas Laboratoriais. 4^a ed. São Paulo, Sarvier Editora, 1990, 559-561 p.
5. HENRY, J. B. - Diagnósticos Clínicos & Tratamentos por Métodos Laboratoriais. 18^a ed. New York, Manole Ltda, 1995, 536-538 p.
6. LIMA, A .D.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R.. Métodos de Laboratórios Aplicados à Clínica Técnica e Interpretação. 7^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992, 9-1 e 9-2 p.
7. MACKENZIE, S. B. - Textbook of Hematology. 2 th. Editora: Willians & Wilkinis,

1996, 450 e 454 p.

8. MILLER, O .- Laboratório para o Clínico. 8^a ed. São Paulo: Atheneu, , 1995, 163-164 p.

9. PRICE, S. A. A .; WILSON, L. M. - Pathophysiology Clinical Concepts of Disease Processes. 3 th. Editora: MacGraw Hill, 1986, 84 p.

10. THE PLEURA IN HEALTH AND DISEASE.
www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/medicine/pulmonar.

11. TRASTORNOS CIRCULATORIOS. Edema. Escuela.med.puc.cl/publicaciones.

12. WANG, N.S. - Anatomy of the pleura. Clin Chest Med, 19 (2): 229-40,1998.

13. WYNGAARDEN, J. B.; SMITH Jr, L, H.; BENNETT, J. C. - Tratado de Medicina Interna. 19^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993, 752-754 p. V.1.

Aspectos morfológicos das hemoglobinopatias.

Morphological aspects of the hemoglobinopathies.

COELHO, E.A.F. & CARVALHO, M.G.

RESUMO – Com referência ao diagnóstico das hemoglobinopatias, o laboratório clínico assume grande importância desde que uma hematoscopia sugestiva no hemograma pode orientar o médico para a solicitação de exames mais específicos, notadamente, a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, melhor método de rotina para a confirmação de uma suspeita. Como as alterações da molécula de hemoglobina no estado heterozigótico são bastante frequentes no Brasil, o que favorece o aparecimento de casos homozigóticos com anemia grave, procurou-se neste trabalho realizar um levantamento dos achados morfológicos mais importantes correlacionando-os com os diversos tipos de hemoglobinopatias, objetivando oferecer um subsídio potencialmente capaz de auxiliar no diagnóstico de tais doenças. Finalmente, um diagnóstico correto é de grande valor considerando-se não apenas a necessidade de se evitar tratamentos errôneos e gastos desnecessários, bem como propiciar ao paciente uma melhoria na sua qualidade de vida.

PALAVRAS-CHAVE – Hemoglobinopatias, hemoglobina, hemograma.

SUMMARY – Concerning to the diagnosis of the hemoglobinopathies, it's of great value the role of the clinical laboratory since that a suggesting hematoscopy from the hemogram may lead the physician to ask more specific blood tests, namely, the hemoglobin electrophoresis in pH 8,6, the best routine method to confirm a clinical suspicion. As the alterations of the hemoglobin molecule in the heterozygous forms are frequent in Brazil, which favors the appearance of homozygous patients with severe anemia, it was intended in this work to perform a survey of the morphological more important findings and correlating them with the many hemoglobinopathies. The aim of this work was to provide a theoretical grasp for contributing to the diagnosis of such diseases, through the morphological aspects. A correct diagnosis is of great relevance considering not only the need to prevent erroneous treatment and unnecessary expenses, but also for proving to the patients improvement related to the their life quality.

KEY WORDS – Hemoglobinopathies, hemoglobin, hemogram.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Lab. de Hematologia, sala 608. Faculdade de Farmácia da UFMG

Endereço para correspondência: Av. Olegário Maciel, 2360, Bairro de Lourdes. CEP.: 30.180-112. Belo Horizonte – MG

INTRODUÇÃO

Os distúrbios hereditários da molécula de hemoglobina são as doenças genéticas mais frequentes no homem e mais difundidas no mundo, constituindo um problema de saúde pública.¹ Já foram identificadas numerosas variantes da molécula de hemoglobina, as quais podem causar fenômenos fisiopatológicos importantes e quadro clínico por vezes graves, principalmente nas formas homozigóticas, delas destacando-se as hemoglobinas S e C. Não menos graves, as síndromes talassêmicas também podem constituir quadro patológico importante.²

No passado, as hemoglobinas S e C eram encontradas quase que exclusivamente na população negra, enquanto que as talassemias predominavam em povos de origem mediterrânea. Com o passar do tempo, sucessivas imigrações e emigrações entre as diversas populações no mundo permitiram a miscigenação entre as raças, o que possibilitou intercâmbios culturais entre os povos e o afluxo de fatores genéticos associados. A vasta heterogeneidade genética da população brasileira favoreceu o aparecimento de variantes da molécula de hemoglobina associadas em um mesmo

indivíduo, bem como a presença da hemoglobina S em homozigose em pessoas fenotipicamente brancas.³ Acredita-se assim que a frequência de indivíduos com hemoglobinopatias e de portadores saudáveis em nossa população seja bastante significativa, a julgar pelos dados encontrados por CARVALHO e cols. (1994), os quais observaram uma frequência de 4,7% de portadores de hemoglobinas variantes (AS e AC) em doadores aptos e de 6,7% em doadores inaptos, do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (Hemominas).⁴

O diagnóstico das hemoglobinopatias reveste-se pois de grande importância, tendo em vista essa alteração ter atingido diversos segmentos sociais e étnicos de nossa população. Além do mais, o diagnóstico possibilita uma melhor qualidade de vida ao paciente, já que tratamentos sintomáticos e aconselhamento genético devem fazer parte da rotina de acompanhamento desses pacientes.

Uma hematoscopia sugestiva de hemoglobinopatia no hemograma é um dado extremamente valioso e deve ser obrigatoriamente relatado pelo analista clínico, considerando-se que esse achado acarretará a execução do método da eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, através do qual a suspeita poderá ser confirmada.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS PRINCIPAIS HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinas S e C são as hemoglobinas variantes mais encontradas no homem e que levam às alterações clínico-laboratoriais mais significativas, quando em homozigose. De uma forma geral, os principais tipos de hemoglobinopatias são: SS, CC; as síndromes talassêmicas, α -talassemia e β -talassemia em suas quatro formas – maior, intermédia, menor e mínima, além das associações entre SC, Hb S/ α -talassemia e Hb S/ β -talassemia.

A presença de Hb S, em homozigose, é causa da anemia falciforme ou drepanocitose, resultando em anemia intensa com hipocromia discreta, hemoglobina (Hb), hematócrito (Hto) e hemácias (Hm) com valores diminuídos e índices hematimétricos freqüentemente normocíticos e normocrômicos por compensação; a Hb se encontra entre 6 a 9 gramas por decilitro (g/dL) em indivíduos compensados, que pode chegar a 3 g/dL em pacientes em crise; há poiquilocitose com freqüentes hemácias falcizadas irreversivelmente (0,5 a 20%, ou até 30%), hemácias em alvo, esquisócitos, ovalócitos, micrócitos e alguns esferócitos. Existem eritroblastos circulantes, predominantemente nas formas policromatófilas e ortocromáticas; presença de inclusões nos eritrócitos, dos tipos anel de Cabot, corpúsculos de Howell-Jolly e pontilhado basófilo; há intensa policromatofilia nos casos de crise reticulocitária. Em indivíduos sem crise, a contagem de reticulócitos pode variar de 8 a 12% (com alcance de 5 a 30%). Em pacientes em crise, a contagem pode chegar a 80% de reticulócitos, indicando uma velocidade de produção da série vermelha acelerada por parte da medula óssea. A leucocitose com discreto desvio à esquerda pode também estar presente, bem como um discreto aumento do número de plaquetas.^{5, 6, 18} A ocorrência de trombocitopenia pode estar associada à coagulação intravascular disseminada. O ferro sérico e a ferritina são encontrados em níveis aumentados.¹⁹

Os indivíduos com Hb C em homozigose apresentam anemia hemolítica crônica leve ou moderada, Hb entre 9 a 12 g/dL, reticulocitose de 7 a 8%; intensa poiquilocitose com a presença abundante de hemácias em alvo (~90%) e alguns esferócitos; uma população de células pequenas e distorcidas, bem como células que lembram as formas de hemácias “dobradas”, produto da cristalização da hemoglobina anormal. Leucocitose discreta às vezes pode estar presente. A hemoglobina C dá teste de falcização negativo.^{9, 10, 19}

Nos casos de α -talassemia, em que há deleção de três genes constituindo a forma mais sintomática compatível com a vida (Doença de Hb H), ocorre uma anemia hemolítica microcítica e hipocrômica, variações de Hb entre 8 a 12 g/dl, volume corpuscular médio (VCM) de 60 a 70 femtolitros (fl), discreta reticulocitose (5 até 10%), presença de eritroblastos circulantes, discreta leucocitose, poiquilocitose com a presença de hemácias em alvo e ovalócitos; inclusões de pontilhado

basófilo e corpúsculos de Howell-Jolly podem ser vistas. O diagnóstico laboratorial é firmado pela presença de corpos de Hb H, ou “bolas de golfe”, com a coloração do azul de cresil brilhante, bem como pela eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, a qual mostrará uma fração de migração rápida, com concentração entre 5 a 20%. As outras formas de α -talassemia, nas quais há deleção de 1 ou 2 genes, geralmente o quadro é assintomático ou com anemia leve e, sob o ponto de vista morfológico, as hemácias podem se apresentar discretamente microcíticas e hipocrômicas. Os indivíduos com deleção de 4 genes não sobrevivem e morrem por hidropisia fetal. Nos casos onde há deleção de apenas 1 gene, os corpos de Hb H são encontrados raramente, enquanto que nos casos com deleção de 2 ou 3 genes podem-se observar esses corpos em maior número, especialmente no último caso, quando são abundantes. A eletroforese de hemoglobina em pH alcalino não apresenta boa sensibilidade para os casos de deleção de 1 ou 2 genes.^{5, 11, 12, 13}

Com relação às β -talassemias, o quadro abaixo vem ilustrar as principais alterações encontradas em suas quatro formas.

Tabela 1 – Classificação clínica das β talassemias.

	Talassemia			
	Maior	Intermédia	Menor	Mínima
Hemoglobina (g/dl)	<7	7 – 10	10 – 13	>13
Reticulócitos (%)	2 – 15	2 – 10	2 – 5	0,5 – 2
Eritroblastos	+++	++/+	–	–
Eritrócitos alterados	+++	++	+	+/-
Icterícia	++	+/-	–	–
Esplenomegalia	+++	++	+/-	–
Alterações esqueléticas	+++/>++	++/>+	–	–
Necessidade de transfusões	+++	+/-	–	–

< menor que; > maior que; + intensidade; – ausência.

Fonte – Eletroforese: técnicas e diagnósticos. Naoum, 1990.¹⁴

O diagnóstico laboratorial é firmado pela eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, que mostrará uma fração substancial de hemoglobina fetal nos casos das β -talassemias intermédia e maior. Já nos casos das β -talassemias menor e mínima, os níveis de hemoglobina fetal não excedem geralmente a 5%, enquanto que os níveis de hemoglobina A₂ oscilam geralmente entre 3,5 a 10,0 %.

Entre as associações, a Hemoglobinopatia SC, bem freqüente, caracteriza-se por discreta anemia normocítica e normocrômica, valores de Hb entre 10 a 12 g/dL, raros eritroblastos circulantes, ligeira reticulocitose acarretando discreta policromatofilia; poiquilocitose com a presença abundante de hemácias em alvo (até 85%), presença ocasional de hemácias falcizadas e de esferócitos. O teste de falcização é positivo.^{5, 15, 16}

Na associação Hb S/ β -talassemia maior, clinicamente semelhante à drepanocitose, há hipocromia e microcitose, VCM e hemoglobina corpuscular média (HCM) estão diminuídos, a Hb se encontra entre 5 a 10 g/dL, há poiquilocitose com algumas hemácias falcizadas e muitas hemácias em alvo. A pesquisa de drepanócitos é positiva.¹⁷ Na forma Hb S/ β -talassemia intermédia, os valores de Hb abrangem de 7 a 10 g/dL, hemácias falcizadas podem ser vistas e a contagem de reticulócitos se apresenta freqüentemente normal. Na associação Hb S/ β -talassemia menor a anemia está ausente ou pode existir na forma de moderada e os índices VCM e HCM estão diminuídos.⁵ Cabe ressaltar que a interação entre Hb S/ α -

talassemia produz microcitose e hipocromia, porém, essa associação tende a reduzir a severidade das crises falcêmicas, pela redução da concentração da Hb S nas células.¹⁸

PORTADORES DE HEMOGLOBINAS VARIANTES

Os portadores de hemoglobinas variantes apresentam principalmente as hemoglobinas S e C. Os indivíduos AS e AC não exibem alterações laboratoriais significativas e geralmente levam uma vida normal. O indivíduo AS, com estigma falciforme ou traço falciforme, tem prova de falcização positiva e pode apresentar algumas hemácias em alvo. O indivíduo AC, também assintomático, pode apresentar até 40% de hemácias em alvo e possui fragilidade osmótica reduzida.⁷ Em ambos os casos, o aconselhamento genético é muito importante, pois suas futuras gerações podem chegar a apresentar genótipos SS, CC ou SC, geralmente de maior expressão em termos de sintomatologia, em casos de casamentos entre indivíduos AS e AS; AC e AC; e AS e AC, respectivamente.⁸

COMENTÁRIOS GERAIS

Para um diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatia, uma hematoscopia minuciosa e correta é de suma relevância para orientar o médico para solicitar o exame adequado para se confirmar a suspeita clínica.

A eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, como já citado, responde pela quase totalidade dos diagnósticos dos pacientes com hemoglobinopatias e portadores de hemoglobinas variantes. Porém, apesar de se tratar de uma técnica simples e de baixo custo, não é muito difundida entre os laboratórios devido a ausência de padrões estáveis de hemoglobinas variantes, que facilitariam a interpretação do perfil eletroforético permitindo uma maior segurança ao analista clínico, notadamente, em relação às hemoglobinas S e C.

A hematoscopia é altamente relevante pois fornece dados sugestivos de hemoglobinopatia, constituindo-se pois em uma ferramenta imprescindível para auxiliar o médico quanto ao diagnóstico de tais doenças. Portanto, para facilitar um diagnóstico correto dentro do menor prazo possível, o analista clínico deve ter em mente as principais alterações morfológicas encontradas nas diversas hemoglobinopatias, além de acesso fácil ao material adequado para consultas, caso houver necessidade.

Diante do exposto acima, um diagnóstico laboratorial correto de hemoglobinopatia credita eficiência e qualidade ao Laboratório de Análises Clínicas, possibilitando ao clínico agilidade no que se refere às medidas profiláticas para as infecções e outras medidas que certamente resultarão em significativa melhora na qualidade de vida dos pacientes envolvidos, além de propiciar aos mesmos o devido aconselhamento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tavares-Neto, J.; Naoum, P.C.; Adorno, J.; Azevêdo, P.; Brito, F.; Caldas, M.; Couto, M.; Costa, K.; Martinelli, C.; Gonzalez, A.; Assad, A.; Mortoza, L.; Reis, F.; Silva, M.M.C.; Silva, P.; Vieira, M. Hemoglobinopatias no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 19, n. 1, p. 13 – 19, 1986.
2. Falcão, R.P.; Donadi, E.A. Infecções e imunidade na doença falciforme. *Rev. Ass. Med. Bras.*, v. 35, n. 2, p. 70 – 73,

1989.

3. **Zago, M.A.** Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. *Rev. Paul. Med.*, v. 104, n. 6, p. 300 – 304, 1986.
4. **Carvalho, M.G.; Souza, M.O.; Silva, M.B.S.; Oliveira, J.M.C.; Cardoso, I.C.R.A.; Carvalho, I.P.; Santos, C.M.F.R.; Oliveira, H.M.; Lopes, M.S.S.N.; Lira, L.R.** Hemoglobinas anormais: perfil estatístico em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. *Rev. Bras. Anál. Clín.*, v. 26, n. 2, p. 39 – 40, 1994.
5. **Naoum, P.C.** *Diagnóstico das hemoglobinopatias*. São Paulo: Sarvier, 1987. 242 p.
6. **Rapaport, S.I.** Hemoglobinopatias e síndromes talassêmicas. In: Rapaport, S.I. (Ed.) *Hematologia – introdução*. São Paulo: Roca, 2. ed., 1990. p. 61 – 84.
7. **Eastham, R.D.; Slade, R.R.** Haemoglobin and its disorders. In: Eastham, R.D.; Slade, R.R. (Ed.) *Clinical haematology*. Oxford: Editora Butterworth Heinemann Ltda., 7. ed., 1992. p. 68 – 82.
8. **Ramalho, A.S.** *As hemoglobinopatias hereditárias – Um problema de Saúde Pública no Brasil*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1986. 160 p.
9. **Rapaport, S.I.** Hemoglobinopatias e síndromes talassêmicas. In: Rapaport, S.I. (Ed.) *Introdução à hematologia*. São Paulo: Harbra, 1978. p.54 – 71.
10. **Failace, R.** Anemias hemolíticas. In: Failace, R. (Ed.) *Hemograma – manual de interpretação*. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 3. ed., 1995. p. 86 – 101.
11. **Le Crone, C.N.** Anemia of abnormal globin development – Thalassemias. In: Lotspeich-Steininger, C.A.; Stiene-Martim, E.A.; Koepke, J.A. (Ed.) *Clinical hematology – principles, procedures, correlations*. Philadelphia: Editora J.B. Lippincott Company, 1992. p. 212 – 230.
12. **Verrastro, T.** Principais tipos clínicos de anemias. In: Verrastro, T.; Lorenzi, T.F.; Wendel Neto, S. (Ed.) *Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 51 – 74.
13. **Saleem, A.; Irani, D.R.; Bart, J.B.; Alfrey Jr., C.P.** Suppression of hemoglobin H in disorders of iron metabolism. *Acta haemat.*, v. 77, n. 4931, p. 34 – 37, 1987.
14. **Naoum, P.C.** Hemoglobinopatias. In: Naoum, P.C. (Ed.) *Eletroforese: técnicas e diagnósticos*. São Paulo: Santos, 1. ed., 1990. p. 65 – 115.
15. **Besa, E.C.** Hemoglobin and hemoglobinopathies. In: Besa, E.C.; Catalano, P.M.; Kant, J.A.; Jefferies, L.C. (Ed.) *hematology*. Maryland: Editora Williams & Wilkins, 1992. p. 123 – 136.

- 16.Silva, P.H.; Pivatto, I.; Ronchi Jr., I.** Hemoglobinopatia SC: diagnóstico laboratorial e aconselhamento genético – A propósito de um caso. *Rev. Bras. Anál. Clín.*, v. 29, n. 2, p. 46 – 48, 1997.
- 17.Ravel, R.** Anemias por depleção. In: Ravel, R. (Ed.) *Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 6. ed., 1997. p. 36 – 49.
- 18.Lorenzi, T.F.** Anemias – hemoglobinopatias. In: Lorenzi, T.F. (Ed.) *Manual de hematologia - Propedêutica e clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 1999. p. 283 – 309.
- 19. Silva, P.H.; Hashimoto, Y.** Anemias microcíticas e hipocrômicas - Hemoglobinopatias. In: Silva, P.H.; Hashimoto, Y. (Ed.) *Interpretação laboratorial do eritrograma - texto e atlas*. São Paulo: Editora LOVISE Ltda., 1999. p. 75 - 88.

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E
IMUNOLÓGICAS EM INDIVÍDUOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (*)**

**EVALUATION OF THE HEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL
ALTERATION IN INDIVIDUALS INFECTED WITH THE HUMAM
IMMUNODEFICIENCY VIRUS (*)**

Maja Freire Veloso ⁽¹⁾; Caio Augusto Santos Rodrigues ⁽¹⁾; Valeria Soraya de Farias Sales ⁽²⁾; Eugênio França do Rego ⁽³⁾; Aldair de Souza Paiva ⁽⁴⁾; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca ⁽⁴⁾; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva ⁽⁵⁾; Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior ⁽⁶⁾.

(*) 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, habilitação de Farmacêutico-Bioquímico / Analista Clínico.

(1) Graduandos do Curso de Farmácia, Habilitação de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN; (2) Prof. Adjunto da Disciplina de Imunologia Clínica do Curso de Farmácia do DACT/UFRN; (3) Médico Infectologista do Hospital Gizeuda Trigueiro de Natal - RN; (4) Médicos Oncologistas do Instituto de Onco-Hematologia de Natal (IOHN), (5) Bolsista de iniciação científica da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT/UFRN; (6) Prof. Assistente da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT/UFRN

Endereço para correspondência: *Prof. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior.*

Disciplina de Imunologia Clínica - DACT, Faculdade de Farmácia - CCS / UFRN.

Rua Gal Gustavo Cordeiro de Farias S/N, Petrópolis , Natal-RN.

E-mail: gbcj@ufrnet.br.

Resumo:

Várias alterações hematológicas estão presentes em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo que a incidência de citopenias parecem aumentar com a progressão da doença. Dentre as principais alterações, destaca-se a diminuição progressiva do número de linfócitos no sangue periférico, principalmente da subpopulação T helper (CD3+/CD4+), levando esses indivíduos a um quadro de imunodeficiência celular. Objetivando investigar as principais alterações imunológicas e hematológicas em indivíduos infectados pelo HIV, foram analisadas amostras de sangue periférico de 100 indivíduos soropositivos para o HIV (60 homens e 40 mulheres), procurando correlacionar os níveis de linfócitos TCD4 com os diversos parâmetros hematológicos tais como a leucometria, contagem de linfócitos, contagem de plaquetas e dosagem de hemoglobina. Os parâmetros hematológicos foram determinados por analisadores hematológicos e a subpopulação linfocitária pela citometria de fluxo após marcação dos mesmos com anticorpos monoclonais específicos. Os resultados demonstraram que 25% dos casos apresentaram contagem de linfócitos TCD4 $\geq 500/\text{mm}^3$, em 55% dos casos a contagem esteve entre 499 e $200/\text{mm}^3$, e inferior a $200/\text{mm}^3$ em 30% dos casos. Correlacionando os níveis dos linfócitos TCD4 com as alterações hematológicas, observou-se que a linfopenia mostrou-se mais acentuada no grupo de indivíduos cujas contagens de células TCD4 estavam inferiores que $200/\text{mm}^3$, correspondendo a 18% dos casos. A contagem de plaquetas mostrou-se dentro dos limites de normalidade na maioria dos casos, a trombocitopenia entretanto, esteve presente em 29% dos casos, dos quais 20% apresentaram níveis de linfócitos TCD4 menores que $200/\text{mm}^3$. A anemia por sua vez esteve presente em 20% das mulheres e em 50 % dos homens, correlacionando mais com baixas contagens de linfócitos TCD4. Com estes dados, concluímos que os valores da contagem de linfócitos TCD4 de certo modo correlacionou-se com as variações do quadro hematológico, apresentado na maioria dos casos citopenias tais como a anemia, a trombocitopenia e a linfopenia, mostrando a importância destes exames no acompanhamento de indivíduos infectados pelo HIV.

Palavras Chaves: Alterações Hematológicas e Imunológicas, Vírus da imunodeficiência Humana, Linfócitos T CD4+.

Summary:

Several hematological alterations are present in individuals infected with the *human immunodeficiency virus* (HIV), in these individuals, the incidence of cytopenias seems to increase with the progression of the infection. Among the main alterations stand out the progressive decrease of lymphocytes number in the peripheral blood, mainly of the T helper lymphocyte (CD3+/CD4+) subpopulation, taking these individuals to a cellular immunodeficiency. The objective of this study is to investigate the hematological and immunological alteration in individuals infected with the HIV. They were analyzed samples of peripheral blood of 100 individuals seroreactive for HIV (60 men and 40 women) search to the levels of TCD4 lymphocyte with the several hematological parameters such as the white leucogram, platelet count and hemoglobin determination. The hematological parameters was accomplished by hematological analyzers and the subpopulation of lymphocytes by the flow cytometry after demarcation of the monoclonal antibodies. The results demonstrated that 25% of the cases presented the count of TCD4 lymphocyte $\geq 500 / \text{mm}^3$. In 55% of the cases the count of this lymphocytes was between 499 and $200 / \text{mm}^3$, and inferior to $200 / \text{mm}^3$ in 30% of the cases. Correlating the levels of the TCD4 lymphocytes with hematological alterations, it was observed that the lymphopenia was shown more accentuated in the individuals group with number of TCD4 cells smaller than $200 / \text{mm}^3$, corresponding to 18% of the cases. The platelet count was shown inside in most of the cases of the normality limits. The thrombocytopenia however was present in 29% of the cases, from which 20% presented in TCD4 lymphocytes levels inferior to $200 / \text{mm}^3$. The anemia, was observed in 20% of the women and in 50% of the men, correlating more cases with low levels of TCD4 lymphocytes. With these data, we concluded that the values of the count of TCD4 lymphocyte in a certain way were correlated with the hematological alterations, presented in most of the cases cytopenias such as anemia, throbocytopenia and lymphopenia, showing the importance of these exams in the management of individuals infected by HIV.

Key words: Hematological and Immunological Alteration, Humam Immunodeficiency Virus, TCD4 lymphocyte.

INTRODUÇÃO:

Além dos distúrbios do sistema imunológico, várias são as alterações hematológicas relacionadas com a infecção pelo *vírus da imunodeficiência humana* (HIV), sendo as citopenias comumente observadas, juntamente com a inversão da relação CD4/CD8 que tendem a aumentar com a progressão da doença. Estes achados, correlacionam-se na maioria dos casos com baixos níveis sanguíneos de linfócitos T auxiliares / indutores (TCD4), podendo estas anormalidades hematológicas serem constatadas em qualquer fase da infecção, as quais envolvem a medula óssea, elementos celulares do sangue periférico bem como constituintes da coagulação sanguínea ⁽¹⁻⁷⁾.

A enumeração da subpopulação de linfócitos T (CD4 e CD8) tem sido útil no acompanhamento dos indivíduos infectados antes e após o desenvolvimento dos sintomas da doença, havendo em particular um significativo valor preditivo na contagem absoluta de linfócitos TCD4 e progressão da doença nos indivíduos soropositivos ⁽⁶⁾.

Embora as causas destas alterações hematológicas ainda permaneçam mal definidas, atribui-se às mesmas efeito citopático do próprio HIV, hematopoiese ineficaz, infiltração da medula óssea por agentes infecciosos, neoplasias, desregulação da resposta imune, deficiências nutricionais e efeito colateral de medicamentos ⁽³⁻⁷⁾.

Apesar das alterações hematológicas não constituírem os principais problemas em indivíduos infectados pelo HIV, elas ocorrem com elevada frequência no decorrer da doença, reduzindo a qualidade de vida bem como limitando o emprego de medicação antiretroviral, contra infecções oportunistas e anti neoplásicas ⁽⁶⁾.

O objetivo deste trabalho foi de investigar as alterações hematológicas e imunológicas em indivíduos portadores do HIV, procurando correlacionar os níveis sanguíneos da contagem de linfócitos TCD4 com os parâmetros hematológicos tais como a contagem global e específica de leucócitos, plaquetometria e anemia determinada pela dosagem de hemoglobina.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA:

Casuística:

Foram analisados 100 indivíduos de ambos os sexos (60 homens e 40 mulheres) com idade variando entre 20 a 70 anos, com sorologia positiva para o *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV). Destes indivíduos, foi coletado sangue periférico por punção venosa em tubos do tipo vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetraacético dissódico (EDTA-Na₂) para posterior análise hematológica e imunológica.

Metodologia:

Para realização dos exames hematológicos utilizou-se o analisador hematológico CELL-DYN - 3000 (ABBOTT).

A avaliação da subpopulação linfocitária foi realizada utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais (AcMo) duplamente marcados com fluorocromos e com especificidade para subpopulação linfocitária todos da *Becton & Dickinson* (quadro 01).

A técnica da imunofenotipagem foi a da marcação direta de linfócitos com AcMo em sangue total, seguida pela destruição dos eritrócitos pela solução de lise (*Lysing Solution - Becton & Dickinson*). Desta forma, 100 µl (microlitros) de sangue total previamente homogeneizado foi incubado com 20µl de AcMo por 30 minutos ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Após este período, a suspensão celular foi novamente homogeneizada e sobre a mesma, adicionada 2 ml (mililitros) de solução de lise a 10% e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz.

Após este período, a suspensão celular foi novamente homogeneizada e em seguida, centrifugada à 1.500 rotações por minutos (rpm) durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH=7.2) e novamente centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos, sendo esta última etapa realizada mais uma

vez. Após a lavagem das células, o sedimento foi então ressuspenso em 1 ml de formaldeído a 1% em PBS. Este procedimento é importante pois fixa o anticorpo na célula alvo, preservando o material para uma posterior análise, devendo para isto acondicionar o material sob refrigeração e protegido da luz até o momento da análise.

Para cada caso, utilizou-se um controle isotípico negativo no qual empregou-se uma imunoglobulina inespecífica conjugada a fluorocromos (*gama 1_{FICT} / gama 2_{PE} - Becton & Dickinson*).

A análise foi realizada em citometro de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Analyser - FACS-can da Becton Dickinson, San-Jose, Ca, USA*), utilizando-se o programa *Lysys II*, com aquisição de 10.000 eventos, levando-se em conta os parâmetros *Forward Scatter* (FSC) em escala linear que avalia o tamanho celular, *Side Scatter* (SSC) também em escala linear, o qual avalia a complexidade e/ou granulosidade celular assim como o FL1 e FL2 em escala logarítmica que detectam a fluorescência verde e laranja ou seja a reação antígeno/anticorpo conjugado ao FICT e PE respectivamente.

Os resultados foram fornecidos em forma de histogramas do tipo “*dot-plot*”, ideal para observação da expressão de anticorpos duplamente marcados, conforme podemos visualizar nas figuras 02 e 03, com demonstração do percentual de células positivas ou negativas.

Para posterior conversão em valores absolutos o percentual de células positivas foi então multiplicado pelo número absoluto de linfócitos e dividido por 100 conforme uma regra de três simples.

Para estudo da correlação entre a contagem de linfócitos TCD4 com os diversos parâmetros hematológicos, foram calculados valores mínimos, máximos e medianas. Para análise estatística das variáveis em estudo, foi empregado o método não paramétrico do *qui quadrado* (χ^2), onde utilizou-se os valores observados e esperados, para constatação se as discrepâncias foram significativas ou não.

RESULTADOS:

Da população analisada em ambos os sexos, a faixa etária mais acometida pela infecção foi de 30 a 40 anos, seguida pela compreendida entre 20 a 30 anos (figura 01).

Dados gerais sobre os grupos de indivíduos analisados encontram-se resumidos na tabela 1, constando das seguintes variáveis: idade, sexo, leucometria e fórmula leucocitária (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos), contagem de plaquetas, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, além da subpopulação linfocitária constituída por linfócitos B (CD19+), linfócitos T (CD3+) e subpopulação T periférica representada pelos linfócitos T auxiliares / indutores (CD3+/CD4+) e linfócitos T supressor / citotóxico (CD3+/CD8+), com representação dos valores máximo, mínimo e mediana encontrados.

As tabelas 2 e 3 mostram os valores da contagem de linfócitos CD3+/CD4+ em homens e mulheres respectivamente, bem como a correlação da variação destes valores e fórmula leucocitária com respectivas análises estatísticas determinada pelo teste do *qui-quadrado*.

Nos indivíduos do sexo masculino, a leucopenia foi observada em 38,3% dos casos e nas mulheres em 52,5 %. A linfopenia por sua vez foi constatada em 30% dos homens e em 35% das mulheres, tendo sido observada nestes casos uma correlação direta entre estas alterações hematológicas e baixas contagens de linfócitos TCD4 na maioria dos casos. Assim sendo, nos homens, a correlação entre leucopenia e contagens de linfócitos TCD4 foi observada com a seguinte distribuição de acordo com a contagem de linfócitos TCD4 no sangue periférico: 1 indivíduo (1,7%) apresentando contagem de linfócitos TCD4 maior que $500/\text{mm}^3$, 8 casos (13,3%) com níveis de linfócitos TCD4 variando entre 200 e $499/\text{mm}^3$ e 14 casos (23,3%) apresentando níveis destas células inferiores a $200/\text{mm}^3$. Nas mulheres, foi constatada a mesma tendência, segundo os mesmos critérios dos indivíduos do sexo masculino, ou seja:

3 casos (7,5%) com níveis de linfócitos TCD4 superior a $500/\text{mm}^3$, 12 casos (30%) com contagem destas células variando entre 200 e $500/\text{mm}^3$ e em 6 casos (15%) estes linfócitos apresentavam contagens inferiores a $200/\text{mm}^3$.

Em contrapartida, a leucocitose e/ou a contagem de leucócitos dentro dos limites de normalidade, estiveram mais presentes em indivíduos com contagens mais elevadas de linfócitos TCD4 em ambos os sexos.

Em relação a linfopenia (contagem de linfócitos menor que $1.500/\text{mm}^3$), observou-se nos homens a seguinte distribuição: 6 casos (10%) apresentaram contagem de linfócitos TCD4 variando entre 200 e $500/\text{mm}^3$ e 12 casos (20%) tinham níveis destas células inferior a $200/\text{mm}^3$. Nas mulheres por sua vez, constatou-se que a linfopenia estava presente em 8 casos (20%). Destas, a contagem de linfócitos TCD4 variou entre 200 e $500/\text{mm}^3$ e em 6 casos (15%) o nível destas células T mostraram-se inferiores a $200/\text{mm}^3$. É interessante observar a ausência de linfopenia nos indivíduos cuja contagem dos linfócitos TCD4 mostrou-se maior que $500/\text{mm}^3$ em indivíduos de ambos os sexos, sugerindo nestes casos uma melhor condição clínico laboratorial destes pacientes.

A neutropenia (contagem de neutrófilos menor que $2.200/\text{mm}^3$) mostrou-se presente em 27 casos (45%) nos homens e em 15 casos (37,5%) nas mulheres. Observou-se nestes casos também uma correlação entre neutropenia e baixos níveis de linfócitos TCD4 na maioria dos casos. Desta forma, 10 casos (16,7%) de indivíduos neutropenicos do sexo masculino apresentaram contagem de linfócitos TCD4 oscilando entre 200 a $499/\text{mm}^3$ e 15 casos (25%) mostrando contagem destes linfócitos inferior a $200/\text{mm}^3$. Nas mulheres que apresentaram neutropenia em seu hemograma, observou-se correlação entre esta alteração hematológica e contagem de linfócitos TCD4 oscilando entre 200 e $499/\text{mm}^3$ em 7 casos (17,5%) e inferior a $200/\text{mm}^3$ em 3 casos (7,5%).

Nos outros subtipos de leucócitos (monócitos, eosinófilos e basófilos) não observou-se correlação estatisticamente significativa entre variação da contagem destas células e níveis de linfócitos TCD4 na maioria dos casos (Tabelas 2 e 3).

A anemia, segundo alguns relatos é uma característica marcante em indivíduos infectados pelo HIV, a qual se torna mais severa com a evolução da doença, com queda progressiva dos níveis de hemoglobina e hematócrito ⁽¹⁻⁴⁾.

No presente trabalho, constatou-se que níveis de hemoglobina inferiores aos limites de normalidade estavam mais presentes em indivíduos com contagem de linfócitos TCD4 inferior a $200/\text{mm}^3$ na maioria dos casos em ambos os sexos, estando estas correlações estatisticamente significativas (ao nível de 5%), determinadas pelo teste do *qui quadrado*.

A trombocitopenia (contagem de plaquetas inferior a $150.000/\text{mm}^3$) tem sido um achado freqüentemente observado em indivíduos infectados pelo HIV, podendo esta alteração hematológica apresentar-se na fase assintomática ou antes do surgimento de outras citopenias ⁽⁴⁾.

Neste estudo, esta alteração hematológica foi constatada em 33 casos (26 homens e 7 mulheres), estando mais presente nos indivíduos com baixas contagens de linfócitos TCD4 no sangue periférico. Desta forma, nos homens 31,7% dos casos apresentaram contagens destes linfócitos menores que $200/\text{mm}^3$, 10% dos casos variando entre 200 a $499/\text{mm}^3$ e 1,7% dos casos apresentaram contagem destes linfócitos maior que $500/\text{mm}^3$. No grupo de mulheres, constatou-se a mesma tendência ou seja, a trombocitopenia esteve mais freqüente em indivíduos com baixos níveis de linfócitos TCD4. O teste do *qui quadrado* mostrou significativo (a nível de 5%) a correlação entre contagem de plaquetas e níveis de desta subpopulação linfocitária na população estudada.

DISCUSSÃO:

Grande parte dos pacientes infectados pelo HIV desenvolvem citopenias que em geral se mostram mais acentuadas nos estágios mais avançados da infecção ou durante a instalação de terapia antiretroviral ⁽¹⁻⁹⁾.

Nestes indivíduos, a medula óssea costuma ser hiper celular, apesar da citopenia periférica. Outras alterações encontradas na medula óssea incluem ainda a presença de discrasias, pleiocitose, deseritropoiese a qual mostra-se acompanhada de alterações megaloblásticas e hipoplasia eritróide ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Os megacariócitos freqüentemente encontram-se em número aumentado, predominando os micromegacariócitos, podendo também ser observado a presença de elementos hipersegmentados ou multinucleados que, histologicamente, podem estar agrupados em áreas paratrabeculares, apesar do número de plaquetas no sangue periférico estarem normais ou diminuídas ⁽¹⁰⁻¹³⁾.

Na fase terminal da doença entretanto, estas alterações mostram-se mais acentuadas observando-se, hipoplasia de medula óssea e aumento de fibras de reticulina ⁽¹¹⁾.

A extrapolação de que as alterações hematológicas observadas em indivíduos infectados pelo HIV seja um efeito direto da infecção, confunde-se com a elevada freqüência de infecções e neoplasias coexistentes e ainda com o emprego de drogas mielotóxicas empregadas no tratamento. Desta forma, a fisiopatologia da pancitopenia em portadores do HIV é variada não podendo ser atribuída a um só mecanismo.

Existem diversos mecanismos propostos como relacionados a estas alterações, dentre os quais se destacam o emprego de medicamentos, ação de fatores de supressão (citocinas), falha nos fatores de estímulo ou ainda desordem na proliferação e/ou maturação de células progenitoras que poderia ser resultado da infecção direta do vírus ou de uma desordem na hematopoiese envolvendo falhas na

elaboração de fatores de crescimento para o desenvolvimento das células progenitoras hematopoéticas⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Desregulação da resposta imune como fenômenos auto-imunes, produção elevada de linfocinas que suprimem a hematopoiese também têm sido descrito por alguns autores. Por outro lado, tem sido levantada hipóteses sobre a presença de imunoglobulinas que reagiriam contra as células progenitoras, levando a uma supressão da hematopoiese mediada por anticorpos^(14,16).

A leucopenia (contagem de leucócitos inferior a $5.000/\text{mm}^3$) é um achado bastante comum em indivíduos infectados pelo HIV, principalmente devido a linfopenia, podendo ser em muitos casos decorrência de ação citotóxica de drogas empregadas no tratamento de infecções oportunistas e/ou de neoplasias, bem como de agentes antiretrovirais como a *zidovudina*, sendo constatada também em alguns casos, associação com a neutropenia, fato este observado em 50% dos indivíduos com AIDS em fase avançada^(6,12,13,14).

Neste estudo, dos 60 indivíduos do sexo masculino HIV+, observou-se a presença de leucopenia em 38,3% dos casos, sendo este achado mais freqüentemente observado nos indivíduos com baixas contagens de linfócitos TCD4. Nas mulheres, observou-se a mesma tendência, ou seja, houve uma correlação direta entre a leucopenia e linfopenia com baixos níveis de linfócitos TCD4 em particular nos casos em que a contagem destas células estavam inferiores a $200/\text{mm}^3$, sugerindo nestes casos um estágio avançado da doença.

A linfopenia progressiva, especialmente em decorrência da queda do número de linfócitos TCD4, é uma das principais alterações hematológicas observadas em pacientes da infectados pelo HIV. Nestes indivíduos, o número de linfócitos TCD8 encontram-se normal ou geralmente aumentado, principalmente nas fases iniciais da doença, ocorrendo entretanto uma diminuição progressiva dos mesmos nos indivíduos com linfopenia acentuada ou nos estágios mais avançados da infecção pelo HIV^(6,14-18).

A inversão da relação CD4/CD8 não constitui por si só (na ausência de detecção de anticorpos anti-HIV no soro dos pacientes), indicador de diagnóstico da AIDS, representando uma resposta do organismo perante estímulos crônicos de certas infecções virais, sendo porém um importante indicador de prognóstico ⁽¹⁴⁻¹⁸⁾.

Embora as causas da depleção e das alterações funcionais dos linfócitos TCD4 permaneçam obscuras, vários mecanismos tem sido referidos: lise da célula TCD4 infectada que pode ocorrer por ação direta do HIV ou resposta de caráter imunológico de células do sistema imune, através de mecanismos de citotoxicidade sobre células infectadas com expressão de antígenos virais em sua superfície ⁽¹⁴⁾; anergia causada por sinalização inadequada em consequência da interação entre gp-120 e a molécula CD4; indução da formação de sincícios pelo HIV; mecanismos autoimunes por ação de anticorpos e células T contra estruturas celulares que apresentam homologia aos peptídeos das glicoproteínas do envelope viral como algumas moléculas HLA, alterações funcionais dos linfócitos T mediados pelo vírus ou superantígenos, os quais induziriam os linfócitos TCD4 a sofrerem apoptose ^(14, 18).

Apesar da resposta policlonal dos linfócitos B nos indivíduos infectados, existe uma deficiência na resposta de anticorpos para novos antígenos e uma incapacidade para a formação de uma resposta adequada de IgM a um estímulo antigênico. Este fato resulta em severas consequências, principalmente em crianças infectadas que não tiveram exposição prévia aos vários organismos patogênicos bacterianos e que precisariam conter a ação destes agentes com uma resposta inicial as custas de IgM ⁽¹⁹⁾. Alguns indivíduos adultos entretanto também manifestam um aumento da susceptibilidade contra várias bactérias, estando este fato também relacionado com uma imunidade humoral ineficaz ⁽¹⁴⁻¹⁹⁾.

Esta hiperreatividade policlonal dos linfócitos B se dá provavelmente a múltiplos fatores como infecções pelo vírus *Epstein*

Barr (VEB) e pelo *citomegalovírus* (CMV) ambos ativadores policlonais de linfócitos B ^(14,17-18).

O número de linfócitos NK (*Natural Killer*) não está diminuído significativamente em pacientes infectados. Entretanto, sua capacidade citotóxica encontra-se diminuída quando comparada com indivíduos normais, podendo ser normalizada “*in vitro*” com uma variedade de agentes indutores como a interleucina 2 (IL-2) ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

Estes achados supracitados levam a confirmação da deficiência primária de linfócitos TCD4 na AIDS, com efeitos secundários nas demais subpopulações linfocitárias (linfócitos B e células NK) ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

Neste estudo, a linfopenia foi observada em 65% dos casos (30% dos homens e 35% das mulheres), constatando-se também uma correlação entre esta alteração hematológica e baixos níveis de linfócitos TCD4 na maioria dos casos, havendo portanto um consenso com os dados citados na literatura os quais relacionam a linfopenia em decorrência da depleção progressiva dos linfócitos TCD4 na AIDS (tabelas 2 e 3).

A anemia (caracterizada pela queda nos níveis de hemoglobina e hematócrito) assim como a leucopenia estão mais freqüentemente observadas e mais acentuadas nos estágios mais avançados da infecção pelo HIV. Embora sejam múltiplas as causas da anemia nestes indivíduos, a maioria destes apresentam anemia característica de infecções crônicas, sem reticulocitose e com baixos níveis de eritropoetina sérica ⁽⁶⁾.

Em indivíduos assintomáticos, a anemia é do tipo normocítica e normocrônica, sendo também observado nestes indivíduos que a diminuição progressiva dos níveis de hematócrito e de hemoglobina são indícios sugestivos da progressão da imunodeficiência ^(1,4,5). Esta observação também foi constatada neste estudo, onde observou-se uma maior freqüência de anemia em indivíduos com baixas contagens de linfócitos TCD4 sangüíneos independente do sexo (tabelas 4 e 5).

A trombocitopenia em geral assintomática, como parte da pancitopenia, é mais freqüente nos estágios mais avançados da infecção pelo HIV, não havendo uma correlação direta com os achados citomorfológicos da medula óssea, podendo esta alteração hematológica ocorrer em decorrência da destruição imune das plaquetas circulantes, ou por efeito mielotóxico de drogas antiretrovirais bem como em indivíduos em tratamento para *Pneumocystis carinii* com emprego de trimetopim-sulfametoxasole, em razão da susceptibilidade das células hematopoéticas precursoras a esta droga ⁽¹⁹⁻²¹⁾.

Observamos também uma maior correlação da trombocitopenia nos portadores do HIV com baixos níveis de linfócitos TCD4 em ambos os sexos, contrastando com os indivíduos que apresentavam contagem de plaquetas normais, os quais apresentaram contagem mais elevadas destes linfócitos na maioria dos casos.

CONCLUSÕES:

Com os dados acima relacionados conclui-se que:

- 1) A contagem de linfócitos TCD4 mostrou-se abaixo dos limites de normalidade na maioria dos casos analisados.
- 2) Observou-se também nestes casos um aumento da contagem de linfócitos TCD8 caracterizando a inversão da relação CD4/CD8
- 3) A presença de anemia, bem como de outras citopenias tais como leucopenia, linfopenia e trombocitopenia foram observados com mais freqüência em indivíduos pertencentes ao grupo III (contagem de LTCD4 no sangue periférico inferior a $200/\text{mm}^3$).
- 4) Com estes achados chamamos a atenção para as alterações hematológicas em indivíduos portadores do HIV.

AGRADECIMENTOS: Agradecemos a Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRN pela bolsa de iniciação científica concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1) **Bain, B.J.**- The Haematological Features of HIV Infection. *British Journal of Haematology*, 99: 1-8, 1997.
- 2) **Lee, G.R.; Bithell, T.C.; Forster, J.; Athens, J.W. and Lukens J.N.**- *Wintrobe Hematologia Clínica*; 1ª edição brasileira ,Editora Manole Ltda., cap: 66, pag:1841-1872, 1998.
- 3) **Dawenko, J.P. and Groopman J.P.** - Hematological consequence of HIV infection in: *Textbook of AIDS Medicine*, **Broder, S.; Merigan, T.C. and Bolognesi D.**, Editora Willians e Wilkins, Baltimore, cap. 40, pag: 617-628, 1994.
- 4) **Zon, L.I.; Arkin, C. and Groopman, J.E.**- Haematologic manifestations of the human immune deficiency virus (HIV). *British Journal of Hematology*. 66: 251-256, 1987.
- 5) **William, J.W.** In: *Williams Hematologia Compêndio*, 5ª edição, Editora Mcgraw-Hill, Rio de Janeiro, 1996.
- 6) **Rachid, M. and Schechter, M.** - *Manual de HIV/AIDS*, 3ª edição, Editora Revinter, pag: 100-105, 1998.
- 7) **Lyra, L.C.B.; Magalhães, M.C.; Garcia, L.Y.C.; Almeida, A. J.; Oliveira, C.A.B.; Fialho, F.; Sion, F.S. and Sá, C.A M.** - Alterações Hematológicas na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, XII (158): 76-77, 1991.
- 8) **U.S. Department of Helth and Human Services.** - 1994 revised Guidelines for the Performace of CD4+ T-Cell Determinations in Persons

With Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Massachusetts Medical Society Publishers of The New England Journal of Medicine*. 43 (RR-3): 1-21, 1994.

9) Stites, D.P.; Casavat, C.H.; McHugh, T.M.; Moss, A.R.; Beal, S.L., Ziegler, J.L.; Saunders, A.M. and Warner, N.L. - Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 38: 161-177, 1986.

10) Lorand-Metze, I. - AIDS: Medula Óssea. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, XII (158): 81, 1991.

11) Karcher, D.S. and Frost, A.R. - The bone marrow in human immunodeficiency virus (HIV) - related disease, morphology and clinical correlation. *Hematopathology*. 95(1): 63-71, 1991.

12).Donahue, R.E.; Johnson, M.M.; Zon,L.I.; Clark, S.C. & Groopman, J.E. - Suppression of in vitro hematopoiesis following human immunodeficiency virus Infection. *Nature*, 236: 200-203, 1987.

13) Mitsuyasu, R.T. and Golde, D.W. - Hematologic and oncologic aspects of HIV disease. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 5 (2): 195-243, 1991.

14) DeVita, V.T.Jr.; Hellman, S. and Rosemberg S.A. - *AIDS/SIDA, Etiologia, Diagnóstico, Tratamento e Prevenção*, 2ª edição, Editora Revinter, cap. 04, pag: 63-79, 1991.

15) Ortigão de Sampaio, M.B. and Castelo-Branco, L.R.R. - Imaturidade imunologica fetal e neonatal: implicações na evolução

clínica da infecção pelo HIV-1 em crianças. *Revista da Associação Médica Brasileira* .43 (1): 29-43, 1997.

16) Pantaleo, G.; Graziosi, G. & Fauci, A.C.- The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*. 328:327-335, 1993.

17) de Araujo, A.C. - Cell-Mediated immunity in the acquired immunodeficiency syndrome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 20:579-582, 1987.

18) Fauci, A.S. - The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 239: 617-622,1988.

19) Carvalho, A P. and Tonelli, E. – Avaliação imunológica em 60 crianças com AIDS. *Jornal de Pediatria*, 75(3): 172-180, 1999.

20) Murphy, M.F.; Metcalf, P.; Waters, AH.; Carne, C.A ; Weller I.V.D.; Linch D.C. and Smith A.- Incidence and mechanism of neutropenia and thrombocytopenia in patients with human immunodeficiency virus infection. *British Journal of Haematology*. 66: 337-340, 1987.

21) Pechere, M.; Samil, K. and Hirschel B.- HIV-related thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine*. 328:1785-1786, 1993.

22) WHO (World Health Organization) TECHNICAL REPORT SERIES, N° 405,1968.

QUADRO 01:

Anticorpos Monoclonais Empregados Neste Estudo

Anticorpos Monoclonais	Especificidade
(Simultest) CD3/CD19	Linfócitos T e B
(Simultest) CD3/CD4	Linfócito T Auxiliar / Indutor
(Simultest) CD3/CD8	Linfócito T Supressor / Citotóxico
(Simultest) Gama 1/Gama 2	Controle Isotípico (marcação inespecífica)

OBS: Anticorpos Monoclonais da *Becton & Dickinson*.

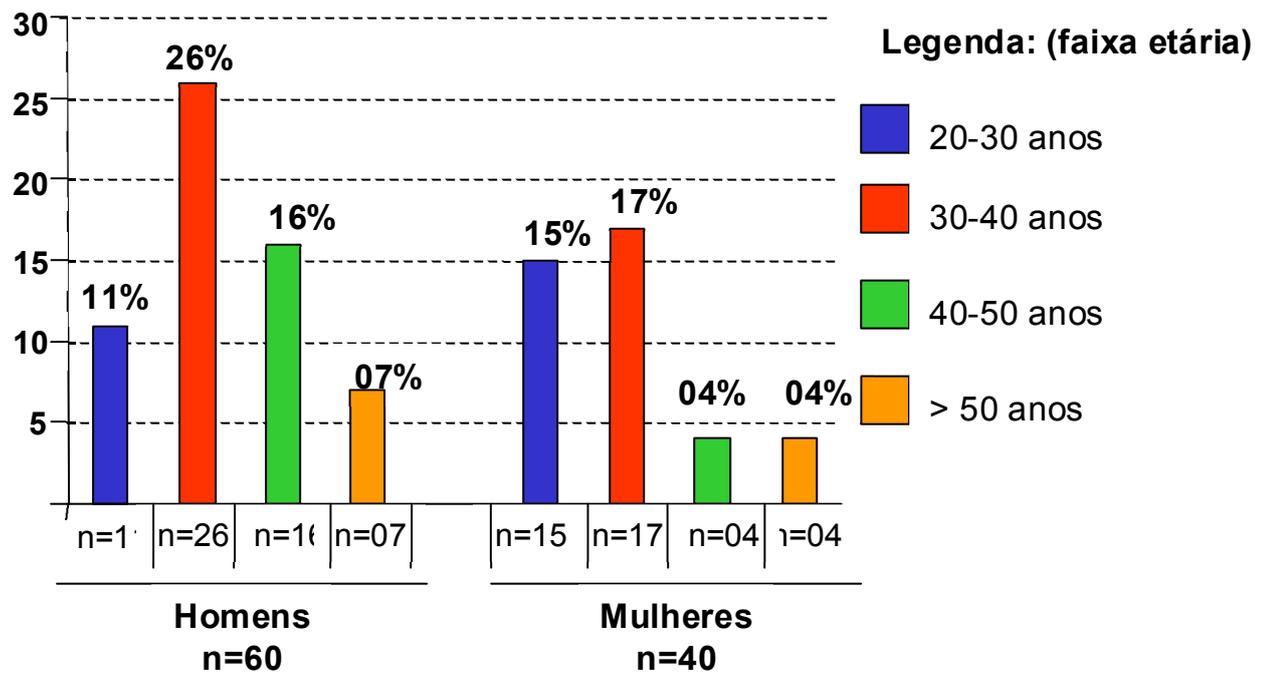


Figura 01: Faixa Etária da População Analisada

TABELA 1:

Características Gerais da População Analisada

Sexo Características	HOMENS N=60	MULHERES N=40	TOTAL N=100
Variações	Min - Max (Me)	Min - Max (Me)	Min - Max
Idade (anos)	21 - 77 (42)	21 - 55 (31)	21 - 77
Leucócitos (x 10 ³ / mm ³)	1,9 - 12,5 (5,6)	0,80 - 10,3 (4,9)	0,80 - 10,3
Linfócitos (x 10 ³ / mm ³)	0,5 - 5,7 (1,8)	0,13 - 3,6 (1,6)	0,13 - 5,7
Neutrófilos (x 10 ³ / mm ³)	0,4 - 7,6 (2,1)	0,32 - 6,4 (2,4)	0,32 - 7,6
Monócitos (x 10 ³ / mm ³)	0,02 - 1,8 (0,6)	0,10 - 0,85 (0,5)	0,02 - 1,8
Eosinófilos (x 10 ³ / mm ³)	0,0 - 1,8 (0,2)	0,0 - 2,2 (0,1)	0,0 - 2,2
Basófilos (x 10 ³ / mm ³)	0,0 - 0,2 (0,02)	0,0 - 0,1 (0,02)	0,0 - 0,2
Hemoglobina (g/dl)	7,6 - 16,8 (12,9)	5,9 - 14,6 (12,7)	7,6 - 16,8
Hematócrito (%)	22 - 49 (37)	22 - 49 (37)	17 - 49
Plaquetas (x 10 ³ / mm ³)	73,0 - 676 (203)	59 - 392 (222)	59,0 - 676
Subpopulação Linfocitária			
Linfócitos T (CD3+) / mm ³	317 - 4218 (1343)	256 - 2804 (1248)	256 - 4218
Linfócitos T (CD4+) / mm ³	17 - 1080 (264)	23 - 1692 (420)	17 - 1698
Linfócitos T (CD8+) / mm ³	180 - 4070 (1060)	230 - 1975 (782)	180 - 4070
Linfócitos B (CD19+) / mm ³	11 - 798 (160)	03 - 600 (182)	03 - 798
Relação CD4/CD8	0,02 - 1,2 (0,25)	0,1 - 1,01 (0,54)	0,02 - 1,2

TABELA 2:

Correlação entre os níveis de linfócitos TCD4 e formula leucocitária em homens infectados com o vírus da imunodeficiência humana

LTCD4	CD4/mm ³	CD4/mm ³	CD4/mm ³	Total Analisado
	(≥ 500)	(499 - 200)	(< 200)	
Leucócitos	n= 13 (21,7%)	n= 23 (38,3%)	n= 24 (40,0%)	n= 60 (100%)
LEUCOMETRIA				
<5.000 /mm ³	01 (01,7)	08 (13,3)	14 (23,3)	23 (38,3)
5.0 - 10.000 /mm ³	10 (16,7)	14 (23,3)	10 (16,7)	34 (56,7)
>10.000 /mm ³	02 (03,3)	01 (01,7)	(-)	03 (05,0)
LINFÓCITOS				
<1500 /mm ³	(-)	06 (10,0)	12 (20,0)	18 (30,0)
2500 - 1500 /mm ³	07 (11,7)	13 (21,7)	12 (20,0)	32 (53,3)
>2500 /mm ³	06 (10,0)	04 (06,6)	(-)	10 (16,7)
NEUTRÓFILOS				
<2200 /mm ³	02 (03,3)	10 (16,7)	15 (25,0)	27 (45,0)
2200 - 6500 /mm ³	10 (16,7)	13 (21,6)	09 (15,0)	32 (53,3)
>6500 /mm ³	01 (01,7)	(-)	(-)	01 (01,7)
MONÓCITOS				
<1500 /mm ³	01 (01,7)	01 (01,7)	03 (05,0)	09 (15,0)
2500 - 1500 /mm ³	09 (15,0)	11 (18,3)	14 (23,3)	34 (56,7)
>2500 /mm ³	03 (05,0)	11 (18,3)	07 (11,7)	17 (28,3)
EOSINÓFILOS				
<100 /mm ³	01 (01,7)	01 (01,7)	04 (06,7)	06 (10,7)
100 - 400 /mm ³	10 (16,7)	19 (31,7)	14 (23,3)	14 (23,3)
>400 /mm ³	02 (03,3)	01 (01,7)	07 (11,7)	04 (06,7)
BASÓFILOS				
00 - 80 /mm ³	06 (10,0)	13 (21,7)	05 (08,3)	25 (41,7)
>80 /mm ³	07 (11,7)	10 (16,7)	19 (31,7)	35 (58,3)

OBS: Teste do Qui-quadrado (χ^2): **Leucócitos**, $\chi^2= 11,75$, significativo ao nível de 5%; **Linfócitos**, $\chi^2= 18,08$, significativo ao nível de 5%; **Neutrófilos**, $\chi^2= 10,26$, significativo ao nível de 5% (no limite); **Monócitos**, $\chi^2= 6,20$, não significativo ao nível de 5%; **Eosinófilos**, $\chi^2= 7,08$, não significativo ao nível de 5%; **Basófilos**, $\chi^2= 8,48$, não significativo ao nível de 5%.

TABELA 3:

Correlação entre os níveis de linfócitos TCD4 e formula leucocitária em mulheres infectadas com o vírus da imunodeficiência humana

LTCD4	CD4 / mm ³ (≥ 500)	CD4 / mm ³ (499 - 200)	CD4 / mm ³ (< 200)	Total Analisado
	n= 12 (30,0%)	n= 22 (55,0%)	n= 06 (15,0%)	n= 40 (100%)
LEUCÓCITOS				
< 5.000 / mm ³	03 (07,5)	12 (30,0)	06 (15,0)	21 (52,5)
5.0 - 10.000 / mm ³	08 (20,0)	10 (25,0)	(-)	18 (45,0)
> 10.000 / mm ³	01 (02,5)	(-)	(-)	01 (02,5)
LINFÓCITOS				
<1.500 / mm ³	(-)	08 (20,0)	06 (15,0)	14 (35,0)
2.500 - 1500 / mm ³	06 (15,0)	14 (35,0)	(-)	20 (50,0)
>2.500 / mm ³	06 (15,0)	(-)	(-)	06 (15,0)
NEUTRÓFILOS				
<2.200 / mm ³	05 (12,5)	07 (17,5)	03 (07,5)	15 (37,5)
2.200 - 6.500 / mm ³	07 (17,5)	15 (37,5)	03 (07,5)	25 (62,5)
>6.500 / mm ³	(-)	(-)	(-)	(-)
MONÓCITOS				
<1.500 / mm ³	01 (02,5)	01 (02,5)	01 (02,5)	03 (07,5)
2.500 - 1.500 / mm ³	07 (17,5)	16 (40,0)	05 (12,5)	28 (70,0)
>2.500 / mm ³	04 (10,5)	05 (12,5)	(-)	09 (07,5)
EOSINÓFILOS				
<100 / mm ³	(-)	03 (07,5)	03 (07,5)	05 (12,5)
100 - 400 / mm ³	10 (25,0)	17 (42,5)	03 (07,5)	30 (75,0)
>400 / mm ³	02 (05,0)	02 (05,0)	03 (07,5)	05 (12,5)
BASÓFILOS				
00 - 80 / mm ³	10 (25,0)	13 (32,5)	06 (15,0)	29 (72,5)
>80 / mm ³	02 (05,0)	09 (22,5)	(-)	11 (27,5)

OBS: Teste do Qui-quadrado (χ^2): **Leucócitos**, $\chi^2= 10,61$, significativo ao nível de 5%; **Linfócitos**, $\chi^2= 29,27$, significativo ao nível de 5%; **Neutrófilos**, $\chi^2= 0,792$, não significativo ao nível de 5%; **Monócitos**, $\chi^2= 3,32$, não significativo ao nível de 5%; **Eosinófilos**, $\chi^2= 4,687$, não significativo ao nível de 5%; **Basófilos**, $\chi^2= 4,97$, não significativo ao nível de 5%.

TABELA 4:

Correlação dos níveis de linfócitos TCD4 e dosagem de hemoglobinas em homens portadores do vírus da imunodeficiência humana

LTCD4	CD4 / mm ³ (≥ 500) n (%)	CD4 / mm ³ (499 - 200) n (%)	CD4 / mm ³ (< 200) n (%)	Total Analisado n (%)
Hb (g/dl)				
Hemoglobina < 13,0g/dl	05 (08,3)	07 (11,7)	18 (30,0)	30 (50,0)
*Hemoglobina ≥ 13,0g/dl	08 (13,3)	16 (26,7)	06 (10,0)	30 (50,0)
Total	13 (21,6)	23 (38,4)	24 (40,0)	60 (100)

Obs: (*) Valores normais para a dosagem de hemoglobina em homens segundo a Organização Mundial de Saúde⁽²²⁾.

Teste do Qui-quadrado (χ^2) = 11,1, significativo ao nível de 5%

TABELA 5:

Correlação dos níveis de linfócitos TCD4 e dosagem de hemoglobinas em mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana

LTCD4	CD4 / mm ³ (≥ 500) n (%)	CD4 / mm ³ (499 - 200) n (%)	CD4 / mm ³ (<200) n (%)	Total Analisado n (%)
Hb (g/dl)				
Hemoglobina < 11,5g/dl	(-)	04 (10,0)	04 (10,0)	08 (20,0)
*Hemoglobina ≥ 11,5g/dl	12 (30,0)	18 (45,0)	02 (05,0)	32 (80,0)
Total	12 (30,0)	22 (55,0)	06 (15,0)	40 (100)

Obs: (*) Valores normais para a dosagem de hemoglobinas para as mulheres segundo a Organização Mundial de Saúde ⁽²²⁾.

Teste do Qui-quadrado (χ^2) = 11,71, significativo ao nível de 5%

TABELA 6:

Correlação entre as contagens de plaquetas e de linfócitos TCD4 em homens infectados pelo vírus da imunodeficiência humana

LTCD4 Plaquetas	CD4/mm ³ (≥ 500)	CD4 / mm ³ (499 - 200)	CD4 / mm ³ (< 200)	Total Analisado
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
< 150.000/ mm ³	01 (01,7)	06 (10,0)	19 (31,7)	26 (43,3)
≥ 150.000/ mm ³	12 (20,0)	17 (28,3)	05 (08,3)	34 (56,6)
Total	13 (21,7)	23 (38,3)	24 (40,0)	60 (100%)

OBS: Teste do Qui-quadrado (χ^2)= 22,0 significativo ao nível de 5%

TABELA 7:

Correlação entre as contagens de plaquetas e de linfócitos TCD4 em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana

LTCD4 \ Plaquetas	CD4 / mm ³ (≥ 500)	CD4 / mm ³ (499 - 200)	CD4 / mm ³ (< 200)	Total Analisado
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
< 150.000 / mm ³	(-)	02 (05,0)	05 (12,5)	07 (17,5)
≥ 150.000 / mm ³	12 (30,0)	20 (50,0)	01 (02,5)	33 (82,5)
Total	12 (30,0)	22 (55,0)	06 (15,0)	40 (100)

OBS: Teste do Qui-quadrado (χ^2)=21,63, significativo ao nível de 5%

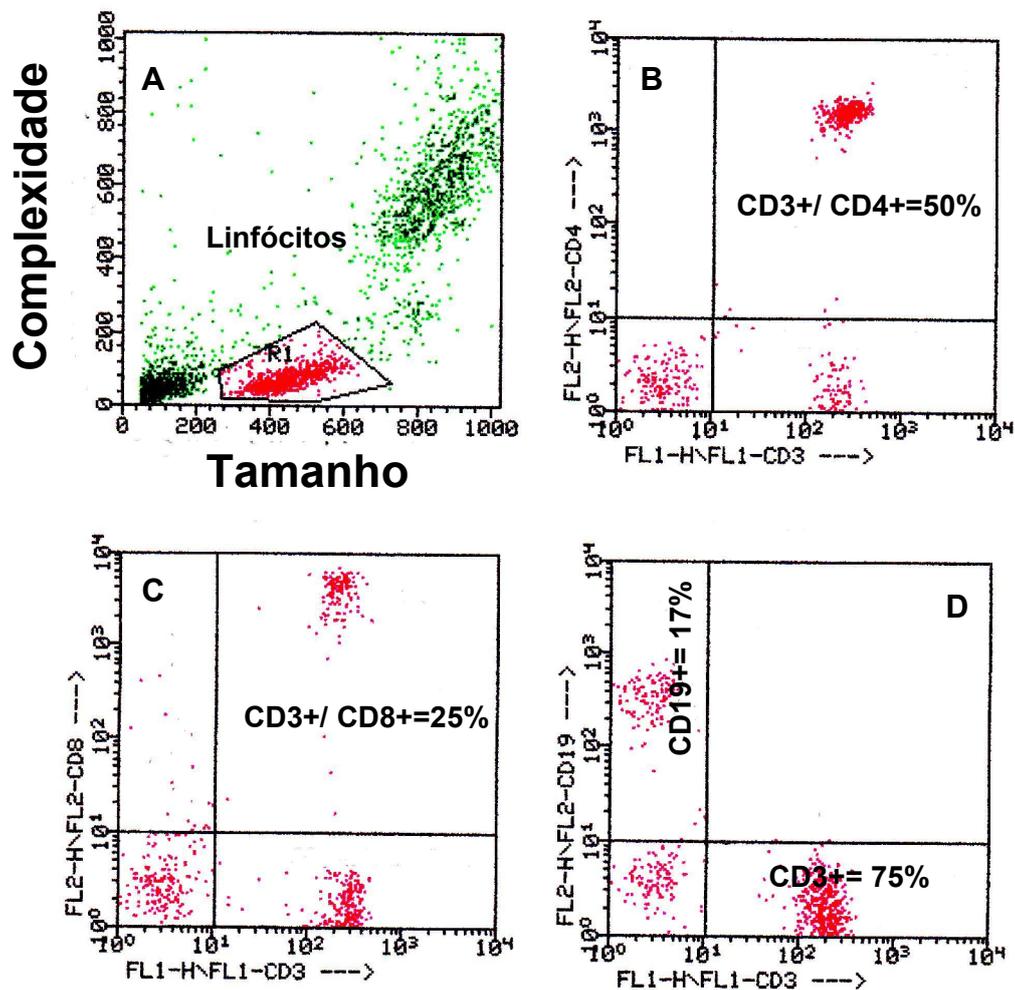


Figura 02:

Representação gráfica de histogramas de imunofenotipagem de subpopulação linfocitária de um indivíduo soronegativo para o HIV

A) Representação de parâmetros SSC (Complexidade/Granulosidade) e FSC (Tamanho) da população analisada (linfócitos) em destaque vermelho; **B)** Dupla marcação (CD3+/CD4+) mostrando o percentual de linfócitos TCD4+ dentro dos limites de normalidade; **C)** Dupla marcação (CD3+/CD8+), mostrando o percentual de linfócitos TCD8+ dentro dos limites de normalidade; **D)** Percentual de linfócitos T e B.

CONTRIBUIÇÃO PARA GARANTIA DA QUALIDADE NA SOROLOGIA DA SÍFILIS *

CONTRIBUTION ABOUT TO QUALITY ASSURANCE AT
THE SYPHILIS SEROLOGY

Jansen Pacheco Nunes ¹
Luiz Fernando de Goes Siqueira ²
Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini ²

(*) Parte da Tese de Doutorado de Jansen Pacheco Nunes apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998. Trabalho vencedor do Prêmio PNCQ no XXVI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, Goiânia-GO, Maio-99.

1- Diretor Geral do Laboratório PRÓ-EXAME Ltda – Taubaté – SP

2- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

RESUMO - Com o objetivo de traçar um perfil atual do comportamento dos kits utilizados no Brasil para a sorologia da sífilis, foram estudados 13 (treze) conjuntos (09 nacionais e

04 importados) e avaliados segundo sua performance na reação de V.D.R.L., frente a um conjunto de soros conhecido e composto de 41 soros, sendo 21 soros positivos e 20 negativos, nas mesmas condições de experimento e respeitando as particularidades de cada fabricante. Foi verificado se os kits produziam a mesma resposta frente a um mesmo soro, se existia um nível de variação de resultados de um mesmo soro quando testado com kits diferentes e a reprodutibilidade de resultados entre lotes diferentes de um mesmo fabricante sorteado aleatoriamente. Baseados em dados estatísticos constatou-se que os kits diferem quanto aos resultados de classificação e nível de variação de um mesmo soro, ou seja, apresentam resultados diferentes e variados quando analisam um único soro. A análise inter-lotes de um mesmo fabricante constatou-se que os kits, apesar das variações, não diferem estatisticamente quanto a classificação dos resultados, dentro das condições estabelecidas no conjunto de soros estudado.

PALAVRAS CHAVES - Sífilis; Garantia de Qualidade ; Controle de Qualidade

SUMMARY – Aiming at designing an updated outline of the kits for syphilis serology used in Brazil, 13 (thirteen) sets (09 national and 04 imported) were studied and assessed according to their performance in the V.D.R.L. reaction against a set made up of 41 serums, 21 positive and 20 negative. This was achieved in the same experiment conditions, respecting each manufacturer's particularities. It was surveyed if the kits produced the same response against a particular serum, if there was a variation level of results of a particular serum when tested with different kits and the reproducibility of results between different lots from the same manufacturer, selected at random. Based in statistic data, it was ascertained that this kits differ concerning classification results and varied level of a particular serum, that is, they present different and varied results when analyzing an only serum, the analysis between lots of a unique manufacturer certified that the kits, in spite of the variations, do not differ statistically regarding the results classification within the conditions determined in the studies serums.

KEYWORDS –Syphilis; Quality Assurance; Quality Control.

INTRODUÇÃO

Controle de qualidade e sua influência na tomada de decisões clínicas.

Os resultados dos exames de laboratório são usados tanto nos processos diagnósticos, monitoramento de terapia quanto no desenvolvimento do ensino e da pesquisa. Vários estágios e fatores estão envolvidos desde a solicitação inicial do teste até a aceitação dos resultados e subsequente ação terapêutica. Em todos esses estágios que levam a tomada de decisão clínica, a qualidade, de uma forma generalizada, deve estar presente como forma de diminuição dos erros¹⁴. As fontes pré-analíticas de variações e erros, como uma coleta mal feita, uma contaminação da amostra, hemólise, acondicionamento errado, etc, cada um com suas características vão interferir no resultado e subsequente na intervenção clínica¹¹. Cada procedimento analítico influencia através de suas características próprias tais como: especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo, reprodutibilidade e outros. A imprecisão ou o erro casual é parte inerente aos processos de medidas embora possa ser minimizada por uma sensata seleção de metodologia e instrumentação, interferindo naturalmente na interpretação dos resultados. A alta imprecisão gera dispersão dos resultados e aumenta o intervalo de referência fazendo crescer a probabilidade de resultados falsos de um simples teste de laboratório. Assim, a imprecisão mostra seu efeito quando os testes são usados para monitorar pacientes, onde a mudança de resultados de um indivíduo é devido não somente a melhoria do seu estado clínico, mas também a fontes de variações pré-analíticas e analíticas. Laboratórios precisam introduzir gerenciamento de qualidade total para determinar todos os caminhos que levam a obter resultados com garantia¹⁴. Por isso, existe a necessidade de um monitoramento contínuo na rotina de trabalho que deve percorrer todos os passos dos exames desde a coleta de material, equipamentos e reagentes utilizados, além de outros fatores que não se limitam a procedimentos técnicos como histórico clínico e tratamento. Programas rígidos de controle de qualidade são necessários para garantir a acurácia e a

segurança dos resultados obtidos em qualquer setor do Laboratório ¹¹. Procedimentos preventivos na qualidade do espécime coletado, equipamentos, armazenamento de reagentes e/ou kits comercializados, vão gerar conseqüente diminuição dos erros nos ensaios ¹⁵.

Quando transportamos a necessidade da existência de um controle de qualidade sobre os kits comercializados no país para o diagnóstico sorológico da sífilis, deparamos primeiro com uma doença que ainda é um sério problema de saúde pública tomando como base os aspectos epidemiológicos dessa morbidade e considerando a diversidade de condições técnicas, infra-estrutura básica, multiplicidade de testes utilizados sem análise prévia do produto, sem protocolo de validação ou teste de conformidade, além das variáveis econômicas nas diferentes regiões brasileiras, torna-se fundamental a implementação de estudos destinados a avaliar o desempenho das rotinas laboratoriais no diagnóstico e controle da sífilis.

Por outro lado, segundo a International Standardization Organization (ISO), a qualidade de um produto ou serviço se define como um conjunto de características do mesmo, relacionada com sua capacidade em satisfazer as necessidades implícitas ou estabelecidas para esse produto ou serviço. Daí se definir GARANTIA DE QUALIDADE como o programa total que assegura os corretos resultados finais emitidos pelos laboratórios, com exatidão pré-estabelecida. ^{3, 5, 6, 7, 13, 21, 23}

O aumento das taxas de utilização de kits industrializados destinados a testes laboratoriais de diagnóstico clínico se tornou imprevisível desde os anos 60 ^{1,2,8,10,12,16,24} e hoje, entretanto, apesar do aumento crescente deste segmento mercadológico, muito pouca atenção vem sendo destinada a qualidade dos reagentes, insumos e kits utilizados em triagem e diagnóstico clínico. ^{4,9, 22}

Com o passar dos anos um incontável número de kits vem sendo colocado a disposição no mercado brasileiro ^{18,19}, sem nenhum critério de controle, inclusive aqueles utilizados no diagnóstico da sífilis, mesmo com o agravamento dos últimos 10 anos, as crescentes taxas de sífilis congênitas em todo o mundo e particularmente nos países ditos em desenvolvimento. Nos intrincados e complexos programas de combate e controle da sífilis, pouca ou nenhuma atenção vem sendo dada no Brasil ao controle de qualidade dos insumos e reagentes utilizados nos diagnósticos clínicos.

Controle de Qualidade em Saúde no Brasil

Segundo a Lei 6.360 de 23.09.76, o decreto 79.094 de 05.01.77, que regulamente esta lei, bem como as portarias 1 de 17.05.93 e 2.043 de 12.12.94 as quais constituem o sistema de qualidade e a definição dos produtos correlatos, os produtos sob regime de vigilância estão sujeitos a três tipos de análises: Análise Prévia, para verificação do objeto do registro; Análise de Controle, efetuada após a entrega ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro; e finalmente a Análise Fiscal, efetuada em caráter de rotina para apuração de infração ou verificação de ocorrência fortuita ou eventual.

Os Laboratórios do Ministério da Saúde ou congêneres da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Territórios, com competência delegada, através de convênios, são responsáveis pelas análises oficiais dos produtos comercializados no país. Nenhum produto submetido ao regime de vigilância sanitária poderá ser industrializado, exposto a venda ou entregue ao consumo, antes de registrado no órgão de vigilância sanitária competente do Ministério da Saúde. Qualquer modificação de fórmula, alteração dos elementos de composição ou de seus quantitativos, adição, subtração ou inovação introduzida na elaboração do produto ou embalagem dependerá de prévia e expressa autorização.

No Brasil o órgão encarregado da análise prévia de produtos é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que ainda não realizou uma análise completa e detalhada para o registro de produtos em insumos, reagentes ou kits destinados ao diagnóstico da Sífilis. Existem hoje no mercado cerca de 15 conjuntos, entre nacionais e importados. As discrepâncias existentes entre o performance dos reagentes é tão grande, que compromete inclusive as definições de situação epidemiológica desta morbidade no Brasil.

Um teste que venha sendo utilizado por vários Laboratórios ou durante muito tempo, não representa necessariamente a garantia do resultado. Para comparar diferentes conjuntos para diagnósticos, torna-se necessário possuir um teste de referência.

Assim, o presente trabalho tem como objetivos gerais :

- (1) Traçar um perfil atual de comportamento dos kits utilizados no Brasil na sorologia não específica da sífilis.
- (2) Contribuir para o desenvolvimento de um Programa de Garantia de Qualidade das reações sorológicas utilizadas no diagnóstico.

Como objetivos específicos:

- (1) Verificar se os kits utilizados no país produzem uma mesma resposta frente a um mesmo soro, nas mesmas condições de experimento e respeitando as particulares técnicas de cada fabricante.
- (2) Verificar a existência de um nível de variação de resultados de um mesmo soro quando testado com vários kits diferentes, nas mesmas condições de experimento e respeitando as particularidades de cada fabricante.
- (3) Verificar a reprodutibilidade de resultados entre lotes diferentes de um mesmo fabricante, sorteados aleatoriamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Foi formado um conjunto de soros conhecido contendo um total de 41 amostras de soro congelado, sendo 21 amostras de soro positivo e 20 amostras de soro negativo, selecionados em função da positividade e da negatividade de cada um (no momento em que foi estocado à temperatura de 4° C) e do volume disponível, fazendo com que todos eles pudessem ser utilizados em todas as reações elaboradas na pesquisa.

Os soros positivos foram gentilmente cedidos pelo Área de Dermatologia Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e os negativos foram conseguidos através de doações voluntárias de pessoas que se dispuseram a ajudar o projeto.

Kits utilizados na pesquisa

Foram utilizados 13 (treze) kits , baseados em metodologia recomendada pela Organização Mundial da Saúde ¹⁷ , discriminados a seguir, conforme o fabricante. Os kits de números 07 e 12 , apesar de serem fabricados pela mesma empresa, foram considerados diferentes pelas suas próprias características. Foram utilizados kits com reação de V.D.R.L. tradicional (1,2,5,6,8,9,10,11,12 e 13) e com V.D.R.L. modificado (3,4 e 7).

1- BEHRING : VDRL - Cardiolipin Antigen

Fabricante: Behringwerke AG , Marburg, Alemanha

OBS: Primeiro lote utilizado

2- BIOCLIN : VDRL - PRONTO PARA USO

Fabricante : Quibasa , Brasil

3- BIOKIT : RPR REDISTEST

Fabricante: Biokit S.A. , Espanha

4- BIOLAB : CARBOTEST VDRL

Fabricante: Diagast Laboratories, França

5- CECON : ANTIGENO PARA REAÇÃO DE VDRL

Fabricante: Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda., Brasil

- 6- DOLES : VDRL ESTABILIZADO
Fabricante: Doles Reagentes, Brasil
- 7- LABORCLIN : RPR-CORADO L/B
Fabricante: LB - Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda., Brasil
- 8- SANOFI-PASTEUR: VDRL - LATEX
Fabricante: Diagnostics Pasteur, França
- 9- TRILAB : VD TESTE TRILAB
Fabricante: Trilab Diagnostica Ltda. , Brasil
- 10- WAMA : VDRL/SIFILIS
Fabricante: Wama Diagnostica, Brasil
- 11- WIENER - VDRL TEST
Fabricante: Wiener Lab., Argentina
- 12- VDRL - BRAS (Antígeno para Reação de VDRL)
Fabricante : LB - Laborclin Produtos para Laboratório Ltda.
- 13- BEHRING: VDRL - Cardiolipin Antigen
Fabricante: Berhingewerke AG , Marburg, Alemanha
OBS: Segundo lote utilizado

Randomização dos Soros

Os soros inicialmente foram numerados de 1 a 21 os positivos e de 22 a 41 os negativos. Em seguida, a cada kit trabalhado, essa numeração inicial foi retirada e promoveu-se um sorteio de forma a distribuir aleatoriamente os soros positivos e negativos objetivando evitar o erro de tendenciosidade do procedimento. Após a renumeração dos soros, sem saber previamente quais eram positivos ou negativos, iniciavam-se os testes propriamente ditos.

Conservação dos Soros e Kits

Todos os soros foram conservados em geladeira a temperatura dentre 4 e 8° C até o momento da realização dos exames quando foram deixados uma hora a temperatura ambiente antes do início do seu processamento. Todos os kits também foram armazenados segundo as normas determinadas por cada fabricante, normalmente nas condições acima especificadas.

Padrão de Floculação do Controle Negativo

Antes dos procedimentos com o conjunto de soros conhecido , todos os kits foram testados de duas formas, sendo uma com solução salina e outra com um soro conhecido negativamente e não turvo, para se estabelecer o PADRÃO DE FLOCULAÇÃO do CONTROLE NEGATIVO de cada um deles, já que existem diferenças visíveis quando comparados entre si. Na realidade, mesmo sendo um controle de negatividade, o que não geraria uma reação de floculação, pode ocorrer certo grau de reatividade, daí considerarmos um padrão da reação com controles negativos.

Procedimento Técnico

Após a definição de cada kit a ser utilizado foi feito o sorteio dos soros positivos e negativos com numeração prévia definida anteriormente , seguidos de uma renumeração, e ambos, soros e kit, foram deixados à temperatura ambiente por uma hora antes de se iniciarem as análises. Depois foram divididos em 6 (seis) grupos contendo 6 (seis) soros cada e 1(um) grupo contendo 5(cinco) soros , de uma forma que não se repetiam os mesmos grupos de soros nos diferentes kits analisados . A execução das análises foi feita por cada grupo individual e a divisão dos conjuntos (grupos) se fez necessária para evitar evaporação dos componentes do sistema (reagentes e soros) em

função do tempo consumido na realização de cada teste. Assim, somente após a execução de todas as diluições correspondentes ao primeiro grupo se iniciava o processamento do segundo, em seguida o terceiro e assim por diante.

Para cada kit analisado inicialmente se efetuou diluições de 1:1 até 1:32 em placas de Kline para cada soro e adicionou-se os antígenos de acordo com que estava estabelecido nas bulas que acompanham os produtos, respeitando assim o que foi preconizado pelos fabricantes e até evitando o efeito pro-zona associados a esse tipo de exame. Em seguida foram colocadas sob agitação em determinados tempo e velocidade para que fosse feita a leitura do padrão de floculação na maior diluição. Após leitura do primeiro grupo nas diluições citadas aqueles soros que necessitavam de maiores diluições foram diluídos até 1:1024 e repetidos os procedimentos devidos. As placas de Kline após agitação e antes da leitura definitiva permaneceram em câmara úmida para evitar evaporação dos reagentes.

A execução das análises e a leitura dos resultados foram feitas por uma só analista, a fim de padronizar a leitura e a execução das técnicas.

Análise Estatística

Foi escolhido como método de avaliação estatística para comparar todos os kits do trabalho de fabricantes diferentes, a Prova de Friedman²⁰ por se tratar de um teste não paramétrico baseado na distribuição de Qui quadrado e utilizado em situações onde os valores não sejam muito exatos, como neste caso, cuja reação de floculação (V.D.R.L.) mede a intensidade de floculação enquanto etapas de uma diluição e não exatamente a concentração real de anticorpos. Na sua aplicação não se necessita fazer suposições sobre a distribuição da população na qual tenham sido extraído já que as amostras (kits) são consideradas em correspondência entre si visto que o mesmo grupo de soros positivos e negativos foi utilizado para cada um deles. Para caracterizar a Prova de Friedman os dados se dispõem em uma tabela de dupla entrada com N linhas (N=21 onde cada linha representa um soro utilizado) e K colunas (K=12 onde cada colunas representa um kit utilizado). Aos dados da prova chamamos de POSTOS e atribuímos escores ou resultados separadamente, isto é, aos resultados de cada casela na linha atribui-se postos separados. Assim para os 12 kits os postos variam de 1 a 12. Os resultados das reações realizadas com cada soro são distribuídos em ordem crescente e o valor dos escores finais são resultantes da posição crescente de cada posto. Havendo empate nos resultados, ou seja, soros com o mesmo resultado, utiliza-se o valor do posto médio, proveniente da média aritmética dos postos empatados. A Prova de Friedman determina se é provável que as diferentes colunas de postos (kits) provêm de uma mesma população utilizando a tabela de distribuição do Qui-quadrado.

Para fazer a avaliação da situação definida dos resultado inter-lotes do mesmo fabricante, utilizamos a Prova de Wilcoxon²⁰ que é uma ferramenta que atribui maior ponderação a um par de resultados e que acusa grande diferença no número de fases positivas alcançada. Também é um teste não paramétrico cujos valores resultantes são analisados em uma tabela própria que acompanha a prova. Da mesma forma que a Prova de Friedman atribuímos postos e escores aos resultados, calculando a menor soma dos postos de um mesmo sinal que chamamos de T e comparamos com uma tabela. Sob um nível de significância definido de 5% aceitamos ou rejeitamos nossa hipótese dependendo se T é menor ou maior que o valor tabelado.

RESULTADOS

Distribuição dos resultados e escores obtidos.

A Tabela 1 mostra a distribuição dos resultado dos 12 kits utilizados em função dos soros positivos estudados. Tal disposição foi considerada como o inverso da diluição do soro já que pela própria característica da Prova de Friedman não se dá importância ao valor do número em si, o que vale é a ordem de ocupação de cada resultado nas colunas da tabela. Assim, por exemplo, seria indiferente considerar $\frac{1}{2}$ ou 2 se eles ocuparem a

S O R O	N G	I N	T	B			C L I N	I U R	B		R	R A S L B
1	5	11	5	5	11	5	5	5	11	5	5	5
2	11,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	11,5	5,5	5,5	5,5
3	5	11	5	5	5	5	5	5	11	5	5	11
4	10	10	10	4	4	4	10	4	4	4	10	4
5	11	8	3	3	12	3	8	8	3	3	8	8
6	4	12	4	9	4	9	4	9	11	4	4	4
7	4	4	12	4	4	4	4	9,5	9,5	9,5	9,5	4
8	5	5	5	10,5	5	5	5	10,5	12	5	5	5
9	5	10	10	5	1,5	10	5	10	1,5	10	5	5
10	4,5	4,5	4,5	10	1	4,5	4,5	10	10	10	4,5	10
11	5	5	5	10,5	5	1	5	10,5	10,	10,5	5	5
12	2	10,5	10,5	10,5	2	2	10,5	6	6	6	6	6
13	2,5	6,5	6,5	6,5	1	2,5	6,5	11,5	6,5	11,5	10	6,5
14	2	4,5	10,5	12	1	4,5	4,5	8	8	10,5	8	4,5
15	4	4	9	4	9	9	4	11	4	12	4	4
16	3,5	3,5	11,5	10	3,5	3,5	8	11,5	8	3,5	3,5	8
17	6,5	9,5	3	11,5	3	3	3	9,5	11,5	6,5	3	8
18	3,5	2	12	6,5	6,5	3,5	6,5	6,5	10	10	10	1
19	7,5	7,5	7,5	7,5	1,5	7,5	3,5	11,5	1,5	11,5	7,5	3,5
20	5,5	5,5	5,5	9,5	2	2	9,5	12	9,5	5,5	9,5	2
21	2,5	9,5	2,5	11,5	6	6	6	11,5	9,5	6	6	1
Rj	109,5	149	147,5	161	93,5	99,5	123	186	169,5	154,5	134	111
Rj2	11990,25	22201	21756,25	25921	8742,25	9900,25	15129	34596	28730,25	23870,25	17956	12321

Características dos Kits e variações por fabricante.

Para evidenciar algumas diferenças entre os kits construímos a Tabela 3 que mostra variações de metodologia entre os mesmos, variações na quantidade e no tipo das amostras e das suspensões antigênicas, tempo de agitação e número de rotações por minuto utilizada em cada um deles e outras particulares inerentes a cada um.

Tabela 3- Principais características e diferenças dos kits utilizados na pesquisa

FATORES KITS	INDICADOR DO MÉTODO	INATIVAÇÃO DO SORO	TIPO DE AMOSTRA	VOLUME DA AMOSTRA (μ l)	VOLUME DA SUSPENSÃO (μ l)	TEMPO DE ROTAÇÃO (min)	R.P.M.	REGISTRO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE NA EMBALAGEM
BEHRING	Não Tem	sim 30' 56° C	soro/ liquor	50	1 gota ¹	4	180	Não
BIOLIN	Não Tem	não	Soro/ plasma	50	20	5	não tem	não
BIOKIT	Não Tem	não	Soro/ plasma	50	1 gota ²	8	100	não

BIOLAB	Carvão	não	Soro/ plasma	50	1 gota ³	6	180	não
CECON	Não Tem	não	Soro/ liquor	50	20	4	não tem	sim
DOLES	Não Tem	não	Soro/ plasma liquor	50	20	5 a 8	não tem	não
LABORCLIN RPR-	Não Consta	não	Soro/ plasma	50	20	8	100	sim
SANOPI PASTEUR	Não Tem	não	Soro/ plasma	30	1 gota ⁴	6	não tem	não
TRILAB	Não Tem	não	Soro/ plasma liquor	50	20	4	180	não
WAMA	Não Tem	não	Soro/ plasma	50	20	4	180	não
WIENER	Não Tem	não	Soro/ plasma liquor	50	1 gota ⁵	4	180	sim
VDRL- BRAS-LB	Não Tem	sim 30' 56°C	soro/ liquor	50	17	4	180	sim

¹ 1 gota = 17 µl

² 1 gota = 17 µl

³ 1 gota = 10 µl

⁴ 1 gota = quantidade não especificada pelo fabricante.

⁵ 1 gota = 10 µl

Cálculo da distribuição do χ_r^2 (Prova de Friedman) para todos os kits.

A Prova de Friedman determina se os totais de postos R_j (colunas) diferem significativamente . Para aplicar esta prova, calculamos o valor de uma estatística que Friedman denotou por χ_r^2 . Como o número de linhas e colunas não é pequeno, pode-se mostrar que χ_r^2 tem distribuição aproximadamente Qui-quadrado, com grau de liberdade igual a $(k-1)$. Assim temos:

$$\chi_r^2 = \frac{12}{Nk(k+1)} \sum_{j=1}^k (R_j)^2 - 3N(k+1)$$

Onde:

N = número de linhas

K = número de colunas

R_j = soma dos postos na coluna j

Rejeitamos H_0 se o valor da estatística χ_r^2 for maior que o valor tabelado $\chi_{r-1,5\%}^2$ utilizando-se um nível de significância para o teste de 5%.

Para os dados deste estudo, temos :

$N=21$ soros e $k=12$ kits

$$\sum_{j=1}^{12} R_j^2 = 233113,5$$

Logo:

$$\chi_r^2 = \frac{12}{21 \times 12 \times 13} (233113,5) - 3 \times 21 \times 13 = 853,8956 - 819 = 34,8956$$

g.l. = k-1 = 11 (grau de liberdade)

$\chi_{11,5\%}^2 = 19,675$ (Tabela do χ^2 - Nível de significância de 5%)

R.C. = $\{\chi^2 / \chi_r^2 \geq \text{ou} = 19,675\}$ (região crítica)

$\chi_r^2 = 34,8956 \in \text{R.C.}$

Portanto: χ_r^2 pertence a Região Crítica

Resultados inter-lotes do mesmo fabricante.

VARIAÇÃO DOS RESULTADOS POSITIVOS

Baseados nos resultados do dois lotes da Behring sorteados anteriormente construímos a Tabela 4 que caracteriza os resultados das reações de V.D.R.L. dos 21 soros trabalhados.

Tabela 4- Resultados das reações de VDRL dos soros positivos frente a lotes diferentes de um mesmo fabricante

SOROS POSITIVOS	BEHRING ORAC 300215 B		BEHRING ORAC 300214 A	
	(1)	ORBA 300367 A	(2)	ORBA 300366 B
1		1		1
2		2		1
3		1		1
4		2		2
5		32		4
6		1		1
7		1		2
8		1		1
9		2		1
10		2		4
11		32		32
12		32		256
13		16		32
14		32		128
15		2		4
16		1		1
17		2		4
18		8		32
19		4		4
20		8		64
21		4		8

CÁLCULO DO VALOR DE T, PROVA DE WILCOXON, PARA RESULTADOS DE LOTES DIFERENTES DO MESMO FABRICANTE.

Para testarmos a hipótese nula de que os kits da Behring provenientes de dois lotes distintos não diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros, utilizamos a Prova de Wilcoxon²⁰ já que podemos atribuir maior ponderação a um par que acusa grande diferença no número de fases positivas alcançadas, ou seja, grande diferença no número de diluições alcançadas. Assim consideramos para cada par de resultados, isto é, para o mesmo soro classificado pelos dois lotes diferentes, as diferenças do número de fases (ou diluições) positivas alcançadas por eles (número de diluições do lote 2 menos o número de diluições positivas do lote 1). Desprezamos os pares onde não houve diferenças (soros de número 1,3,4,6,8,11,16 e 19), resultado assim em 13 pares para o estudo. Distribuímos postos com valores absolutos destas diferenças e a cada posto foi atribuído o sinal da diferença obtida em cada par. Os resultados do que foi descrito são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Aplicação da diferenças e postos do número de diluições segundo a Prova de Wilcoxon.

SORO	DIFERENÇAS DO NÚMERO DE DILUIÇÕES	POSTOS DAS DIFERENÇAS DO NÚMERO DE DILUIÇÕES
1	0	-
2	-1	-4,5
3	0	-
4	0	-
5	-3	-12,5
6	0	-
7	1	4,5
8	0	-
9	-1	-4,5
10	1	4,5
11	0	-
12	3	12,0
13	1	4,5
14	2	9,5
15	1	4,5
16	0	-
17	1	4,5
18	2	9,5
19	0	-
20	3	12,0
21	1	4,5

A prova de Wilcoxon considera como igual a T a menor soma dos postos de mesmo sinal (positivos ou negativos), fixa o nível de significância do teste e compara T com um valor de uma tabela própria. Se T superar o valor tabelado, sob o nível de significância fixado e considerando N igual ao número de pares sem empates, rejeitamos a hipótese de que dois lotes distintos proveniente do mesmo fabricante, não diferem quanto a classificação dos diversos soros, ou seja, não geram resultados diferentes.

Para os dados deste estudo temos:

T = 21,5 (menor soma dos postos de sinal negativo)

N = 13 (número de postos com diferenças)

Nível de significância do teste = 0,05 %

DISCUSSÃO

Apresentação dos Kits utilizados na pesquisa

Não existe padronização em relação a identificação de todos os kits trabalhados. São variáveis as formas de codificar cada produto apresentado, ora caracterizando a embalagem ora caracterizando os lotes dos componentes. A maioria não apresenta data de fabricação e são colocados rótulos apenas com o prazo de validade do kit. O número de registro no Ministério da Saúde aparece em apenas 04 (quatro) kits dos 13 (treze) estudados. Dos kits importados nenhum deles traz as informações da bula traduzidas para o português. Um estudo mais detalhado de cada bula não foi nosso objetivo e por isso nos ativemos somente aos dados que interessavam ao trabalho.

Formação do conjunto de soros positivos

A utilização na pesquisa de um conjunto definido de soros positivos conhecido veio em função de algumas dificuldades práticas que foram detectadas quando da programação da execução do trabalho, principalmente na obtenção de um soro padrão da OMS (Organização Mundial da Saúde). Esses soros foram escolhidos não tanto em função da reatividade de cada um deles mas principalmente do volume existente de cada amostra o

que determinou a possibilidade de se trabalhar com todos os soros e todos os kits existentes. Assim, selecionava-se os soros que tinham quantidade suficiente para realizar todas as análises previstas. Foi considerada a reatividade inicial de cada um deles já previamente estabelecida pela soroteca da Área de Dermatologia Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. O conjunto ficou assim formado:

- 04 soros com título 1:1
- 04 soros com título 1:2
- 02 soros com título 1:4
- 02 soros com título 1:8
- 01 soro com título 1:16
- 03 soros com título 1:32
- 02 soros com título 1:64
- 02 soros com título 1:128
- 01 soro com título 1:256

Padrão de floculação

Antes da execução propriamente dita das análises, cada kit foi testado frente a uma solução salina estéril e um soro negativo e não turvo. Verificou-se que quando comparados, apresentavam entre si, intensidade de floculação diferentes e que seria necessário estabelecer um Padrão de Floculação para cada kit sem que ocorresse interferência quando da leitura por um único técnico. Essa é uma das grandes dificuldades existentes na rotina dos Laboratórios do país, já que nem sempre o fornecedor tem a disposição o kit do mesmo fabricante e a variação do Padrão de Floculação nem sempre é vista pelo técnico que executa a rotina. As leituras são tão discrepantes que uma reação poderia ser negativa para um leitor e positiva 1:4 para outro. Em função dessas variações definimos que as análises fossem lidas por apenas um técnico e que a cada kit estudado fosse definido o seu próprio padrão de floculação como forma de apagar a memória fotográfica adquirida pelo técnico no kit trabalhado anteriormente. Não se pode estabelecer um padrão único como se os kits, apesar de definirem uma mesma doença, pertencessem a uma mesma população padronizada. Se atentarmos para variações correspondentes a cada estado clínico da doença as dificuldades de definição dos títulos serão maiores, mesmo para um observador com prática, principalmente nas definições de títulos muito baixos, por exemplo 1:1 e 1:2, quando comparados com títulos negativos.

Execução das análises

Em todas as análises elaboradas na pesquisa foram utilizados kits dentro do prazo de validade e respeitadas todas as orientações dos fabricantes no que diz respeito às condições técnicas inerentes a cada um deles, desde acondicionamento, inativação ou não do soro, volumes pipetados, preparo das soluções de uso quando necessárias, temperatura, umidade, tempo e intensidade de rotação e microscópio. Além desses fatores, já mencionados, foi utilizado somente um leitor para todos os testes.

Análise estatística dos resultados de todos os kits

Considerando os 12 kits estudados como amostras individuais, verifica-se que os mesmos se apresentam numa escala ordinal em função da ordenação do grau crescente de positividade, assim quanto maior a quantidade de anticorpos maior a positividade. O que queremos é comprovar a hipótese nula (H_0) de que os 12 kits provêm da mesma população, ou seja, de que os 12 kits não diferem quanto aos resultados de classificação individual dos soros.

Hipótese estatística:

Queremos testar a hipótese nula:

H_0 : os 12 kits não diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

Contra a hipótese alternativa:

H_a : Os 12 kits diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

Se a hipótese nula de que os kits não diferem quanto a classificação dos diversos soros e portanto, provém da mesma população for verdadeira, espera-se que os postos de 1 a 12 apareçam com frequências aproximadamente iguais. Isto indica que, para qualquer soro, é uma questão de acaso sob qual kit ocorrerá o maior escore. Portanto se os escores dos soros forem independentes dos kits, os totais de postos para as diversas colunas seriam aproximadamente iguais. Se os escores dos soros dependessem do kit utilizado (isto é, H_0 fosse falsa), então os totais de postos variariam de uma coluna para outra. Como todas as colunas contêm o mesmo número de casos (soros), uma afirmativa equivalente seria que, sob H_0 , os postos médios das várias colunas (kits) seriam aproximadamente iguais.

Com a aplicação da Prova de Friedman verificou-se que o valor do χ^2 é igual a 34,8956. Segundo a tabela do χ^2 pertence a região crítica qualquer valor maior ou igual a 19,675.

Logo ao nível de significância de 5%, rejeitamos H_0 , isto é, afirmamos que os kits diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros já que o valor encontrado para o χ^2 pertence a região crítica.

Resultados inter-lotes do mesmo fabricante

Baseados na Tabela 4 verifica-se que existência de discordância na classificação dos resultados dos diversos soros quando comparamos simplesmente os dois lotes analisados. Porém, utilizando a Prova de Wilcoxon temos que testar a duas hipóteses a seguir:

Queremos testar a Hipótese Nula:

H_0 : Os dois kits da Behring provenientes de lotes distintos não diferem quanto aos resultado de classificação dos diversos soros.

Contra Hipótese Alternativa:

H_a : Os dois kits da Behring provenientes de lotes distintos diferem quanto aos resultado de classificação dos diversos soros.

Consultado a tabela própria para a Prova de Wilcoxon, verifica-se que o valor tabelado é igual a 17. Calculamos o valor de $T = 21.5$. Como $T = 21.5 > 17$, não rejeitamos H_0 ao nível de significância de 5%. Assim, nas condições utilizadas no trabalho, onde se utilizou uma painel de 21 soros conhecidos, afirmamos que os dois kits de lotes distintos da Behring não diferem quanto ao resultado de classificação dos soros.

Como a classificação em um dos kits não tendeu sempre a positivar em mais ou em menos fases (diluições) que a classificação do outro kit, havendo alternância em suas classificações (notar soros 5,12 e 20), o teste não foi capaz de detectar diferença entre os dois kits. Vale salientar que dos 21 soros, houve concordância de classificação em apenas 8 deles (38,1%) e que em 5 (23,8%) a discordância na classificação dos resultados foi de duas ou três diluições. Assim, deve-se levar em consideração o fato de termos trabalhado com conjunto de soros conhecido, o que gera interpretações diferentes dos resultados obtidos de pacientes isolados na clínica médica. Assim, um resultado reagente 1/64 pode ser clinicamente diferente de 1/512 quanto é interpretado pelo médico assistente e deve gerar decisões diferentes no tratamento.

CONCLUSÃO

1- Os kits não pertencem a uma mesma família e conseqüentemente, não geram o mesmo resultado frente a um mesmo soro, isto é, diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

2- Há uma variação de resultados entre o mesmo soro quando testado por diferentes kits.

3- Os soros testados por lotes diferentes de um mesmo fabricante, demonstram pertencer a uma mesma família, entretanto apresentam variações nos títulos.

AGRADECIMENTOS

À Área de Dermatologia Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, à Controlbio – São Paulo-SP, ao Laboratório Pró-Exame – Taubaté-SP pela cooperação inestimável durante a execução deste trabalho e a Profa. Rachel Cymrot pela análise estatística dos dados encontrados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. BAREFORD, H.A.- Inapropriate use of Laboratory service: Long term combined approach to modify request patterns. BR Med. J., 301:1305, 1990.
2. CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A. V.; ROCCA, A. ; BELEM, Z.R. – Hemagglutination reagent for the treponemal test of hemagglutination in syphilis. Evaluation of results. Rev. Bras Patol.Clin. 23:42,45, 1987.
3. COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS. Effective Laboratory Testing. College of American Pathologists. 1985.
4. CONN, R.B.- Clinical Laboratories: Profit center, production industry or patient-care recourse ? N.Engl. J.Med., 298:422-7, 1978.
5. CONSTANTINE, N.T.- Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. AIDS, 7:1-13, 1993.
6. CONSTANTINE, N.T., CALHAN, J.D. & WATTA, D.M.- HIV Testing and Quality Control. A guide for laboratory personnel. Publisher: Family Health International, 1991. 170 pp.
7. EDDY, D.M.- Common screening test. Philadelphia: American College of Physicians 1991. Edition . Churchill Livingstone. London. 1975.
8. EISENBERG, J.M. – Na educational program to modify laboratory use by house staff. J.Med.Educ. 32:578-81, 1997.
9. FIELDS, H.A., DAVIS, C.L., BRADEY, D.W. & MAYNARD, L.E.- Experimental conditions affecting the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of hepatitis B surface antigen (HbsAg). Bull. W.H.O.- 61:135-142, 1983.
10. FINEBERG, H.V.- Clinical Chemistry: The high cost of low-cost diagnostic test. In: ALTMAN, S.H. & BLENDEN, R., Eds. Medical Technology: The Culprit Behind Health Care Cost ? Publication (PHS) 79-3216. U.S. Dep. Of Health Education and Welfare, 1979, pp 144-65.
11. FRASE, C.G.. Interpretation of clinical laboratory data. Oxford. Blackwell Scientific. 1986.
12. GRINER, P.F. – Medical House Staff. Use of laboratory tests in a teaching hospital. Long term trend: Reductions in use and relative cost. Ann. Intern. Med., 90:243-8, 1979.
13. GRINER, P.F. & GLASER, R. – Misuse of laboratory and diagnostic procedures. N.Engl. J. Med., 307:1336-9, 1982.

14. HANNING, I. & FRASER, C.G. - Why quality ? The effects of performance on clinical decision-making. The British Council. Effective quality assurance for clinical laboratories. Birmingham. 1996.
15. HARRISON, T.C.; MALIC, A .0- Immunoassays . In: Quality Control - Principles and practice in the Microbiology Laboratory. Public Health Laboratory Service. London. 1991.
16. MARTIN, A.R.; WOLF, M.A. & THIBODEAU, L.A . - A trial of two strategies to modify the test-ordering behavior of medical residents. N.Engl.J.Med, 303:1330-6, 1980.
17. O.M.S- Manual de reações para el diagnostico de la sífilis. Publication Científica No. 311. 1975.
18. QUALITY ASSESMENT AND IMPROVEMENT. In: 1992 Joint Commission Accreditation manual for hospital. Oakbrook Terrace. II: Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations, 1991, pp. 137-43.
19. RHYNE, R.L.; GEHLBACH, S.H.- Effectsof a educational feedback strategy on physician utilization of thyroid function test. Farm. Pract., 8:1003-7, 1079.
20. SIEGEL, S.- Estatística não paramétrica (para ciências do comportamento). Editora McGraw-Hill. 1975.
21. SOX, H.C.JR.- Common Diagnostic Test: Use and Interpretation. Philadelphia: American College of Physicians. 1990.
22. TAYLOR, R.N.; HOUNG, A .Y.; FULFORF, K.M.; PRZYBYSZEWSKI, V.A. & HERN, T.L.- Quality control for immunology tests. U.S. Dept. of Health Hum. Serv. - CDC, HSH, 82:8376, 1979, 111p.
23. W.H.O. - Guidelines for national external quality assessment schemes for HIV serological testing. Global Program on AIDS. WHO, 1991, 15p.
24. WINKELMAN. J.W.- Less utilization of the clinical laboratory procedures disproporcionales small true cost reductions. Human Pathol., 15:499-501, 1984.

Endereço para correspondência : Dr. Jansen Pacheco Nunes
Rua XV de Novembro ,190 - Centro
12020.000 – Taubaté – São Paulo - Brasil
E-mail: proexame @iconet.com.br

CONTROLE DE QUALIDADE DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS (CP)

Márcia R. Buchignani, Elenice Deffune, Gislene C. Mastranjo, Maria I.M.C.Pardini, Carlos R. Padovani* e Paulo E. A. Machado.

Hemocentro de Botucatu - HC/FMB - Departamento de Clínica Médica – UNESP - Botucatu/SP * Departamento de Bioestatística, IB – UNESP

RESUMO

A obtenção de Hemocomponentes lábeis, seu controle e importância na prática hemoterápica tem merecido especial atenção dos profissionais da saúde em todo mundo. Visando a atingir qualidade — programa Hemocentro 2000 — objetivou-se estandardizar a produção de concentrado de plaqueta (CP) que estivesse dentro dos padrões internacionais descritos. Neste sentido, os seguintes parâmetros foram monitorados: 1) calibração sistemática dos equipamentos envolvidos no processo; 2) determinação do tempo ideal de coleta de sangue para produção de CP; 3) escolha do melhor método de determinação de pH, volume e hematimetria. Os resultados obtidos levaram à reformulação dos procedimentos técnicos adotados. Constatou-se que: 1) a instalação do controle de qualidade no serviço gerou certa animosidade que dificultou em parte a obtenção dos dados; 2) na validação do equipamento, concluiu-se que a centrifuga produzida no Brasil não atinge velocidades exigidas pela técnica de calibração, não sendo, portanto, indicada para este fim; 3) foram monitorados diferentes intervalos de tempo, sendo que os CPs produzidos a partir de sangue total colhido em intervalo de tempo inferior a oito minutos, deram os melhores resultados; 4) determinou-se o pH por três diferentes métodos: pHmetro (pHMETER HM-6A®) e aparelho de gasometria NOVA Star Profile Plus 5®. A determinação do pH pelo método de fita, simples, rápido, de baixo custo deu os mesmos resultados dos dois métodos comparativos, sendo indicado seu uso antes da liberação imediata do hemocomponente; 5) após determinação de centrifuga que teve melhor desempenho, definiu-se o melhor técnico, concluindo que este corresponde ao único técnico de nível superior da equipe. Estes resultados, estatisticamente validados, apontam para a indiscutível necessidade do investimento continuado para qualificação de recursos humanos.

PALAVRAS CHAVES

Banco de Sangue, Plaquetas, Controle de Qualidade, Hemocomponentes.

summary

Labile hemocomponents obtaining, its control and importance in homotherapeutic practice has received special attention from health professionals all over the world. In order to reach quality – Hemocenter Program 2000 – it was aimed to standardize the production of platelet concentrate (PC) which was under the described international standards. Therefore, the following parameters were evaluated: 1) systematic calibration of processing equipments; 2) determination of ideal time for blood collecting for PC production; 3) choosing the best method for pH determination, volume and hematimetry. Obtained results led to reformulation of adopted technical procedures. Its was concluded that: 1) implantation of service quality control raised some hostility which made it somewhat difficult to obtain data; 2) it was concluded, for equipment validation, that Brazilian centrifuging machine did not reach the speed required for technical calibration what made it not reliable for such work; 3) different time intervals were observed and it was concluded that PCs produced from total blood collected in a time interval inferior to 8 minutes showed the best results; 4) pH was determined through 3 different methods: pHmeter (Phmeter hm-6A®), gasometry apparatus NOVA Star Profile Plus 5® and pH determination through thread method which is simple, fast and cheap showed the same results as the two comparative methods which are indicated to be used before immediate homocomponents liberation; 5) after determination of the best centrifuging it was determined the best technician who is the only one with corresponding university degree in the team. Such results, statistically validated, show a great necessity of a continuous investment on personnel qualification.

KEY WORDS

Blood Banking, Platelets, Quality Control, Hemocomponents

INTRODUÇÃO

A obtenção de Hemocomponentes lábeis, seu controle e importância na prática hemoterápica tem merecido especial atenção dos profissionais da saúde em todo o mundo. No entanto, isto só é possível se houver controles que permitam a validação do produto: reduzindo contaminantes celulares, minimizando os efeitos imunológicos, selecionando produtos compatíveis com o sistema HLA do paciente, garantindo a segurança transfusional, não só através de testes sorológicos, mas também assegurando sua viabilidade e eficácia terapêutica.

Objetivando um programa de qualidade, o Hemocentro de Botucatu elaborou plano de standardização de Concentrado de Plaqueta (CP), desde a elaboração de manuais técnicos, definidos mais recentemente como Procedimentos Operacionais Padrão (POP), lembrando que qualidade deva ser definida como sendo um conjunto de características de um determinado produto ou serviço em satisfazer o usuário, no caso o paciente.

O Setor de Produção de Componentes Lábeis é regido por POPs que devem prever sistematicamente: formação e reciclagem contínua do pessoal; registro adequado e fácil acesso aos dados laboratoriais, mantidos em duplicatas, principalmente nos serviços informatizados; registro do controle térmico dos equipamentos, tais como: banho-maria, *freezer*, geladeira, câmara fria, etc.; garantia de sigilo e proteção de todas as informações registradas; manutenção adequada de equipamentos; inspeção e calibragem periódicas dos equipamentos, devendo os métodos utilizados ser monitorados; segurança do produto obtido, controlado e liberado para uso terapêutico; produto de acordo com as especificações técnicas, previstas nos manuais internos; produto rejeitado (fora das normas) pelo CQ, eliminado do uso terapêutico. É preciso que, através das normas, se preveja(m) o(s) problema(s) e se lhes remova a causa básica; manuseio, armazenamento e embalagem adequados, sem danificação para o produto; *feedback* preciso, através da apresentação e discussão dos resultados do CQ, pelos chefes de setores e direção geral; adequada documentação sobre todos os resultados de controle dos produtos; motivação do trabalho técnico, para garantir-se a segurança do produto, explicando-se por que os procedimentos de controle são necessários; auditoria(s) do(s) processo(s) para se determinar se estão sendo efetuadas verificações apropriadas, exigidas legalmente, e se os produtos aceitos ou rejeitados são monitorados durante todo o processo de obtenção; planejamento e execução de novas técnicas de controle, avaliando-se os seus resultados e validando-as, para instituí-las na rotina do controle.

Os CPs, obtidos por citocentrifugação da bolsa de sangue total tripla, cujo plástico é para conservação de plaquetas durante 5 dias (Calhoun,1996) (ASEM® , HEMOBAG® , BAXTER®) foram controlados nos parâmetros classicamente definidos, como: volume, temperatura de estoque e condição de armazenamento (Katz et al, 1976). Atualmente, em determinados serviços, são realizados controles de qualidade extremamente rigorosos, chegando-se, inclusive, a avaliar a forma , densidade das plaquetas, testes de recuperação *in vivo*, além da avaliação microbiológica (Arpi et al,1993; Murphy et al,1994 ; Sazama,1994), testes não realizados neste trabalho.

Objetivou-se: estabelecer um programa de calibração sistemática de equipamentos; ajustar as centrífugas para a obtenção específica de CP; estabelecer parâmetros rígidos de controle dos CPs, baseados inicialmente em: constatação do seguimento do manual existente, determinação de volume, pH e hematimetria; controlar e avaliar o tempo de coleta que resulta em hemocomponente de melhor qualidade; estabelecer as diferenças qualitativas entre os técnicos do setor; promover, através de formação continuada, readequação e atualização técnicas, baseadas nas dificuldades diagnosticadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 504 CP *standard* no dia 1 (D1) da preparação num período de sete meses, durante os quais se padronizaram as centrífugas a serem utilizadas na realização do CP, em função dos seus respectivos raios. Segundo Cavalier e a AABB, o sangue total deve ser submetido a uma centrifugação de 2000 g, durante 3 minutos, e o plasma rico em plaquetas (PRP), a uma centrifugação de 5000 g, durante 5 minutos. Aplicando-se a fórmula: $rcf = 0.0001118 \cdot R \cdot N^2$, onde *rcf* = *relative centrifugal force*, R = raio da centrífuga em cm, N = rotação por minuto.

Uma vez padronizada esta fórmula foram identificadas como C1 = FANEN F22®, com raio de 20,3 cm e C2 = MLW Eletronic K 80®, com raio de 26,83 cm, a qual foi anotada pelo técnico no momento da separação do hemocomponente juntamente com sua rubrica. Através desta, os três técnicos foram identificados como técn. 1, técn. 2 e técn. 3, posteriormente.

Com o intuito de se comprovar a influência do tempo de coleta, na qualidade numérica e funcional dos CPs, segundo dados de publicações, optou-se pela cronometragem da coleta (Reiss & Katz, 1976). Mondaine Stop Watch® e os tempos de coleta foram divididos em intervalos. Sendo o T1 ≤ 5 minutos; o T2 = 5 6; T3 = 6 7; T4 = 7 8; T5 = 8 12.

Os parâmetros controlados foram volume, pH por três diferentes métodos: pH1 em pHmetro pH METER HM-6A®, pH2 em fita Merck®, pH3 em aparelho de gasometria NOVA Star Profile Plus 5®, contagem plaquetária no aparelho Coulter T-890®, cujo valor final se obteve em função do volume do CP obtido.

O método estatístico aplicado utiliza medidas da centralidade e da variabilidade dos dados (Padovani, 1991; 1995) e posteriormente, com a construção dos limites de confiança, para a resposta média, assim como com composições de interesse entre tempo, técnico e centrífuga.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os controles envolveriam a qualidade da formação de recursos humanos, equipamentos, metodologias utilizadas e avaliação dos controles existentes. Spackman & Beck, em 1990, publicaram um trabalho a respeito do monitoramento dos recursos humanos e da verificação da qualidade de componentes sanguíneos, correlacionando-os com os possíveis efeitos deletérios que produtos não controlados provocam nos pacientes (Aster, 1995).

As primeiras constatações foram a indisposição e o desconforto, ocorridos dentro do setor de produção de componentes lábeis, pois as pessoas, apesar da clara exposição de motivos feita previamente, sentiam-se mal, por estarem sendo observadas, e muito mais desconfortável ainda, pelo fato de seu trabalho estar sendo monitorado. Isto criou, por determinado tempo, oposição ao controle. Esta é uma posição extremamente preocupante, pois, segundo Arnold, um projeto de qualidade não pode limitar as pessoas, vestir na equipe uma camisa de força, mas sim proporcionar-lhes maior rendimento e melhor entrosamento nas atividades realizadas.

Os resultados dos testes realizados foram comparados com os definidos internacionalmente, para CP *standard*: $\geq 5,5 \times 10^{10}$ plaquetas por unidade, pH de 6,4 a 7,4 e volume de 45 a 60 ml (Cavalier, 1987; AABB, 1990; Brozovic et al, 1992; Stivala & Wagstaff, 1994). Todas as conclusões foram discutidas no nível de 5% de significância, sendo que o respectivo intervalo de confiança corresponde à confiabilidade de 95%.

Após o estudo individual de todos os dados, elegeram-se como tempos ideais os codificados como T1 e T3, que correspondem, respectivamente, ao sangue coletado num período ≤ 5 minutos e entre 6,1 e 7 minutos, inclusive. Esta decisão baseou-se no julgamento da contagem plaquetária e na determinação do pH dos CPs, obtidos nas duas centrífugas, em função dos três técnicos (tabelas 1, e 2). Estes resultados

confirmam o que Cavalier, em 1987, já constatou que sangue coletado com tempo superior a 12 minutos é considerado inadequado para a produção de plaquetas. Estes autores baseiam-se no fato de que sangue coletado lentamente propicia a formação de microcoágulos, o que determina a baixa da qualidade dos CPs.

Objetivando-se avaliar as condições técnicas de cada profissional, consideraram-se: o resultado da variável volume nos produtos (cabe lembrar que o volume de plasma residual depende, quase que exclusivamente, do técnico manipulador) e os resultados hematimétricos.

Conclui-se que o profissional, codificado como Técn. 3, o único com nível superior, foi o que obteve melhor desempenho. O Técn. 1 obteve resultados desfavoráveis, nos diferentes parâmetros estudados, mas foi o volume o determinante dos maiores erros. Os resultados do Técn. 2, no global, foram inferiores aos do eleito como o melhor.

Na validação das centrífugas ocorreram dificuldades iniciais, as quais se baseiam no fato de que a centrífuga FANEM F22® não atinge a velocidade necessária para a centrifugação. Como se trata de um equipamento nacional, largamente utilizado para esse fim, adaptou-se a rotação, na segunda fase, para 3600rpm, durante 10 minutos; embora os cálculos exigissem uma velocidade de 4693rpm.

Para a avaliação dos resultados que elegeram a centrífuga que atingiu os objetivos de qualidade internacionalmente, levaram-se em consideração: o melhor intervalo de tempo (junção de T1 e T3) e o técnico de melhor desempenho.

A tabela 3 é uma apresentação resumida dos resultados comparativos das duas centrífugas estudadas. Os dados hematimétricos são evidentes. A centrífuga FANEM F22® não permite a obtenção de CPs, dentro dos padrões de qualidade estabelecidos. A constatação de que se obtém como limite inferior $1,66 \times 10^{10}$ e limite superior $2,6 \times 10^{10}$, para um valor esperado superior ou igual a $5,5 \times 10^{10}$, mostra sua inadequação. Para se obter o mesmo efeito terapêutico nos pacientes, seria necessário transfundir, no mínimo, 2,7 vezes mais hemocomponentes. Inúmeras são as conseqüências deste ato: aumento dos riscos imunológicos (Grijnhout, 1994; Mollison, 1989) e infecciosos (Genetet, 1990) para os pacientes.

O volume, aceito pela maioria dos autores como ideal, varia entre 45-60 ml, sendo histórica a importância da conservação das plaquetas, Holme, em 1994, publicou que volumes de plasma aumentam os riscos de diminuir o pH e também os da ativação da plaquetas.

Para o pH não foram detectados valores fora do padrão pelos três diferentes métodos, utilizados neste estudo, assim como não foram observadas interferências, quer das centrífugas, quer dos técnicos. Constatou-se que a fita Merck®, empregada para a determinação rápida do pH, é um instrumento fidedigno, podendo ser utilizada na prática para este fim, antes da liberação da bolsa de CP ao paciente. Alguns pesquisadores acreditam que a função plaquetária está prejudicada em níveis de pH entre 6,0 e 6,5 (Pisciotta, 1991). Por isso, determinou-se que, para este trabalho são aceitas como plaquetas adequadas para a transfusão aquelas com pH entre 6,4 e 7,4.

Com os resultados hematimétricos, podemos constatar que os técnicos influenciam diretamente na qualidade do produto final, porque são os manipuladores. Quando estão irritados e agitados, interferem diretamente na qualidade final dos CPs.

O figura 1 mostra a interferência das centrífugas na contagem plaquetária, sendo este um indicador essencial da qualidade dos produtos (Mcshine et al, 1991). Isto é extremamente preocupante, pois o único fabricante nacional de centrífugas refrigeradas, e que domina o mercado interno, coloca à disposição dos Centros de Transfusão Sangüíneas no Brasil equipamentos que não atingem os objetivos. Isto leva, sem dúvida, a um prejuízo terapêutico clínico ao paciente, através de ineficácia transfusional, acarretando um número maior de transfusões com conseqüente aumento dos riscos infecciosos e imunológicos, embutidos em toda transfusão. Além destes fatos, há a conseqüência econômica que gera aumento de faturamento ao Sistema Único de Saúde, sem representar melhora do atendimento ao paciente.

CONCLUSÕES

- É importante o monitoramento do tempo de coleta para a obtenção de bons CPs.
- Sugere-se que sejam realizados CPs, somente nas unidades de sangue, coletado num tempo inferior ou igual a 8 minutos.
- É obrigatório o controle de qualidade dos produtos a serem transfundidos.
- A formação contínua, a reciclagem e a qualificação pessoal é um importante item na obtenção de hemocomponentes de qualidade.
- Hemocomponentes de qualidade esperada só foram obtidos por técnicos de nível superior.
- A determinação de pH por fita é um método seguro para a finalidade à qual se destina.
- Deve-se determinar, sistematicamente, o pH de todo CP, antes da sua imediata liberação.
- A centrífuga FANEN F22® não deve ser utilizada com a finalidade de obtenção de CPs.

Referências Bibliográficas

- AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Technical manual**. 10.ed. Arlington, 1990. p.48,49,637-41.
- ARNOLD, k. L. **O guia gerencial para o ISO 9000**. Rio de Janeiro: Campus, 1994, 400p.
- ARPI, M et al. A novel screening method for the detection of microbial contamination of platelet concentrates. **Vox Sang.**, v.65, p.335-6, 1993.
- ASTER, R. H. What makes platelets go ? the cloning of thrombopoietin. **Transfusion**, v.35, p.1, 1995.
- BROZOVIC, B., SEGHATCHIAN, M. J., MCSHINE, R. L. The use of mean platelet volume for evaluation of quality of platelet concentrates. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v.3, p.629-31, 1992.
- CALHOUN, L Blood product preparation and administration. In: PETZ, L. D. et al. **Clinical practice for blood transfusion**. New York: Churchill Livingstone, 1996, p.305-33.
- CAVALIER, J. **Preparation, controle de qualité et conservation des concentrés de plaquettes et de granulocytes à usage clinique** , Paris:Ints, 1987. 44p.
- GENETET, B., ANDREU, G.,BIDET, J-M. **Aide memoire de transfusion**. Paris: Editora Flammarion, 1990, p.243-50.
- GRIJZENHOUT, M. A. et al. UVB Irradiation of human platelet concentrates does not prevent HLA alloimmunization in recipients. **Blood**, v. 84, p.3524-31, 1994.
- HOLME, S.,HEATON, W. A., MOROFF, G. Evaluation of platelet concentrates stored for 5 days with reduced plasma volume. **Transfusion**, v.34, p.39-43, 1994.
- KAHS, R. A., COSSETTE, I., FRIENDMAS, L. I. Optimum centrifugation conditions for the preparation of platelet and plasma products. **Transfusion**, v.16, p.162-5, 1976.
- MCSHINE, R. L.et al. Effect of EDTA on platelet count and other platelet parameters in blood and blood components collected with CPDA - 1.**Vox Sang.**, v.61, p.84-9,1991.
- MOLLISON, P.L. **Blood transfusion in clinical medicine**. London: Blackwell, 1989, p.84-144
- MURPHY, S et al. In vitro assessment of quality of stored platelet concentrates. **Transfus. Med. Rev.**, v.8, p.29-36, 1994.
- PADOVANI, C. R. Estatística na metodologia da investigação científica. **USC Bol. Cult.** v.9, p. 1-22, 1991.

PADOVANI, C. R. Noções básicas de bioestatística. In: CAMPANA, A. O. **Introdução à investigação clínica**. São Paulo: Trianon, 1995. p. 111-42.

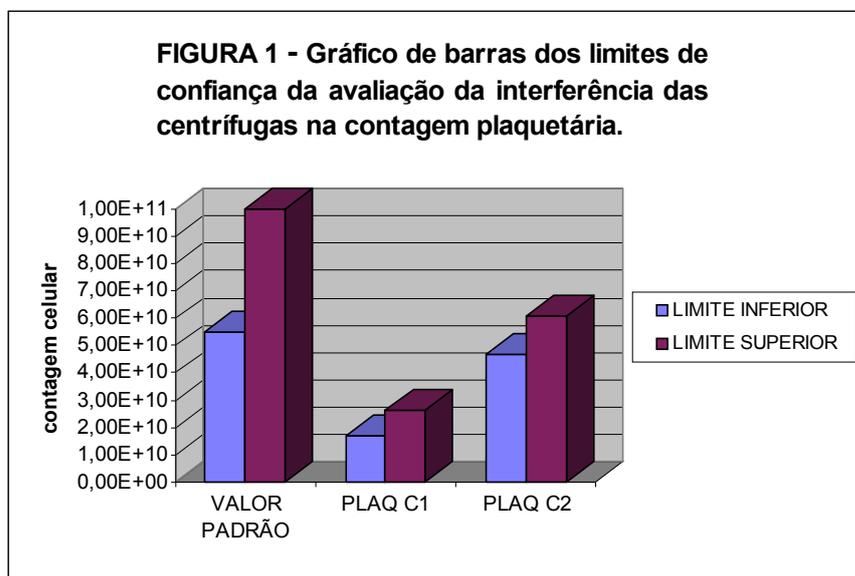
PISCIOTTO et al. In Vitro characteristics of volume-reduced platelet concentrate stored in syringes. **Transfusion**, v.31, p.404-8, 1991

REISS, R. F., KATZ, A. J. Optimizing recovery of plaquetelets in platelet rich plasma by the simplex strategy. **Transfusion**, v.4, p.370-4, 1976.

SAZAMA, K. Bacteria in blood for transfusion. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.118, p.350-64, 1994.

SPACKMAN, K. A. , BECK, J. R. A. Knowledge-based system for transfusion advice. **An. J. Clin. Pathol.**, v.94, Suppl 1, p.525-9, 1990.

STIVALA, J. F. A., WAGSTAFF, W. Quality assurance in blood transfusion. **Vox Sang.**, v.67, Suppl 5, p.37-42, 1994.



Determinação de Ferritina: Plasma ou Soro ?

GUERRA-SHINOHARA, Elvira M.*; RUVIERI, Valter; SANTOS, Hosana G.*; PAIVA, Rosângela P.*; NUÑEZ, Luz-Marina***; SZARFARC, Sophia C.****; VAZ, Adelaide J.*******

* Seção de Hematologia, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.
Av. Dr Arnaldo, 355 Cerqueira Cezar
São Paulo, SP CEP 01246-902 Brasil.

** Seção de Bioquímica, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

*** Faculdade Ciências da Saúde, Universidade de Cajamarca, Peru.

**** Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública,
Universidade de São Paulo.

***** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da USP.

RESUMO: A concentração de ferritina sérica está diretamente relacionada ao estoque de ferro no organismo. Esta determinação é útil no diagnóstico e tratamento da deficiência de ferro, e em estados onde ocorre sobrecarga de ferro tais como na talassemia e anemia sideroblástica. Os testes utilizados atualmente são baseados em métodos imunológicos, empregando anticorpos anti-ferritina. Alguns fabricantes de kits recomendam o uso somente de soro, e outros de soro e plasma para esta determinação. Para a obtenção de plasma usa-se anticoagulantes; dos disponíveis, o EDTA é o anticoagulante de escolha no Laboratório de Hematologia. O objetivo deste trabalho foi determinar a ferritina sérica e plasmática (com uso EDTA) de 109 amostras através do kit IMx^R ABBOTT (enzimaimunoensaio com micropartículas). Com o uso do anticoagulante K₃EDTA houve uma grande variação nos resultados obtidos, mostrando que os valores da ferritina plasmática apresentaram-se muito mais baixos (em algumas amostras esta redução foi de até 100 %) quando comparados com os valores obtidos no soro do mesmo paciente. Em média, houve uma redução significativa em torno de 61% dos valores da ferritina obtida no respectivo soro, confirmando que o

EDTA não deve ser utilizado como anticoagulante na determinação da ferritina.

SUMMARY: Serum ferritin concentration is directly related to iron stores in organism, it is extremely useful on diagnosing and monitoring hypoferremia and diagnosing anemias where iron overloading occurs (thalassemia and sideroblastic anemia). The determination of serum ferritin is based on immunologic methods, with anti-ferritin antibodies. Some manufacturers recommend the use of serum or plasma for this determinations. The K₃EDTA is the anticoagulant mainly used in routine of Hematology Laboratory. Our propouse was to analyse one hundred nine samples by ABBOTT IMx^R enzyme immunoassay on microparticles using plasma and serum of each patient. It was observed a high variation between serum and plasma (K₃EDTA). The plasma sample usage resulted in lower results (up to 100%) than the respective serum sample. The mean reduction in the group of plasma was close to 61% when compared with the sera group. The results show that plasma (EDTA) cannot be used on ferritin determination.

INTRODUÇÃO

A ferritina consiste em uma concha com subunidades de proteínas (apoferritina) ao redor de uma micela de hidroxifosfato férrico. A sua função é de estoque de ferro no organismo, principalmente no baço, fígado e medula óssea, no qual o ferro é depositado e do qual pode ser mobilizado quando necessário (CRICHTON, 1971).

A concentração da ferritina sérica está diretamente relacionada às concentrações de ferro em estoque no organismo (WALTERS et al., 1973; KRAUSE & STOLC, 1979).

A determinação da ferritina é útil para o diagnóstico e monitoramento de estados de hipoferremia, tais como em condições onde ocorre a deficiência de ferro (HERSKO et al., 1979). Concentrações de ferritina sérica inferior a 10 µg/l são encontradas na anemia por deficiência de ferro (JACOBS et al., 1972; FAIRBANKS & BEUTLER, 1995); concentrações entre 10 e 20 µg/l podem ser indicativas desta deficiência, mas não dá diagnóstico (FAIRBANKS & BEUTLER, 1995). Pode ainda ser utilizada no controle da terapia com ferro até a reposição dos estoques.

Nos estados onde ocorre sobrecarga de ferro, tais como na talassemia e anemia sideroblástica, a determinação da ferritina pode ser utilizada como meio de medir a eficácia do tratamento com quelantes de ferro (deferroxamina) (SCHETTINI et al, 1981).

Tem sido descrito na literatura um aumento na concentração da ferritina sérica em estados de inflamação e neoplasias (MARCUS & ZINBERG, 1975; DÖRNER et al., 1983; MAXIN & VELTRI, 1986; FAIRBANKS & BEUTLER, 1995).

Os testes utilizados para a determinação de ferritina utilizam anticorpos anti-ferritina em métodos imunológicos de detecção de antígenos, e utilizam metodologias tais como: nefelometria, radioimunoensaio, enzimaensaio e quimioluminescência.

Alguns dos fabricantes de kits para determinação da ferritina citam em suas bulas que a amostra pode ser soro ou plasma. Os fabricantes do kit IMx^R System Ferritin ABBOTT (enzimaensaio com micropartículas) relatam que pode ser utilizado soro e plasma, no entanto o plasma só pode ser utilizado com o uso da heparina. No kit Baxter Stratus^R Ferritin Fluorometric Enzyme Immunoassay, Divisão Dade, há a recomendação de que pode ser utilizado soro ou plasma, desde que o plasma seja colhido com oxalato ou citrato de sódio. Já os fabricantes dos kits N-latex-Ferritin BEHRING (nefelometria automatizada), Coat-A-Count^R Ferritin IRMA (radioimunoensaio) e do CHIRON Diagnostics ACS:180 Ferritin assay (sistema de quimioluminescência automatizada) recomendam apenas a utilização do soro para a análise da ferritina.

No dia a dia do laboratório de Hematologia, o EDTA é o anticoagulante de escolha, pois não dilue o sangue e não altera a morfologia das células sanguíneas. A proporção de anticoagulante/sangue é de 1/100. Após a coleta do sangue a concentração final da solução de K₃EDTA é de 3,4 mM. Sendo amplamente utilizado para a coleta de sangue onde serão realizados os hemogramas.

A heparina pode ser utilizada na concentração de 10-20 UI por ml de sangue, é efetiva como anticoagulante e não altera a morfologia dos eritrócitos. A ação anticoagulante da heparina é devida principalmente, à capacidade de ligação com a antitrombina III, desse modo acelerando e aumentando a razão de inibição da maioria das enzimas da coagulação, isto é os fatores IIa e Xa e menos os fatores IXa, XIa e XIIa (DACIE & LEWIS, 1995).

Os anticoagulantes citrato de sódio e oxalato de sódio são utilizados na proporção de 1ml de anticoagulante para 9 ml de sangue,

diluindo portanto o sangue. Não devendo ser utilizados estes anticoagulantes para dosagens bioquímicas e morfológicas.

O EDTA é um ligante hexadentado que forma complexos estáveis com vários íons metálicos (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , ...). É um agente sequestrante (quelante), pois ao reagir com estes íons metálicos controlam a sua concentração na solução. Hexadentado porque possui 4 oxigênios e 2 nitrogênios em posição e distâncias necessárias para “abraçar” o metal e formar um composto octaedro, pois estes átomos são eletronegativos e possuem um par de elétrons livres para que possa ocorrer a ligação com o metal (vide Figura 1). As constantes de formação (K_f) dos complexos metálicos com EDTA são altíssimas o que comprova a sua grande estabilidade. O $\log K_f$ para o Fe^{3+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} são, respectivamente: 25,1; 14,33 e 10,70 (SKOOG & WEST, 1969).

O EDTA reage com o cálcio formando um complexo estável, tornando-o indisponível ao mecanismo de coagulação, agindo como anticoagulante. O EDTA “quela” os cátions na proporção 1:1, ou seja, uma molécula de EDTA complexa com uma molécula do cátion, independente da sua carga.

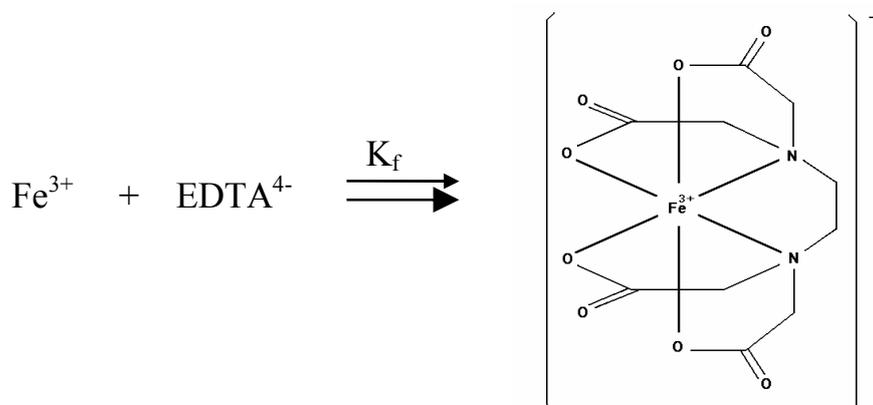


Figura 1 - Reação de complexação entre o íons férrico e EDTA.

Essas modificações podem introduzir alterações moleculares na estrutura da ferritina, modificando os peptídeos antigênicos reconhecidos pelos anticorpos de captura.

O objetivo do trabalho foi estudar o efeito do anticoagulante EDTA na determinação da ferritina sérica, uma vez que este é o anticoagulante mais utilizado em hematologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 109 amostras de sangue de gestantes utilizando soro e plasma de cada amostra, através do kit IMx ABBOTT (enzimaimunoensaio com micropartículas).

O fabricante indica apenas o uso de heparina como anticoagulante.

O plasma foi obtido utilizando-se o K₃EDTA como anticoagulante, através do uso de tubos à vácuo (vacutainer^R tubes, Becton Dickinson). Não foram estudados outros anticoagulantes por serem de pouco uso na rotina laboratorial. Além disso, é frequente que a solicitação de dosagem de ferritina venha acompanhada do pedido de eritrograma, este sempre realizado em amostra colhida com EDTA.

Kit IMx (Abbott Laboratories, USA): o método é totalmente automatizado (IMx System Operation) e baseia-se na captura de ferritina por micropartículas sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-ferritina. Um segundo anticorpo policlonal anti-ferritina marcado com fosfatase alcalina liga-se à ferritina sérica capturada. Esse imunocomplexo formado é transferido para uma matriz de fibra de vidro que se liga irreversivelmente às micropartículas. Após lavagens para remoção de proteínas não complexadas, é adicionado o substrato fluorogênico 4-metil-umbeliferil-fosfato que, na presença da fosfatase forma produto fluorescente cuja emissão de luz é lida pelo equipamento. A intensidade de leitura é proporcional à concentração de ferritina capturada, tornando o método quantitativo.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o Teste t de Student para comparar os valores obtidos no soro e no plasma.

RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados resultados, médias e os desvios-padrão, obtidos quando utilizamos plasma (com EDTA) e soro.

Tabela 1 - Distribuição das médias e desvios padrão das dosagens de ferritina no soro e no plasma (K₃EDTA)

Amostra	Média (µg/L)	Desvio Padrão ±
Soro	28,31	26,49
Plasma	11,01	11,95
Diferença soro-plasma	17,30	15,08

t calculado = 11,98

t crítico, 5%, 108 = 1,984

p<0,0001

Na Figura 1 são apresentados os valores obtidos da ferritina quando foram utilizados os soros e os plasmas de cada paciente.

DISCUSSÃO

Com o uso do anticoagulante K₃EDTA houve uma grande variação nos resultados obtidos, mostrando que os valores da ferritina plasmática apresentaram-se muito mais baixos quando comparados com os valores obtidos no soro do mesmo paciente. Em média, houve uma redução significativa em torno de 61% dos valores da ferritina sérica, o que pode ser observado na Tabela 1.

Em algumas amostras esta redução foi de até 100 % resultando em valores indetectáveis, como pode ser observado para as amostras 1, 2, 3, 8 e 41. (vide Figura 1)

A discordância de resultados foi confirmada pelo teste t de Student, que resultou em $p < 0,0001$, ou seja há diferença entre os resultados dos grupos.

Na Figura 1 são apresentados os valores obtidos da ferritina quando foram utilizados os soros e os valores obtidos com a utilização dos plasmas, mostrando que não existe uma proporção constante entre as concentrações de ferritina sérica e plasmática. Caso isso tivesse ocorrido seria possível a utilização da ferritina plasmática após correção.

Nas amostras analisadas de sangue total foi respeitado a proporção anticoagulante/sangue, não havendo excesso de K_3EDTA , além daquele recomendado na literatura. Se não fosse respeitado esta proporção haveria mais excesso de anticoagulante e com isto poderia haver uma perda maior.

Os valores da ferritina encontrados no plasma, não são homogêneos pois dependem da concentração do ferro sérico da amostra. O ferro se encontra no plasma/soro, na forma de ferro sérico (Fe^{+3} ligado a transferrina) em concentrações de 75 a 135 $\mu g/dl$ e em pequena concentração (acima de 1,2 $\mu g/dl$) na forma de ferritina (Fe^{+3} ligado a apoferritina). As amostras analisadas eram de gestantes, apresentaram ferritina sérica variando de 3,29 a 135,39 $\mu g/L$, sendo que 84 (77,1%) amostras tiveram resultados inferiores a 40 $\mu g/L$.

A redução nos valores da ferritina plasmática poderia ser outra se a amostra tivesse soros e plasmas com distúrbios hematológicos onde há sobrecarga de ferro, pois é desconhecido o quanto há de perdas na determinação da ferritina quando temos dosagem de ferro sérico normal ou aumentado.

Se o critério adotado para caracterizar possíveis deficientes de ferro fosse concentração inferior a 20 $\mu g/L$ de ferritina sérica, obtivemos que 34 (31,2%) amostras de plasma tiveram valores inferiores a 20 $\mu g/L$ e no soro estes valores foram superiores a 20 $\mu g/L$.

Os resultados apontam para a recomendação, quando da execução dos testes, de utilizar apenas soro.

O uso de EDTA parece não estar indicado mesmo pelos fabricantes. Mas aqueles que recomendam o teste em plasma podem induzir o uso de EDTA na obtenção rotineira da amostra.

CONCLUSÃO

O plasma (EDTA), o anticoagulante mais frequentemente utilizado na rotina laboratorial, não pode ser utilizado para a determinação de ferritina pelos métodos atualmente disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRICHTON, R.: Structure, synthesis and function. **N. England J. Med.** 1971: **24**: 1413-22.
- DACIE, J. V. & LEWIS, S.M. - **Practical Hematology**. 8 ed. Churchill Livingstone, New York, 1995.
- DORNER, M.H.; ABEL, U.; FRITZE, D.; MANKE, H.G.; DRINGS, P. - Serum ferritin in relation to the course of Hodgkin's Disease. **Cancer** 1983: **52**: 2308-12.
- FAIRBANKS, V.F. & BEUTLER, E. Iron deficiency. In: BEUTLER, E; LICHTMAN, M.A; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J. **Williams Hematology**. 5. ed. New York, McGraw Hill, 1995. p.490-510.
- HERSKO, C.; KONIJN, A.M.; LORIA, A. - Serum ferritin and mean corpuscular volume measurement in the diagnosis of β - thalassaemia minor and iron deficiency. **Acta Haemat.** 1979: **62**: 236-39.
- JACOBS, A.; MILLER, F.; WORWOOD, M.; BEAMISH, M.R.; WARDROP, C.A. - Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. **Br. Med. J.** 1972: **4**: 206-8.

- KRAUSE, J.R. & STOLC, V. - Serum ferritin and bone marrow iron stores. I. Correlation with absence of iron biopsy specimens. **Am. J. Clin. Pathol.** 1979: **72**: 817-20.
- MARCUS, D. M. & ZINBERG, N. - Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: results in normal individuals and patients with breast cancer. **J. Nati. Cancer Inst.** 1975: **55**: 791-5.
- MAXIN, P. E. & VELTRI, R.W. - Serum ferritin as a tumor marker in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer** 1986: **57**: 305-11.
- SCHETTINI, F.; MAUTONE, A.; CAVALLO, L.; ALTOMARE, M.; MONTAGNA, O.; DELL'EDERA, L. - Delayed decrease in serum ferritin in polytransfused children with thalassemia major after continuous subcutaneous infusions of desferrioxamine. **Acta Haemat.** 1981: **66**: 96-101.
- SKOOG, D.A. & WEST, D.M. - **Principles of Instrumental Analyses**, 2ed., 1971, Holt, Reinhart and Winston, Inc., New York, 710 p.
- WALTERS, G.O.; MILLER, F.M.; WORWOOD, M. - Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. **J. Clin. Path.** 1973: **26**: 770-2.

ESTUDO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES E
TRIGLICERÍDIOS NOS INDIVÍDUOS DA TERCEIRA IDADE PRATICANTES E
NÃO PRATICANTES DE ATIVIDADES FÍSICAS*

STUDY OF THE LEVELS OF TOTAL CHOLESTEROL AND ITS FRACTIONS AND
TRIGLYCERIDE IN OLD AGED PERSONS WHO PRACTISE AND WHO DON'T PRACTISE
PHYSICAL EXERCISE

Aloisio Luiz Benedetti¹ & Tânia Bertoldo Benedetti²

RESUMO- Este estudo teve como objetivo verificar o somatório das dobras cutâneas do tríceps, subescapular, suprailíaca, abdominal, panturrilha medial e os níveis de triglicerídios, colesterol total e frações, em dois grupos. Um grupo composto de 24 mulheres praticantes de exercícios físicos com idade média de 59 anos, o outro grupo composto de 16 mulheres sedentárias com idade média de 60 anos. O grupo que praticou atividades realizou 3 sessões semanais com duração em torno de 1 h durante 8 meses. Para a coleta de dados utilizou-se a medida do triglicerídios, colesterol total e frações. A coleta foi realizada com os indivíduos sentados, após um repouso de 30 minutos nesta posição. As dosagens de colesterol total, hdl-colesterol e triglicerídios foram realizadas em equipamento automatizado marca Ciba-Corning, modelo Express Plus, com reagentes marca Labtest, sendo o mesmo lote para todas as dosagens. Para medida das dobras cutâneas utilizou-se o plicômetro de Lange e mediu-se as dobras acima mencionadas e utilizou-se o somatório das mesmas. Para a análise estatística utilizou-se o cálculo das médias e desvio padrão e a análise de variância (ANOVA) entre as diferenças do pré- e pós-teste nos grupos controle e experimental, e entre os mesmos. Houve pequena melhora em todas as variáveis analisadas. Embora sendo significativo estatisticamente apenas a redução no somatório de dobras cutâneas. Provavelmente a intensidade dos exercícios físicos não foi suficiente para promover modificações estatisticamente significativas no perfil lipídico. Outras variáveis podem ter interferido, como modificações nos hábitos alimentares, problemas emocionais entre outros.

PALAVRAS-CHAVE – colesterol total e frações, triglicerídios, terceira idade, atividade física

*UFSC/CDS/DEF/NUCIDH

¹ Farmacêutico Bioquímico do MEx - NUCIDH

² Professora do DEF/CDS/UFSC - NUCIDH

ABSTRACT - The purpose of this study was to verify the sum of the subscapular, iliac, abdominal cutaneous plicae and the ones of the triceps and medial calf and the levels of triglyceride, total cholesterol and its fractions in two groups: one formed by 24 women, average age of 59, that practise physical exercise and the other one formed by 16 sedentary women, average age of 60. The first group has practised 3 sessions per week of about 1 hour for 8 months. To collect the data the measurement of triglyceride, total cholesterol and its fractions were used. The collection was performed while the women were sat down and after a rest of 30 minutes in this position. The total cholesterol, hdl-cholesterol and triglyceride dosages were performed using automated equipment by Ciba-Corning, model Express Plus, and reagents by Labtest. The same lot was used for all dosages. To measure the cutaneous plicae mentioned above a plicometer was used and their sum was used for the analysis. For the statistics analysis the data averages and the standard deviation were used along with the analysis of the variance (ANOVA) between the pre- and post-test differences in the control and experimental groups. There was a slight improvement in all the variables analysed, though only the reduction in the cutaneous plicae was statistically significant. Probably the intensity of the physical exercises has not been enough to promote statistically significant changes in the lipidic profile. Other variables may have interfered such as changes in eating habits, emotional problems and others.

KEYWORDS - total cholesterol and its fractions, triglyceride, old aged, activity physical.

INTRODUÇÃO

Desde o princípio da existência humana vem sendo estudado o envelhecimento, pelo medo da morte, sempre buscando tentativas de prolongar a juventude, preservar as condições físicas. Hoje, com o aumento da expectativa de vida, a ênfase é ainda maior para esta questão.

As alterações que ocorrem com o envelhecimento são variáveis, e dependem de influências genéticas e hábito de vida (prática de exercícios físicos, dieta, consumo de álcool, tabagismo, etc). A civilização atual, altamente mecanizada, dificulta o homem em possuir hábitos de vida saudáveis. As máquinas dispensam o trabalho físico, diminuindo os movimentos de maneira geral. A falta de movimento e/ou exercícios físicos provocam atrofia progressiva e diminuição das mais diversas das funções orgânicas¹.

O sedentarismo diminui a capacidade vital e o volume minuto máximo e (VO_2 máximo), e apresenta frequentemente distúrbios digestivos e do sono.

Estudos epidemiológicos nas últimas décadas têm relacionado que maior nível de exercícios físicos regularmente diminuem a incidência de doenças cardiovasculares^{2,3,4}.

Os exercícios físicos, além de estarem associados com a diminuição na incidência de doenças coronarianas, também estão associados com a redução na incidência de hipertensão, diabetes mellitus insulino não-dependente, câncer de cólon, obesidade, dislipidemias e aumento da longevidade³. Outros estudos têm enfatizado a importância da atividade física para o idoso^{5,6,7}.

Quanto à dislipidemia^{9,1} observam que os exercícios físicos desempenham papel importante no tratamento complementar dos distúrbios metabólicos dos lipídios sanguíneos, promovendo alterações positivas antiaterogênicas das concentrações plasmáticas do triglicerídios, colesterol total e frações.

Alem da participação direta dos exercícios físicos sobre os níveis de triglicerídios, colesterol total e frações, eles contribuem para a redução de outros fatores de risco citados anteriormente: redução da pressão arterial, controle do peso, melhora na capacidade dos receptores de insulina em diabéticos e auxilia na redução do Stress^{9,10,11,12}.

Há necessidade de saber qual a intensidade, duração e frequência dos exercícios físicos para que ocorram modificações nos níveis de triglicerídios, colesterol total e frações.

A prática de exercícios físicos, como pode se notado anteriormente, atua como forma de prevenção e reabilitação da saúde do idoso, mantendo uma boa qualidade de vida.

Para que esta melhora na qualidade de vida se traduza em aumento da expectativa de vida faz-se necessário que o idoso viva com vigor físico, seja emocionalmente equilibrado e socialmente engajado. Portanto, há necessidade de incentivo à prática de exercícios físicos orientado por pessoas especializadas para que realmente possam prevenir as doenças fortalecendo o idoso, nos aspectos biológicos, principalmente relacionados à doença aterosclerótica coronariana (DAC) sendo que esta, está relacionada diretamente com as dislipidemias.

Este estudo procurou relacionar o somatório das dobras cutâneas do tríceps (TR), subescapular (SE), suprailíaca (SI), abdominal (AB) e panturrilha

medial (PM) com níveis de triglicerídios, colesterol total e frações, em dois grupos - um de pessoas praticantes de exercícios físicos e outro sedentário.

MATERIAL E MÉTODOS

A caracterização metodológica, segundo¹³ é quase-experimental, pois analisou as modificações do triglicerídios, colesterol total e frações em dois grupos, um praticante de exercícios físicos e outro sedentário.

Amostra

Foram estudados dois grupos do sexo feminino da Terceira Idade, com idade mínima de 51 anos.

Grupo A - Composto de 24 mulheres praticantes exercícios físicos (ginástica e caminhada), CDS/UFSC, com idade média de 59 anos.

Grupo B - Foi composto de 16 mulheres sedentárias que participam de um grupo de convivência com idade média de 60 anos.

Programa de Exercícios Físicos

Para realização do estudo foi utilizado exercícios físicos em um grupo experimental durante 8 meses com o seguinte protocolo:

As atividades executadas no grupo "A" (praticante de exercícios físicos) foram assim realizadas: 3 sessões semanais; duas sessões de 70 min cada e uma sessão de 50 minutos. Nas duas sessões trabalhou-se 10 minutos de alongamento, 20 de caminhada, 10 minutos de dança, 20 minutos de trabalho localizado e 10 minutos de relaxamento final, e na sessão de 50 minutos (uma vez por semana) incentivou-se a caminhada.

Foi realizado aquecimento e alongamento, com o objetivo de preparar o organismo para exercícios mais intensos (10 minutos).

Parte principal

Trabalhou-se a aptidão física com as variáveis: resistência aeróbica, força, flexibilidade e equilíbrio.

Resistência aeróbica - Realizou-se 30 minutos (20 de caminhada e 10 de dança).

Após este último, nos 20 minutos subsequentes foram trabalhados força, flexibilidade e equilíbrio. Os exercícios de força foram realizados através de repetições e materiais que ofereciam resistência (halteres, corda, pesos, sacos de areia, bolas de nogan, arcos, borrachas.), sendo os movimentos em conformidade com as condições físicas de cada indivíduo.

Parte final - Neste momento da aula foram novamente realizados exercícios de alongamento como forma de resfriamento e relaxamento acompanhado de músicas apropriadas.

O grupo "B" prosseguiu com sua rotina sedentária durante o período do estudo.

Instrumentos de medida

Para a coleta de dados utilizou-se os seguintes instrumentos de medida:

(a) Para a medida do triglicerídios, colesterol total e frações, foram obtidas amostras de sangue venoso após um período de jejum de doze horas em ambos os grupos no mesmo dia e local. A coleta foi realizada com os indivíduos sentados, após um repouso de 30 minutos nesta posição. As dosagens de colesterol total, hdl-colesterol e triglicerídios foram realizadas em equipamento

automatizado marca Ciba-Corning, modelo Express Plus. A metodologia empregada seguiu as normas do fabricante (Labtest).

(b) Para medida das dobras cutâneas utilizou-se o plicômetro de Lange e e mediu-se as seguintes dobras: tricipital (TR), subescapular (SE), suprailíaca (SI), abdominal (AB) e panturrilha medial (PM). Para medida foi usado o protocolo proposto por Harisson¹⁴ Por não haver fórmulas específicas para estimarmos o % de gordura para Terceira Idade, por isto utilizou-se o somatório das dobras cutâneas.

Análise Estatística

Para a análise estatística utilizou-se o cálculo das médias e desvio padrão em ambos os grupos no pré- e pós-teste. Para a análise de variância (ANOVA) utilizou-se as diferenças entre o pré- e pós-teste nos grupos controle e experimental, e entre os mesmos. Utilizou-se como nível de significância de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 1 apresenta o resultado das medidas de média e desvio padrão no grupo experimental e controle no pré-teste e pós-teste.

TABELA 1
Média e desvio padrão das variáveis nos grupos

Variáveis	"A"- grupo experimental		"B"- grupo controle	
	Pré-teste	Pós-teste	Pré-teste	Pós-teste
∑ DC	147±34,81	134,95±33,69*	148,16±21,56	157±39,01
CT	229,18±32,10	222,31±30,31	236±75,20	228,33±67,16
HDL-C	42,07±6,43	46,14±7,83*	41,66±8,05	39,96±9,47
LDL-C	164,12±29,68	151,96±24,29*	165,51±67,37	152,93±53,77*
TRG	115,9±65,79	115,59±58,03	143,16±23,74	182,83±52,23*

* p<0,05

∑ DC - Somatório de dobras cutâneas

CT- Colesterol Total

HDL-C- High Density

LDL -C - Low Density

TRG - Triglicerídios

TABELA 2
ANOVA entre as variáveis dos grupos estudados

Variáveis	entre-grupos	mesmo-grupo	F	p
	ss	ss		
∑ DC	2055,06	9349,78	5,71	0,02*
CT	3,040	20109,92	0,003	0,95
HDL-C	156,85	1322,56	3,08	0,09
LDL-C	516,15	12948,19	1,03	0,31
TRG	7535,14	71674,10	2,73	0,11

* p<0.05 F crítico = 4.22

∑ DC - Somatório de dobras cutâneas

CT- Colesterol Total

HDL-C- High Density Lipoprotein

LDL -C - Low Density Lipoprotein

TRG - Triglicerídios

Pode se verificar na tabela 1 que o grupo praticante de exercícios físicos obteve pequena melhora em todas as variáveis analisadas. Embora sendo significativo estatisticamente apenas a redução no somatório de dobras cutâneas como pode-se observar na tabela 2.

Autores como^{15,4} encontraram alterações lipídicas favoráveis com a prática sistemática de exercícios físicos. Em um estudo de revisão¹⁵ encontrou que

corridas equivalentes a 16.200m por semana ou superior ao gasto de 1000 Kcal/semana em um período de 3 a 9 meses trazem alterações favoráveis nas variáveis citadas acima. Relata⁴ que 16 km por semana podem representar o limiar mínimo necessário a partir do qual podem ser esperados resultados benéficos nos níveis de HDL-C. Como pode-se observar os autores apresentam dados de diminuição do perfil lipídico com exercícios em determinada intensidade e tempo. Esta condição não foi possível aplicar no grupo estudado, por ser um grupo de idosas com condições físicas diferentes, embora o tempo utilizado para atividade aeróbica fosse suficiente, a intensidade ficou condicionada as possibilidades individuais, fator que pode ter sido determinante para não corroborar os resultados referidos na literatura. Cabe salientar que os dados citados na literatura não reportam-se a indivíduos desta faixa etária e portanto livres desta limitação.

Após extensa revisão que o tratamento com exercício é conduta terapêutica válida em pacientes com hiperlipidemia, embora os resultados de alguns estudos epidemiológicos se mostrem controversos¹⁶.

Os problemas emocionais, o stress e mudanças nos hábitos alimentares entre outros alteram o perfil lipídico, sendo necessário um controle dos mesmos, condição difícil quando se aplica programas em seres humanos¹⁷.

Pode-se observar redução no somatório de dobras cutâneas e uma dieta hipocalórica e perda de peso pode desencadear redução dos níveis de triglicerídios e aumento do HDL-C^{1,18,19}.

A “American Heart Association” (AHA) e o “National Cholesterol Education Program”(NCEP) recomendam exercícios regulares como fator eficiente para diminuir os níveis plasmáticos de lipídios¹⁵. Embora, a AHA e o ACSM “American

College of Sports Medicine” recomendam que os adultos devem ser estimulados a fazer exercícios de três a cinco vezes por semana durante 30 a 40 minutos e numa intensidade de 60 a 90% da FCM (Frequência Cardíaca Máxima) ou 50 a 80% do VO₂ máximo para manutenção de uma boa saúde cardiovascular, os mesmos devem ser aeróbicos e de moderado ou leve impacto^{11,15}.

Confirmando o que os estudos têm afirmado apresenta-se uma síntese em que diversos autores compactuam^{1,11,15,20} para que haja alterações benéficas nos níveis de triglicéridios, colesterol total e frações:

1. As atividades devem ser realizadas de três a cinco vezes por semana com duração de 60 min cada, com a frequência cardíaca em torno de 60 a 90% da FCM (frequência cardíaca máxima);

2. os exercícios devem ser aeróbicos, moderados e de baixo impacto;

3. a modalidade deve ser prazerosa e se adequar fisiologicamente e psicologicamente ao indivíduo;

4. o vestuário, a temperatura, a iluminação e o espaço devem ser agradáveis;

5. os indivíduos não devem desafiar seu próprio organismo em esforços acima do que podem tolerar;

6. deve-se fazer os testes físicos, bem como exame médico antes de começar as atividades.

CONCLUSÃO

A questão da dislipidemia têm dois pontos a ser considerados: a prevenção e o tratamento. Tanto para um quanto para outro, há necessidade de orientação dietética bem como prescrição de exercícios físicos.

Na literatura encontram-se muitos estudos que se confrontam sobre alterações no perfil lipídico em indivíduos praticantes e não praticantes de atividades físicas, no entanto deste estudo pode-se concluir que:

Exercícios físicos moderados e de forma sistemática diminuíram o somatório de dobras cutâneas.

O programa proposto não alterou o perfil lipídico em idosas praticantes de exercícios físicos.

Provavelmente a intensidade dos exercícios físicos não foi suficiente para promover modificações estatisticamente significativas no perfil lipídico.

Outras variáveis podem ter interferido, como modificações nos hábitos alimentares, problemas emocionais entre outros, já que estas, são difíceis de serem controladas em seres humanos.

Há necessidade que os exercícios físicos sejam específicos e na intensidade e duração adequados para que possam haver modificações no perfil lipídico.

Agradecimentos- Ao HGuFI pelo empréstimo do equipamento.
Ao Projeto de "Ginástica para Terceira Idade"- UFSC/CDS/DEF- FAPEU pelo financiamento do reagentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARTINEZ, T.L.R. **Condutas Clínicas nas Dislipidemias**. Editora Health: Belo Horizonte, 1997, 299 p.
2. GRUNDY, S.M. et al. Resumo do Segundo relatório da Comissão de Especialistas do National Cholesterol Education Program (NCEP) sobre Detecção, Avaliação e tratamento de Hipercolesterolemia no Sangue em adultos (comissão de tratamento de adultosII) **JAMA _ Journal of the American Medical Association**. Seperata Artigo publicado em ARS CVRANDI/JAMA, Janeiro/Fevereiro, vol 4, nº 1, 1994.
3. PAFFENBERGER, R.S. Exercise in the prevention of coronary heart disease. **Prev Med**. 1984.
4. POLLOCK, M.L.; WILMORE, J. H. **Exercícios na saúde e na doença**. ed 2º Editora medsi: São Paulo, 1993, 718p.
5. LEE M., CHUNG-CHEG H. & PAFFENBARGER, R. S.(1995). Exercise Intensity and Longevity in Men. **JAMA**. 273 (15) pp 1179 - 1184.
6. SHEPHARD, R.J. (1991). Exercício e envelhecimento. **Rev. Bras. Ci. Movimento**. 5(4), 49-56.
6. SHEPHARD, R.J. (1991). **Body Composition in Biological Antropology**. London: Cambridge University Press.
7. SKEKTON, D. A .; YOUNG, A .; GREIG, C. A . & MALBUT, K.E. (1995). Effects of resistance training on strenght, power, and selected functional abilities of women aged 75 and older. **Jornal American Geriatrics Society**, 43(10), 1081-1087.
8. GOBBI, S. (1997). Atividade Física para Pessoas Idosas e recomendações da Organização Mundial da Saúde de 1996. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**. 2:2 (41-49).
9. BARKER, L.R.; BURTON, J.; ZIEVE, P. **Princípios de medicina ambulatorial**. 3ª ed. Artes médicas: Porto Alegre, 1993.
10. CARVALHO, T. (1995). **Atividade Física e Saúde - orientações básicas sobre atividade física e saúde para profissionais da área de educação e saúde**. Educação a distância. MEC/MS 1ª ed.
11. CORREIA, M.I.T.D. **Nutrição, esporte e saúde**. Editora Health: Belo Horizonte, 1996, 128p.

12. HORTON, E. S.(1996). NIDDM - the devastating disease. **Diabetes Res. Clin. Pract.** Aug; 28 Suppl:S3-11
13. CAMPBELL, D. & STANLEY, J. (1970). **Diseños experimentales y cuasiexperimentales en la investigación social**. Buenos Aires: Amovorta.
14. HARRISON, G. G.; BUSKIRK, E. R.; CARTER, J. E. L.; JOHNSTON, F.E.; LOHMAN, T. G.; POLLOCK, M. L.; ROCHE, A. F. e WILMORE, J.. Skinfold thicknesses and measurement technique In: TIMOTHY G. LOHAMAN. **Advances in Body Composition Assessment**. Human Kinetics Publishers: Champaign 1992.
15. WOLINSKY, I. & HICKSON J. F. (1996). **Nutrição no exercício e no Esporte**. 2^a ed. São Paulo : ed. Rocca.
16. SUPERKO, H.R.; HASKELL, W.L. & Wood, P.D. Modification of plasma cholesterol through exercise. **Postgrad Med**. 1985; 78:64-75.
17. BOUCHARD, C. e DESPRÉS J.P.. physical Activity and Health: Atherosclerotic, Metabolic and Hipertensive Diseases. **Research Quartely for Exercise and Sport**. 66(4):268-275. 1995.
18. ANDERSEN, R. E. et al. Relation of wight loss to changes in serum lipids and lipoproteins in obese women. **The American Journal os Clinical Nutrition**. 1995; 62(2):350-357.
18. KRAUSE, M. V. e MAHAN, L. K.. **Alimentos , Nutrição e Dietoterapia**.7^a Ed. Rocca, São Paulo. 1984, 1052 p.
20. SILVA, O. J. & SILVA, T. J. C. (1995). **Exercício e Saúde: fatos e mitos**. Florianópolis: UFSC.

Endereço para correspondência:

Aloisio Luiz Benedetti

Rua "A", N° 204, Apto- 202 – Jardim Albatroz – Córrego Grande

Florianópolis – SC

CEP – 88037500

e-mail tania@cds.ufsc.br

IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* E *Isospora belli* EM PACIENTES HIV POSITIVO COM DIARRÉIA

IDENTIFICATION OF *Cryptosporidium* AND *Isospora belli* IN PATIENTS HIV POSITIVE WITH DIARRHOEA

Ana Elizabete Nogueira Moreira Vasconcelos, Carlos Eurico Jataí Freitas & Maria de Fátima Oliveira

RESUMO

Foram analisadas 1.500 amostras de fezes de pacientes HIV positivo adultos de ambos os sexos, internados no hospital São José, no período de agosto de 1997 a fevereiro de 1998. As amostras foram encaminhadas ao laboratório central (LACEN) de saúde pública para realização dos exames. Oocisto de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* foram encontrados em 180 (12%) e 300 (20%) amostras de fezes, respectivamente após prévia concentração do material pela técnica de sedimentação em formol-éter e posterior coloração dos esfregaços pelo carbol-fucsina. Em nenhuma amostra foi observada a presença de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* em concomitância. Entretanto foram identificados *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* em concomitância com o *Cryptosporidium* ou *Isospora belli*. Nesse estudo observamos a presença dos coccidios em apenas 32% dos pacientes HIV positivo com diarréia, sugerindo que esses coccidios não são os únicos agentes patogênicos responsáveis pela diarréia.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium*, *Isospora belli*, AIDS

ABSTRACT

We analysed 1500 samples of feces of patient HIV positive adults of both sexes, intermed in the Hospital São José, in period of august of 1997 to february of 1998. As samples they were guided to the central laboratory (LACEN) of public health for accomplishment of exames. Oocysts of *Cryptosporidium* sp and *Isospora belli* were found in 180 (12%) and in 300 (20%) samples of feces, respectively, after previous concentration of the material for the sedimentação technique in formol-ether and later stain of the thick film for the carbol-fucsina. In any specimen, the presence of the Oocysts of *Cryptosporidium* and *Isospora belli* was observed in study. We observed the presence of another parasits: *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* and *Entamoeba histolytica* in concomitant with of *Cryptosporidium* or *Isospora belli*. In our study, observed a presence of coccidian in apenas 32% of patients HIV positive with diarrroea sugged that those coccidian no was only causative agents of diarrroea among those patients.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*, *Isospora belli*, AIDS

Faculdade de Farmácia da UFC- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Rua Capitão Francisco Pedro 1210, Rodolfo Teófilo Fortaleza-Ce.

Fax: (085) 2439292

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium sp e *Isospora belli* são protozoários coccídios intestinais oportunistas que agravam o quadro clínico de pessoas com imunodeficiência congênita, indivíduos em quimioterapia imunossupressiva e em pacientes com AIDS.

O *Cryptosporidium* foi observado pela primeira vez, em cortes histológicos da mucosa gástrica de camundongo de laboratório, por Tyzzer em 1907. Esse protozoário foi encontrado em peixes, répteis, pássaros e mamíferos (Cranfield et al.,1984). Os primeiros casos (02) de infecção humana por *Cryptosporidium* sp foram descritos nos Estados Unidos em 1976, mas poucos casos foram diagnosticados até que esse coccídio fosse declarado como agente causador de infecção grave em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Nesses pacientes a infecção é caracterizada por diarreia aquosa prolongada com numerosas evacuações diárias e refratária a qualquer medicação antimicrobiana e acentuada perda de peso, podendo levar a óbito grande parte dos pacientes (Fayer e Ungar,1986).

Esses parasitos se desenvolvem nas microvilosidades de células epiteliais do trato gastrointestinal. A patogenia e o quadro clínico destas parasitoses são influenciados por idade, competência imunológica do indivíduo infectado e a associação com outros patógenos. A critosporidiose e isosporose humana são mais freqüentes nos meses quentes e mais chuvosos atingindo principalmente crianças com menos de 2 anos de idade e pessoas com imunodeficiência. A transmissão é feita pela passagem de oocisto de um hospedeiro a outro por via oral. Atualmente, essas parasitoses vem ganhando importância considerável por se tratar de parasitas oportunistas que acometem pacientes aidéticas causando alterações nas células epiteliais da mucosa gastrintestinal interferindo

nos processos digestivos resultando na síndrome da má absorção. O objetivo deste trabalho foi estudar a prevalência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em fezes diarreicas de pacientes HIV positivo do Hospital São José de Fortaleza, no período de agosto de 1997 a fevereiro de 1998.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais :Foram coletadas e analisadas 1500 amostras de fezes diarreicas de pacientes HIV positivo de ambos os sexos na faixa etária de 20 a 50 anos internados no Hospital São José de Fortaleza-Ce, no período de agosto de 1997 a fevereiro de 1998.

.Métodos para detecção de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli*

As amostras foram coletadas em recipientes plásticos contendo solução tamponada de formalina a 10% e encaminhadas ao laboratório Central (LACEN) do Estado do Ceará para análise. As amostras foram concentradas através da técnica de sedimentação em formol-éter (Ritchie,1948) e corado pelo técnica de carbol-fucsina (Kinyoun) o qual permite o diagnóstico destas parasitoses (Pohjola et al., 1984). A presença de oocistos no material analisado destaca-se pela tonalidade do vermelho quando observado ao microscópios ópticos. Os demais parasitos intestinais foram pesquisados pelos os métodos direto e de Hoffman.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, o *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* se distribui em todas as regiões do país com índice de 20% para crianças com diarreia e para indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida. Em países em desenvolvimento a prevalência de criptosporidiose varia de 4 a 32%, e com relação a população aidética a prevalência é de 3 a 4% para os pacientes com enterite (Colford et al, 1996 ;Moitinho et al., 1997; Heyworth et al, 1996).

No Haiti na África, metade dos aidéticos são infectados com *Cryptosporidium parvum*, enquanto que a isosporose atinge apenas 15% desses pacientes e nos Estados Unidos a criptosporidiose não passa de 0,2% (Colford et al, 1996; Sorvillo et al., 1994).

Em nosso estudo foram examinadas, no período de agosto de 1997 a fevereiro de 1998, 1.500 amostras de fezes diarreicas de pacientes HIV positivo do Hospital São José. Do total analisado observamos presença de oocisto de *Cryptosporidium parvum* em 180 amostras e *Isospora belli* em 300 amostras Fig.1. A prevalência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* em pacientes aidéticos com diarreia foram 12% e 20%, respectivamente. Os nossos resultados corroboram com os dados da literatura mostrando que esses parasitas não são os únicos agentes causadores de diarreia em pacientes aidéticos. A prevalência encontrada por nós foi superior aos dados da literatura. Em pessoas com AIDS a diarreia criptosporidial é muitas vezes severa, persistente e profundamente debilitante (Pedersen et al., 1997).

Nesse estudo nenhuma amostra de fezes foi encontrada com *Cryptosporidium parvum* em concomitância com a *Isospora belli*, mas com relação a outros parasitos

foram registrados a presença de *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* associados a *Cryptosporidium* ou *Isospora belli*.

Em indivíduos imunodeficientes, os sintomas são crônicos, caracterizando-se por vários meses de diarreia aquosa refratária a qualquer medicação antimicrobiana e acentuada perda de peso principalmente em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida. O tratamento visa aliviar os efeitos da diarreia e da desidratação (Tarimo et al 1996), mas até o momento nenhuma droga foi efetiva no tratamento de criptosporidiose, a falta de uma droga efetiva faz a infecção ser uma ameaça a vida de pessoas com AIDS (Colford et al, 1996). Apesar da alta patogenicidade do *Cryptosporidium* e *Isospora belli* em pacientes imunocomprometidos, o conhecimento desta infecção ainda é bastante restrito em centros de pesquisa e grandes laboratórios, portanto, sugerimos que medidas profiláticas sejam adotadas com mais seriedade no sentido de prevenir ou evitar o aparecimento destes protozoários em aidéticos, além de estabelecer a inclusão do diagnóstico na rotina laboratorial de pacientes HIV positivo com ou sem diarreia.

CONCLUSÕES

Das 1.500 amostras de fezes de pacientes HIV positivo analisadas concluímos:

O número de pacientes HIV positivo com isosporose foi maior (20%) do que a criptosporidiose (12%).

Não foi encontrado nenhum caso de criptosporidiose e isosporose em concomitância.

Observamos a presença de outros parasitas (*Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica*) em concomitância ao *Cryptosporidium* e a *Isospora belli*.

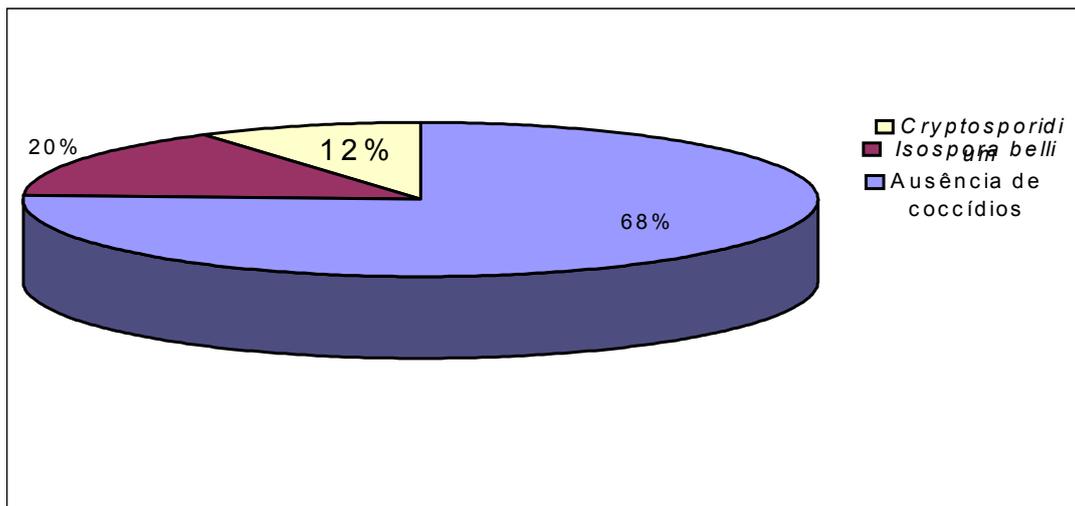


Figura 1 Frequência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em 1.500 amostras de fezes diarreicas de pacientes HIV positivo do Hospital São José em Fortaleza, no período de agosto de 1997 a fevereiro de 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colford, J.MJr., Tager, IB., Hirozawa, AM .I Cryptosporidiosis among patients infected with human imunodeficiency virus: factors related to symptomatic infection and survival. **Am. J. Epidemiol** **144**; 807-816,1996.
2. Cranfield ,MRIK., Barker, KG, Mehren and Rapley, WA.Canine distemperin wild raccoons at the Metropolitan Toronto Zoo. **Canadian Veterinary Journal** **25**:63-66,1984
3. Heyworth, M. F. Parasitic diseases in imunocompromised hosts. Cryptosporidiosis, isosporiasis, and strongyloidiasis. **Gastroenterol Clin. North Am**; **25(3)**: 691-707,1996.
4. Fayer, R., Ungar, B. L. P. Cryptosporidium sp and Cryptosporidiosis. **Microbiol. Reviews.**, **50(4)**:458-483, 1986.
5. Moitinho, M. L. R., Roberto, A. C. B. S., & Martins, M. R. Ocorrência de Cryptosporidium sp em fezes diarréicas de crianças do Município de Maringá-PR. **Rev. Bras. de Análises Clínicas.** **29(3)**: 168-170,1997.
6. Payne, P., Lancaster, LA., Heinzman, M.& McCutchan, JÁ. Identification of Cryptosporidium in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **New Engl. J. Med.** **309**:613-614,1983.
7. Pedersen, C., Danner, S., Lazzarin, A, et al). Epidemiology of Cryptosporidiosis among European AIDS patients. **Genitourin Med.** **72** 128-13, 1996.
8. Pohjola, S.,Jokipii, L., Jokipii, A. Dymethylsulfoxide-Ziehl-Neelsen technique for detection of cryptosporidial oocysts. **Veterinary Record** **115**:442-443,1984.

9. Sorvillo, F.J., Lieb, L.E., Kerndt, P.R. Epidemiology of Cryptosporidiosis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles County. **Am J Trop Med Hyg.** **51**: 326-331,1994.
10. Tarimo, D. S., Killewo, J. Z., Minjas, J. N., Msamanga, G. I. Prevalence of intestinal parasites in adult patients with enteropathic AIDS in north-eastern Tanzania. **East. Afr. Med.** **3:73(6)**: 397-9, 1996.
11. Ventura, G., Cauda, R., Larocca, L. M., Riccioni, M. E., Tumbarello, M., Lucia, M. B. Gastric Cryptosporidiosis complicating HIV infection: case report and review of the literature. **Eur. J. Gastroenterol Hepatol**; **9(3)**:307-10,1997.

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DE CRIANÇA EM CRECHE

SUSCEPTIBILITY PROFILE OF *S.aureus* STRAINS ISOLATED FROM CHILDREN AT CRECHE

Daniela Deitos¹; Fernanda Magalhães¹; Viviam Tosta Borges¹; Carlos Alberto Granjo²

RESUMO – Foram estudadas trinta cepas de *S. aureus* isoladas da cavidade nasal de trinta crianças saudáveis de um orfanato. A metodologia adotada foi cultura laboratorial e realização de antibiograma. Todas as cepas apresentaram sensibilidade a vancomicina (100%), gentamicina (94%), oxacilina (90%), cloranfenicol (84%), neomicina e tetraciclina (80%), e uma alta percentagem das cepas apresentaram resistência a penicilina (100%) e ampicilina (96%). Todas as cepas estudadas desenvolveram resistência múltipla aos agentes antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus aureus*; teste de sensibilidade a antimicrobianos

SUMMARY – Thirty strains of *S. aureus* isolated from the nasal cavity of thirty healthy carriers children at creche were studied. The methodology has involved laboratorial culture and the realization of an antibiogram. All strains tested were susceptible to vancomycin (100%), gentamicin (94%), oxacillin (90%), chloramphenicol (84%), neomicin and tetracycline (80%), and a high percentage of the strains were resistant to penicillin (100%) and ampicillin (96%). All strains studied were multi-resistance.

KEY-WORDS: *Staphylococcus aureus*; antimicrobial susceptibility test.

INTRODUÇÃO

O Staphylococcus aureus é o mais importante patógeno humano, sendo responsável por 20% das infecções bacterianas humanas¹. Conforme a literatura, as infecções estafilocócicas mais frequentemente associadas às unidades de neonatologia e pediatria são: impetigo bolhoso², síndrome da pele escaldada^{3,4}, dermatite atópica⁵, síndrome do choque tóxico^{6,7}, septicemia^{8,9} e infecções no sistema respiratório inferior¹⁰.

As cepas hospitalares têm apresentado reduzida sensibilidade aos diversos agentes antimicrobianos rotineiramente utilizados na terapêutica, não sendo raro a detecção de cepas portadoras de multirresistência. Atualmente, aproximadamente 90% das cepas de *S. aureus* isoladas intra ou extra-hospitalares são resistentes à penicilina natural. Os casos de resistência à meticilina, considerados, raros até há poucos anos, têm se tornado cada vez mais comuns⁸. O fenômeno de tolerância e resistência do *S. aureus* à vancomicina, também, já foi observada¹¹.

Com base nesta problemática, este estudo teve como objetivo a análise do perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos de todas as cepas de *S. aureus* isoladas em uma

comunidade infantil, numa creche na cidade de São Paulo, pela disciplina de Microbiologia Clínica da Universidade Camilo Castelo Branco.

-
1. Acadêmicas do 4º ano da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Camilo Castelo Branco.
 2. Professor adjunto da disciplina de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Camilo Castelo Branco.

Materiais e Métodos

1. Amostras

Foram estudadas 30 amostras de cepas comunitárias de *S. aureus* isoladas da região anterior das fossas nasais de 30 crianças saudáveis, com faixa etária compreendida entre 5 a 8 anos, matriculadas em uma creche. Swabs umedecidos com caldo tioglicolato (Difco) eram introduzidos na região nasal anterior. Após a coleta os swabs eram colocados em tubos de ensaio contendo o caldo e incubados a 35°C por 24 horas.

2. Análise microbiológica

As culturas em caldo tioglicolato (Difco), foram repicadas em placas de Petri contendo ágar manitol sal (Difco) e incubadas a 35°C por 24 horas. As bactérias isoladas eram identificadas pelas características de crescimento, coloração de Gram e provas bioquímicas para verificar produção das enzimas catalase e DNase.

Os testes de sensibilidade às drogas antimicrobianas foram realizados segundo o método de difusão em disco Kirby-Bauer. Todas as cepas foram testadas com Sensibio discos CECON contendo os antibióticos: beta-lactâmicos (penicilina 10 UI, oxacilina 1µg, ampicilina 10 µg), aminoglicosídeo (gentamicina 10 µg, neomicina 10 µg), glicopeptídeo (vancomicina 30 µg) e outros antibióticos (tetraciclina 30 µg e cloranfenicol 30 µg) CECON.

Resultados

Neste estudo colhemos 30 amostras, swabs nasais, de 30 crianças, sendo 18 do sexo feminino (60%) e 12 do sexo masculino (40%). Em todas as amostras analisadas foram isoladas cepas de *S. aureus*, Quadro I. O Gráfico 1 contém a frequência de sensibilidade das cepas de *S. aureus*, testadas com os agentes antimicrobianos. Conforme os dados obtidos, a porcentagem de sensibilidade verificada foi: ampicilina 4%, cloranfenicol 84%, gentamicina 94%, neomicina 80%, oxacilina 90%, tetraciclina 80%. Todas as cepas estudadas apresentaram resistência a penicilina G (100%) e sensibilidade a vancomicina (100%).

Evidencia-se no Gráfico 2 a ocorrência de cepas portadoras de resistência múltipla a várias classes de antibióticos. Observamos que foram isoladas cepas com multiresistência até a quatro (13%) ou cinco (3%) classes de antibióticos, embora cepas portadoras de multiresistência a duas (43%) ou três classes (36%), também pode ser verificado.

Analisando a Tabela I, conforme a distribuição das cepas portadoras de multiresistência e os antibióticos envolvidos, notamos que todas as cepas multirresistentes apresentam determinantes de resistência aos antibióticos penicilina G e a ampicilina. Observamos que a frequência de cepas de *S. aureus* portadoras de resistência a estes dois

antimicrobianos, foi maior entre as crianças do sexo feminino, 10 amostras (33%), entretanto a multiresistência a três antibióticos predominou entre os meninos, 8 amostras (26%). Das 4 cepas portadoras de multiresistência a quatro antimicrobianos, duas foram isoladas de amostras de meninos e outras duas de meninas. Somente uma cepa, isolada da amostra de uma menina, podemos observar resistência a cinco antimicrobianos. As maiores frequências de multiresistência verificadas na população estudada, foram das cepas portadoras de resistência a dois e três antibióticos. Somente uma cepa não apresentou multiresistência.

A análise do padrão de sensibilidade destas cepas isoladas, com relação a atividade das drogas avaliados, demonstrou, grande variação de sensibilidade e /ou resistência, destes microrganismos, às diferentes classes de antibióticos empregados.

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas o *Staphylococcus aureus* têm adquirido papel de destaque, não só por ser um patógeno humano responsável por infecções superficiais e sistêmicas, que atingem indivíduos em diferentes faixas etárias, como também pela sua multiresistência aos antimicrobianos, constantemente, usados em terapêutica. Com crescente frequência, tem sido documentado, estudos avaliando as mudanças no padrão de susceptibilidade de cepas de *S. aureus* isoladas de materiais clínicos, responsáveis por infecções nosocomiais, ou estudos intra-hospitalares, comparando a prevalência dos marcadores de resistência presentes em cepas, isoladas de material biológico, de vários hospitais; havendo uma carência de estudos epidemiológicos com relação as cepas comunitárias. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo pesquisar o perfil de sensibilidade de cepas comunitárias isoladas do vestíbulo nasal de crianças.

Obteve-se o isolamento das cepas de *S. aureus* presente em amostras de ambos os sexos (Quadro I), colhidas do vestíbulo nasal, por ser o principal sítio de colonização desta bactéria no hospedeiro humano, sendo uma região anatômica estratégica, da qual a bactéria pode se propagar para superfície corpórea ou invadir a mucosa e atingir tecidos mais profundos. Os portadores nasais com elevada percentagem de colonização por *S.aureus* estão mais associados a incidência de casos clínicos. Goh et al. (1997), detectaram elevada percentagem de portadores nasais em crianças com dermatite atópica, resultado semelhante foi observado por Takashi et al.(1998),os quais constataram que todos pacientes com doença exantemática estavam colonizados por *S.aureus* metilina resistente

O Gráfico I exhibe o perfil de sensibilidade das cepas isoladas, analisando o comportamento dessas amostras frente aos antimicrobianos. As amostras apresentaram grande susceptibilidade a vancomicina e alta percentagem de resistência a penicilina G, resultados semelhantes tem sido citados por outros autores^{1, 5, 8} em estudos semelhantes realizados com cepas hospitalares.

De acordo com a técnica de antibiograma os agentes antimicrobianos mais eficazes foram os antibióticos glicopeptídios e aminoglicosídios, apresentando respectivamente uma

freqüência de sensibilidade de 100% e 94%, pelas cepas estudadas. Já os antibióticos de amplo espectro utilizados, cloranfenicol e tetraciclina, não apresentaram a mesma eficiência de ação com as cepas isoladas.

No presente trabalho, constatamos a ocorrência de cepas de *S. aureus* portadoras de resistência múltipla aos agentes antimicrobianos, expressos no Gráfico 2 e na Tabela I. Analisando os dados obtidos, percebemos que um grupo significativo de cepas, possuem resistência a três antimicrobianos. A ocorrência dos determinantes de resistência, aos beta lactâmicos (penicilina G e ampicilina) e a outras classes de antimicrobianos foi constantemente observada entre as cepas estudadas, embora tenha sido isolada cepa resistente até a cinco classes de drogas, a maioria das bactérias, exibiram resistência a três antimicrobianos, tal fato, nos surpreendeu devido a pouca idade das crianças. Nishijima & Nakagawa (1997), quando relataram casos de impetigo em crianças, observaram que poucas cepas eram resistentes a mais que um antimicrobiano.

Bendhack et al., analisando 53 casos de septicemia estafilocócica, verificaram que 65,6% infectaram-se na comunidade, sendo a porta de entrada, naqueles em que foi possível identifica-la, uma lesão de pele; os demais 34,4%, estavam internados e foram contaminados por cepas hospitalar. Tal fato revela a importância e a necessidade em se conhecer o perfil de susceptibilidade das cepas comunitárias de *S. aureus*, presente na microbiota dos portadores da população, o que pode auxiliar o diagnóstico e o início da antibioticoterapia adequada⁸.

Como podemos observar a ocorrência de cepas multirresistentes é um problema atual que não atinge somente as cepas de origem hospitalar, mas também as cepas comunitárias disseminadas na população. É necessário conhecer, a real situação do perfil de sensibilidade apresentado pelas cepas comunitárias do nosso ambiente e reavaliar a utilização das drogas antimicrobianas, quer em clínica médica, quer em alimentos e rações.

Agradecimentos

Agradecemos à colaboração da professora Rosana Magalhães Toledo, diretora do Centro de Educação Infantil Casa do Cristo Redentor, e as auxiliares de laboratório: Clarice P. Brito e Geny A Migliati, pelo apoio na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KRUSZYNSKA, E.; BIALEK, M.; JANICKA, G.; BUGALSKI, R.; BELZYT, E.; CZAJKOWSKI, H.; HARENSKA, K.; WOJCIECHOWSKA, D. – Susceptibility to antibiotics of *Staphylococcus aureus* strains. **Med Dosw Mikrobiol.**, **49**: 141-4, 1997.
2. NISHIJIMA, S. & NAKAGAWA, M. – Sensitivity of antibacterials of *Staphylococcus aureus* isolated from impetigo patients. **J. Int Med.Res.**, **25**:210-3, 1997.
3. MACHANGU, R S.; MGODE, G.; GISAKANYI, N. – Recurrent *Staphylococcal* scalded skin syndrome in children: report of two cases. **East Afr. Med. J.**, **74**:603-4, 1997.

4. RAYMOND, J.; BINGEN, E.; BRAHIMI, N.; BERGERET, M.; LEPERCQ, J.; BADOUAL, J.; GENDREL, D.- *Staphylococcal* scalded skin syndrome in a neonate. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 16:453-4, 1997.
5. GOH, C.L.; WONG, J.S.; GIAM, Y.C. – Skin colonization of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis patients seen at the National Skin Centre. **Int. J. Dermatol.**, 36:653-7, 1997.
6. TAKAHASHI, N.; NISHIDA, H.; KATO, H.; IMANISHI, K.; SAKATA, Y.; UCHIYAMA, T.- Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin in the early neonatal period. **Lancet.**, 351:1614-9, 1998.
7. FISHMAN, G. & OPHIR, D. – Toxic shock Syndrome. *Harefuah*, 132: 622-4, 1997.
8. BENDHACK, L.I.; BRANCO, M.E.G.; DE ARAUJO, R.P.M. – Septicemia por *Staphylococcus aureus*. **J. de Pneumol.**, 12:8-14, 1986.
9. REIS, A .G. A.C.; EISENCRAFT, A P.; EJZENBERG, B.; BALDACCI, E.R.; KODAIRA, M.S.; DOMINGUES, P.P.; GRISI, S.J.E.; OKAY, Y. – Septicemia por *Staphylococcus aureus* em criança: tolerância bacteriana à vancomicina e poder bactericida do soro. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 41: 47-52, 1995.
10. SEQUEIRA, M.D ; ZERBINI, E.; IMAZ, M.S.; VERONESSI, I.; LATINI, O; COCIGLIO, R.; PIERINI, J. – Etiologia de las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior en niños menores de cinco años en Santa Fé. **Medicina**, 57:191-9, 1997.
11. FLORES, P.A. & GORDON, S.M. – Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* emerging public health threat. **Cleve Clin. J. Med.**, 64:527-32, 1997.
12. KIRBY, W.M.M.;BAUER, AW.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. – Antibiotic susceptibility testing by standartized single disk method.. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, 45:493-496, 1966.
13. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **Approved standard M2-A6**. 6 ed. Villanova, 1998

TABELA I – Ocorrência das cepas de *S.aureus* portadoras de multirresistência Aos antimicrobianos: ampicilina (AMP), cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN), neomicina (NEO), oxacilina (OXA), penicilina G (PEN), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).

RESISTÊNCIA MÚLTIPLA		N ° DE CEPAS COM MULTIRESISTÊNCIA		TOTAL de AMOST.
N °	CLASSES DE ANTIMICROBIANOS	SEXO MASC.	SEXO FEMIN.	
02	PEN-AMP	03	10	13
03	PEN-AMP-TET	02	01	11
	PEN-AMP-NEO	03	01	
	PEN-AMP-OXA	01	00	

04	PEN-AMP-CLO	02	01	
	PEN-AMP-TET-CLO	01	01	04
05	PEN-AMP-TET-OXA	00	01	
	PEN-AMP-GEN-NEO	01	00	
05	PEN-AMP-OXA-GEN-NEO	00	01	01

GRAFICO 2 – Frequência de amostras de *S. aureus* multirresistentes a várias classes de antimicrobianos.

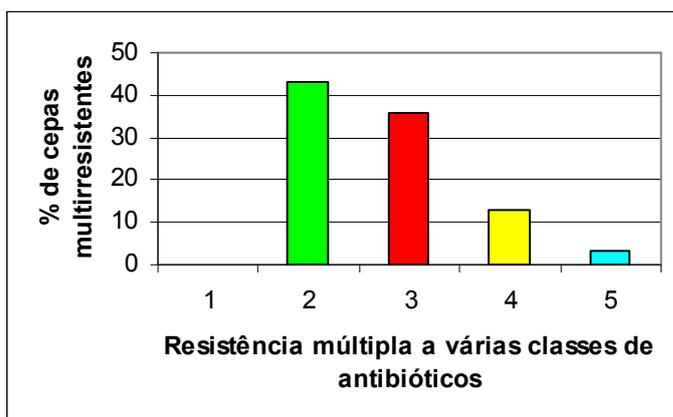
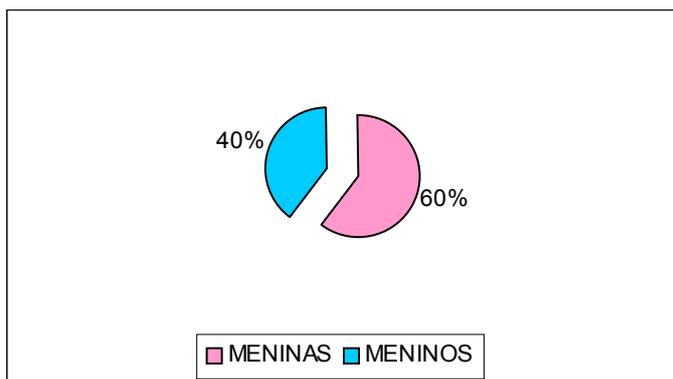
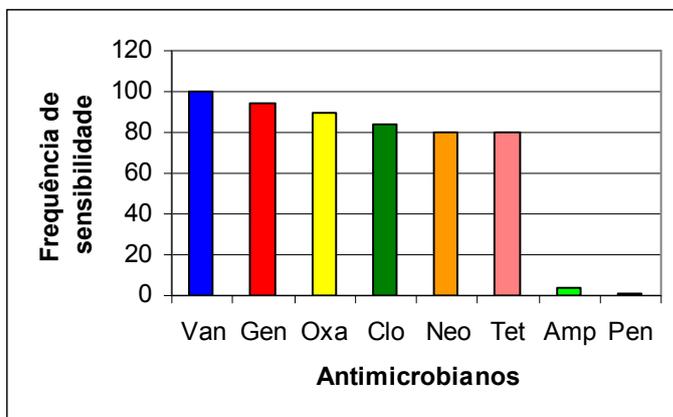


GRAFICO 1 – Frequência de sensibilidade das cepas de *S.aureus* estudadas.



QUADRO 1 – Freqüência das crianças examinadas.

**RELAÇÃO ENTRE ENTEROPARASIToses, REGIÃO UNGUEAL E MÃOS
CONTAMINADAS, EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DA INSTITUIÇÃO
FILANTRÓPICA DE MARÍLIA.**

**RELATIONSHIP BETWEEN INTESTINAL PARASITES, NAIL REGION
AND CONTAMINATED HANDS, IN CHILDREN AND ADOLESCENTS
FROM THE INSTITUIÇÃO FILANTRÓPICA DE MARILIA.**

GATTI, L.L.¹, SANTOS, C.V.², LIMA, W.P.³

RESUMO:

Foram analisadas amostras de fezes, material da região ungueal e a água após a lavagem das mãos, de 58 crianças e adolescentes, entre 12 a 17 anos de idade, da Instituição Filantrópica de Marília, no período de 01 de agosto a 30 de setembro de 1998. Dos 58 pacientes analisados, 17(29,3%) não apresentaram nenhum tipo de infecção parasitária; 41(70,7%) apresentaram-se parasitados por protozoários com a prevalência de 35,1% do tipo *Giardia lamblia* em 05(11,8%) e *Entamoeba coli* em 10(23,3%); os demais, ou seja, 64,9% apresentaram-se parasitados por helmintos do tipo *Ascaris lumbricoides* em 10(23,3%), *Ancilostomídeos* em 03(8,3%) e *Hymenolepis nana* em 13(33,3%).

¹ Aluno do 7º termo do Curso de Ciências Biológicas - Modalidade Médica da Universidade de Marília, e estagiário no Laboratório de Análises Clínicas da UNIMAR.

² Biomédica do Laboratório de Análises Clínicas da UNIMAR-Universidade de Marília.

³ Docente em disciplina de Laboratório Clínico do 7º termo do Curso de Ciências Biológicas - Modalidade Médica da UNIMAR-Universidade de Marília.

Diante dos resultados obtidos, pode-se verificar que o foco das infecções apresentadas, não teve correlação com a região ungueal ou com as mãos contaminadas, uma vez que os cistos, larvas e ovos pesquisados foram encontrados apenas nas fezes analisadas.

PALAVRAS CHAVES: Região ungueal, protozoários, helmintíases.

SUMMARY

Were analyzed samples of feces, material from nail region and water where the hands were washed, of 58 children and adolescents, between 12 and 17 years old, from Instituição Filantrópica de Marília, in the period of 08/01 until 09/30/1998. From 58 analyzed patients, 17(29,2%) didn't show any kind of parasitic infection; 41(70,7%) presented infection by protozoans with prevalence of 35,1%, how *Giardia lamblia* in 05(11,8%) and *Entamoeba coli* in 10(23,3%); the others 64,9% presented helminthiasis how *Ascaris lumbricoides* in 10(23,3%), *Ancilostomideos* in 03(8,3%) and *Hymenolepis nana* in 13(33,3%).

The results showed that the focal of the infections, didn't have relationship with material from nail region and contaminated hands neither, because the cysts, larvas and eggs were just found in the analyzed feces.

KEY WORDS: Nail region, Protozoans, Helminthiasis.

INTRODUÇÃO:

As parasitoses intestinais representam um sério problema de saúde pública, principalmente em crianças de níveis sócioeconômicos baixos e desprovidos de recursos básicos como: higiene ambiental e condições sanitárias, e estas, por sua vez, exercem profunda influência na cadeia de transmissão de parasitoses intestinais^{2, 5, 6}.

Doenças infecciosas e parasitárias aparecerem nas estatísticas médico-epidemiológicas entre as principais causas de morte na América Latina e na África, acometendo mais da metade da população mundial. Em muitas regiões ocupam o primeiro lugar, somente sendo ultrapassada pelas doenças do aparelho circulatório. A ocorrência de parasitas é muito freqüente, a maioria das pessoas examinadas, em populações latino americanas e africanas, apresenta ao menos uma espécie de parasita, nas coproscopias. Acomete principalmente crianças abaixo de 5 anos de idade, cerca de 34% da população mundial¹.

A distribuição das parasitoses tem vários fatores intervenientes: presença de susceptíveis apropriados, migrações humanas, condições ambientais (temperatura, umidade, altitude) favoráveis, potencial biótipo elevado.

De acordo com Segulem *et al*, (1985), o Brasil, devido a sua situação geográfica, condições climáticas e mau estado sanitário da maioria de sua população, apresenta elevados índices de infestação pelas helmintoses em geral.

Muitos descrevem sobre o papel deletério que as enteroparasitoses exercem sobre a população infantil brasileira, associando principalmente a diminuição do desenvolvimento físico intelectual, tornando-se obstáculo ao progresso coletivo, mesmo em comunidades onde haja complementação nutricional³.

O problema se agrava principalmente em crianças de creches ou instituições

filantrópicas, onde o ambiente com um grande número de crianças parasitadas, parece condicionar toda população do local exposta a esse convívio⁴.

Segundo Souza Junior *et al*, (1997), os estudos relacionados às enteroparasitoses estão se tornando cada vez mais importantes com o advento da AIDS, principalmente em países onde a doença é endêmica, como o Brasil. As parasitoses intestinais em pacientes portadores de HIV são candidatas ao agravamento, disseminação, modificação, quando associadas à AIDS, principalmente aquelas que podem multiplicar-se no organismo e com maior vínculo à imunidade celular.

Tendo em vista a magnitude do problema, este trabalho tem por objetivo realizar um levantamento epidemiológico das diversas parasitoses, em amostras de crianças e adolescentes da Instituição Filantrópica de Marília, associando a análise coproparasitológica com o material ungueal e a água após a lavagem das mãos, para avaliar os níveis de contaminação, e, orientar funcionários, professores e os próprios internos do controle e profilaxia, evitando-se problemas e contaminações futuras.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram analisadas 58 amostras de fezes, material da região ungueal e a água após a lavagem das mãos, de crianças e adolescentes, na faixa etária de 12 a 17 anos de idade, provenientes da Instituição Filantrópica de Marília, no período de agosto a setembro de 1998. As fezes, material da região ungueal e a água após a lavagem das mãos, foram coletados em recipientes apropriados e separadamente.

As amostras foram analisadas no laboratório de análises clínicas da UNIMAR- Universidade de Marília (Departamento de Parasitologia), pelos métodos de rotina laboratorial: Faust (centrífugo-flutuação), Hoffman (sedimentação espontânea).

Foram realizados também, exames parasitológicos em todos os funcionários, os quais exercem suas funções relacionadas à preparação da alimentação, fornecida aos escolares da instituição.

RESULTADOS:

Entre os 58 pacientes incluídos na pesquisa, 17 deles (29,3%) não apresentaram qualquer tipo de infecção por enteroparasitas, porém os outros 41 pacientes (70,7%), encontravam-se parasitados (Tabela 01).

Tabela 01: Prevalência de infecções por enteroparasitas em crianças e adolescentes da Instituição Filantrópica de Marília, em análises de fezes, material ungueal e água após a lavagem das mãos:

	MATERIAL ANALISADO		
	FEZES	UNGUEAL	ÁGUA
Nº DE PACIENTES INFECTADOS	PREVALÊNCIA (%)	PREVALÊNCIA (%)	PREVALÊNCIA (%)
17	29,3	0	0
41	70,7	0	0

Dos 70,7% de pacientes infectados, foram observados os seguintes parasitas: *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancilostomideos* e *Hymenolepis nana* (Tabela 02). Em vários pacientes ocorreram casos de biparasitismo, triparasitismo e tetraparasitismo.

Tabela 02: Prevalência de Protozoários e Helmintos em pacientes da Instituição Filantrópica de Marília, em fezes analisadas:

PROTOZOÁRIOS	PREVALÊNCIA(%)	Nº PACIENTES
<i>G. Lamblia</i>	11,7	05
<i>E. coli</i>	23,3	10
Total	35	15
HELMINTOS	PREVALÊNCIA(%)	Nº PACIENTES
<i>A. lumbricoides</i>	23,3	10
<i>Ancilostomideos</i>	8,3	03
<i>H. nana</i>	33,3	13
Total	65	26

As mesmas análises laboratoriais foram realizadas com funcionários, os quais exercem funções intimamente ligadas aos pacientes em pesquisa, não sendo encontrado nenhum tipo de infecção parasitária.

CONCLUSÃO:

Diante dos resultados obtidos, pode-se verificar que o foco de infecção das enteroparasitoses apresentadas não está correlacionada com o material ungueal ou mãos contaminadas, levando-se a crer que o mecanismo de infecção desses pacientes é

proveniente de outro local, que não a instituição onde passam a maior parte do tempo.

Dessa forma, novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de se descobrir o verdadeiro foco das infecções.

BIBLIOGRAFIA:

1. Alves, J.A.R.; **Parasitoses intestinais na infância: interferência no crescimento.** *Pediatria Moderna.* 31(4):560-565; 1995.
2. Carvalho, M.; **CB de Parasitoses intestinais: Controle e prevenção.** *Rev. Esc. Enf. USP, São Paulo,* 24 (1):117-130; 1990.
3. Flavigna, D.L.M.; Moitinho, M.L.; Guilherme, L.F.; Pupulim, A.R.T.; Sobrinho, A.N. Fukushigue, Y.; **PARCERIA UNIVERSIDADE. Comunidade no diagnóstico e controle de parasitoses intestinais.** *Revista Unimar.* 19(2):649-659; 1997.
4. Nunes, M.P.O.; Nunes, J.F.; Silva, E.M.A.; Costa, M.S.G.; **Ocorrência de parasitoses intestinais em crianças de creche.** “Lar Menino Jesus”; Natal, RN. *RBAC.* 29(3):195-196; 1997.
5. Pupulim, A.R.T.; Guilherme, A.L.F., Flavigna, D..L.M.; Araújo, S.M., Fukushigue, Y.; **Uma tentativa de orientar comunidades escolares no controle de parasitoses.** *RBAC,* 28(3):130-133; 1996.
6. Santos, M.A.O.; Paço, J.M.; Isac, E.; Alves, E.L.A.; Vieira, M.A.; **PREVALENCIA: Estimado de parasitoses intestinais em escolares de creche e estabelecimentos de ensino em Goiânia-Goiás.** *Rev. Pat. Tp.* 19 (1):34-42; 1990.

7. Sigulem, D.M.; Tudisco, E.S.; Paiva, E.R.; Guerra, C.C.C.; **Anemia nutricional e parasitose intestinal em menores de 5 anos**. Rev. Paul. Med.; 103(6):308-312.; 1985.

8. Souza Junior, J.A.; Moura, J.R.; Bentsson, A.M.; Gouveia, A.A.; Santos L.P.; Paiva, M.L.; Silva, J.A.; **Incidência de parasitose intestinal em escolares da rede municipal de ensino da zona rural de Juiz de Fora**. Rev. Med.; 54(7):554-558; 1997.

**UM MÉTODO SIMPLES E RÁPIDO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE GALACTOSE EM SORO E URINA**

**A SIMPLE AND RAPID METHOD FOR THE MEASUREMENT OF
GALACTOSE IN SERUM AND URINE**

Eurico Camargo Neto*

*Bioquímico do Laboratório Nobel R.I.E. e do DNA4-Laboratório de Genética e Biologia
Molecular, Porto Alegre, RS

RESUMO

A galactose presente na circulação ou excretada na urina tem interesse clínico em duas situações: 1) confirmação do diagnóstico ou acompanhamento de pacientes galactosêmicos; 2) em teste de tolerância à lactose, no qual a interpretação é feita rotineiramente de forma indireta pela avaliação da glicemia. Não há disponível no mercado nacional kit comercial para a dosagem da galactose em líquidos biológicos. Neste trabalho, descreve-se um método rápido e simples para medida da galactose em soro ou urina.

PALAVRAS-CHAVE: galactose, galactosemia, lactose, teste de tolerância à lactose.

SUMMARY

Galactose present in the bloodstream or eliminated through the urine serves a clinical interest in two situations: 1) diagnostic confirmatory test or follow-up of galactosemic patients; 2) the lactose tolerance test where the interpretation is routinely made indirectly by measurement of the glucose serum levels. There is no commercial kit available in the Brazilian market for test to galactose in biologic fluids. In this paper, a rapid and easy to run test for the measurement of galactose in serum or urine is described.

KEY WORDS: galactose, galactosemia, lactose, lactose tolerance test.

INTRODUÇÃO

A determinação dos níveis séricos ou urinários da galactose e da galactose-1-fosfato não é uma solicitação rotineira em laboratórios de análises clínicas, em que pese o fato de altos níveis destes metabólitos na circulação estarem associados à galactosemia⁵ e que a intolerância à lactose (dissacarídeo composto por glicose e galactose e o principal e mais

frequente transtorno de má absorção dos hidratos de carbono⁴) seja avaliada de forma indireta após a sua ingestão e posterior avaliação da glicemia. A importância da dosagem da galactose sérica tornou-se maior mais recentemente como método auxiliar no diagnóstico da galactosemia, doença decorrente de alterações genéticas na síntese de enzimas específicas do metabolismo glicídico (particularmente a galactose-1-fosfato uridil-transferase ou, mais raramente, a galactoquinase e a galactose-4-epimerase)¹⁰. Devido à crescente pesquisa da doença em programas de triagem neonatal, um número maior de pacientes assintomáticos ou não, suspeitos de serem afetados pela doença, passaram a necessitar da dosagem sérica da galactose como método alternativo ou adicional às provas de medida de atividade enzimática ou provas de DNA (disponível em apenas alguns laboratórios de referência ou fora do país) para confirmação do teste de triagem positivo realizado em amostras de sangue seco em papel filtro¹.

A deficiência da lactase¹², enzima responsável pela degradação da lactose em glicose e galactose no lúmen intestinal, implica em diminuição da absorção ou total má absorção da lactose proveniente do leite materno ou de produtos lácteos, com consequente alteração osmótica no lúmen intestinal, resultando em cólicas e diarreia⁷. A prova laboratorial de tolerância à lactose é feita de forma indireta, baseando-se na obtenção de uma amostra de sangue basal, seguida da administração oral de 50g de lactose e colheitas de sangue em intervalos de tempo sugeridos de 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos, com posterior quantificação da glicose⁸. Outra alternativa, considerada mais confiável por alguns autores⁸ mas indisponível na maioria dos laboratórios, consiste na quantificação do hidrogênio espirado após a administração oral da lactose⁹.

Neste trabalho, apresenta-se a utilização de um kit comercial, padronizado para a quantificação de galactose e galactose-1-fosfato em sangue seco em papel filtro, adaptado

para a medida dos mesmos metabólitos em soro ou urina e obtenção dos resultados após um curto intervalo de incubação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 60 amostras de soro e 25 de urina de adultos e crianças assintomáticos e clinicamente normais, de diferentes faixas etárias.

A creatinina urinária foi dosada por método enzimático-colorimétrico em equipamento Cobas Íntegra, Roche (Kayser August, Suíça), pelo Laboratório Central da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Leitora de placas MRX, Dynex Technologies (Chantilly, VA, USA), com filtros 570/690nm.

Leitora de placas SLT Spectra (Áustria), com filtro de 550nm.

Solução padrão de galactose (Sigma, St. Louis, MI, USA): 200,00 mg/dL de galactose foi dissolvida em água deionizada e diluída de forma a obter-se concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0, 50,0 e 100,0 e 200,0 mg/dL. Água deionizada foi utilizada como ponto equivalente a zero mg/dL na curva padrão.

Componentes do kit Quantase™ Total Galactose (Quantase, Perth, Escócia), com exceção da curva padrão em papel filtro, foram preparados e utilizados de acordo com a quantidade de testes a serem realizados, nas seguintes proporções, considerando-se um volume suficiente para uma microplaca com capacidade para 96 reações:

Frasco liofilizado da coenzima (NAD): reconstituído com 44 mL de água deionizada.

Preparação da solução de trabalho:

7,5 mL da coenzima (NAD)

2,375 mL de tampão fosfato-salina (Sigma, St. Louis, MI, USA)

125 μ L de galactose desidrogenase

20 μ L de fosfatase alcalina

Reagente de cor (pronto para uso): sal de tetrazólio e aceptor intermediário de elétrons (AIE)

Princípio do teste

A galactose-1-fosfato presente na amostra é defosforilada sob ação da fosfatase alcalina, produzindo galactose. A galactose total é desidrogenada na presença de NAD pela galactose desidrogenase, obtendo-se galactonato e NADH. O nucleotídeo reduz o aceptor intermediário de elétrons (AIE) presente no reativo de cor que, simultaneamente, reage com o sal de tetrazólio incolor, obtendo-se formazan como produto final corado. A absorbância pode ser medida diretamente em duplo comprimento de onda a (570/690 nm) em escala linear/linear utilizando-se qualquer leitora de placas disponível no mercado com esta característica, ou em 550 nm.

Técnica

- 1 - Diluir cada um dos pontos da curva padrão, soro e/ou urina 1:51 (50 μ L de padrão ou amostra + 1,0 mL de água deionizada).
- 2 – Pipetar em placa de microtitulação de fundo plano 50 μ L dos padrões e amostras diluídos, em duplicata.
- 3 – Adicionar 100 μ L da solução de trabalho, preparada como descrita acima, e agitar brevemente para homogeneizar e incubar à temperatura ambiente (22-25°C) durante 30 minutos.

4 – Adicionar 100 μ L do reagente de cor, homogeneizar por 2 minutos e ler a absorbância dentro de 5 minutos em duplo comprimento de onda, em filtros de 570/690 nm, ou 570 nm.

Calcular os resultados comparando a absorbância das amostras com a curva padrão plotada em escala linear/linear.

RESULTADOS

A quantificação dos níveis séricos e urinários apresentou um coeficiente de variação máximo de 10,1% entre as duplicatas. A sensibilidade foi calculada pela média de 10 replicatas do padrão zero, correspondendo a um valor de 0,84 mg/dL, e o método mostrou-se linear até 200 mg/dL. O coeficiente de correlação linear (r) da curva padrão obtido pela média das duplicatas foi de 0,996 ($y = 0,0059x + 0,066$). A concentração média de galactose foi de 2,2 mg/dL (desvio padrão = 0,67) em amostras de soro e de 2,6 mg/dL (desvio padrão = 2,7) ou 20 μ g de galactose/mg de creatinina (desvio padrão = 10) em amostras de urina. Considerando-se como valor de referência a média obtida mais dois DP, podemos preliminarmente estabelecer para o soro uma faixa entre 0,98 e 3,54 mg/dL, e de 1,34 a 3,90 mg/dL em amostras isoladas de urina. Não houve diferença nos resultados obtidos com leituras das absorbâncias realizadas nas duas leitoras de placas utilizadas.

DISCUSSÃO

A fonte dietética mais importante de galactose é proveniente da lactose, o principal carboidrato presente no leite de mamíferos. A principal rota metabólica do metabolismo da galactose é a sua conversão em glicose através da epimerização do grupo hidroxila do carbono 4. As etapas enzimáticas deste processo foram descritas por Leloir et al^{2,3,6} e o

bloqueio da reação catalisada pela galactose-1-fosfato uridil-transferase é responsável pela galactosemia clássica¹¹.

Embora o diagnóstico definitivo da galactosemia seja demonstrado pela falta de atividade de uma das três principais enzimas do catabolismo da galactose¹⁰, a determinação dos níveis séricos deste nutriente através de um teste enzimático-colorimétrico simples e rápido pode resultar na confirmação do diagnóstico precoce da doença e na imediata instituição do tratamento, mesmo não dispensando a pesquisa da deficiência enzimática responsável pela doença. Deve-se, no entanto, levar em conta que a pesquisa das enzimas para confirmação do diagnóstico requer métodos de custo elevado e é indisponível na maioria dos laboratórios. Os valores de referência para galactose em soro e urina citados na literatura podem variar de acordo com o método empregado¹³, razão pela qual sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência. De acordo com Segal e Berry¹⁰, os níveis séricos em crianças normais são inferiores a 5 mg/dL, dado confirmado por Tietz¹³ que cita, também, valores de galactose entre 40 a 60 mg/dL de sangue total (equivalente a 100 a 150 mg/dL em amostras de soro, considerando-se um hematócrito de 40%) 60 minutos após a prova de tolerância à lactose, resultados que estão dentro dos limites da curva padrão utilizada no método aqui descrito, sem necessidade de maiores diluições da amostra. Os valores absolutos de galactose obtidos nas amostras de urina são compatíveis com os dados sugeridos por Tietz¹³ (inferior a 60 mg/dia em neonatos e inferior a 14 mg/dia em adultos), e não necessitam de correção pela creatinina urinária nos testes de tolerância à lactose, uma vez que a curva de aumento da absorção será comparada contra amostra de urina do mesmo paciente. A possibilidade de utilizar em soro ou urina uma técnica de boa reprodutibilidade e de fácil execução propicia não só o diagnóstico ou o monitoramento do tratamento de pacientes galactosêmicos, como também oferece a

alternativa de avaliar diretamente tanto a glicose quanto a galactose em testes de tolerância à lactose, necessitando apenas de uma leitora de placas (ou espectrofotômetro e correção proporcional dos volumes de reagentes, padrões e amostras) e dispensando o uso de reativos de custo elevado ou de equipamentos sofisticados.

Agradecimento:

O autor agradece à auxiliar de laboratório Cristiane Luchaquevich pela sua valiosa contribuição.

Referências bibliográficas:

1. **Becker D e Camargo Neto E.** Avaliação de um método enzimático-colorimétrico no diagnóstico neonatal da galactosemia. *Jorn Bras Patol* 31:134, 1995.
2. **Caputio R, Leloir LF, Trucco RE.** Lactase and lactose fermentation in *S. fragilis*. *Enzymologia*. 12:350, 1948
3. **Cardini CE, Leloir LF.** Enzymatic phosphorylation of galactosamine and galactose. *Arch Biochem Biophys*. 45:55, 1953.
4. **Gray GM.** Congenital and adult intestinal lactase deficiency. *N Engl J Med*. 294:1057-1058, 1976.
5. **Isselbacher KJ.** Galactosemia, galactokinase deficiency, and other rare disorders of carbohydrate metabolism. Em *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 11^a edição. Braunwald E et al (eds.), McGraw-Hill Book Company, pg 1649-1650, 1987.
6. **Leloir LF.** Enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into galactose derivative. *Arch Biochem Biophys*. 33:1038, 1951.

7. **McNeely MDD.** Enfermedades digestivas gastrointestinales. Em Química Clínica, Teoría, análisis y correlación, 1ª edição, Kaplan LA and Pesce AJ (eds.), Editorial Médica Panamaricana, Buenos Aires, Argentina, pg 557., 1986.
8. **McNeely MDD.** Enfermedades digestivas gastrointestinales. Em Química Clínica, Teoría, análisis y correlación, 1ª edição, Kaplan LA and Pesce AJ (eds.), Editorial Médica Panamaricana, Buenos Aires, Argentina, pg 562, 1986.
9. **Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ and Hofmann AF.** Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. N Engl J Med. 293:1232-1235, 1975.
10. **Segal S and Berry GT.** Disorder of Galactose Metabolism. Em The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease on CD ROM, 7ª Edição, Capítulo 25, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D (eds.) McGrall Hill, Philadelphia, 1997.
11. **Roe T and Ng WG.** Disorders of carbohydrate and glycogen metabolism. Em Physicians Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. 1ª edição. Blau N, Duran M and Blaskovics (Eds), pg 277-294, 1996.
12. **Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P e White.** Principles of Biochemistry: General Aspects, 6ª edição, McGraw-Hill Book Company, New York, pg 830, 1983.
13. **Tietz NE.** Clinical Guide to Laboratory Tests, 3ª edição, W.B. Saunders Company, Philadelphia, pg 252, 1995.