

R B A C

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Prevalência de casos de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma urealyticum</i> nas Secreções Endocervicais e Urinas de Primeiro Jato em um Laboratório de Análises Clínicas de Brusque-SC.....	83
<i>Cristina Montagner, Célia F. da Cruz, Carlos A. Albini, Rosmari Hörner & Patrícia Bernardi</i>	
Prevalence of cases <i>Mycoplasma hominis</i> and <i>Ureaplasma urealyticum</i> in endocervical secretions and first jet of urine in a laboratory of clinic analysis in Brusque - SC	
Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais.....	89
<i>Marcos K. Fleury</i>	
Beta globin haplotypes in sickle cell anemia in patients from Rio de Janeiro: Clinical and laboratory aspects	
Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (Mhb).....	95
<i>Thiago Magalhães Camargo, Maria Izalina Ferreira Alves, Sara de Jesus Oliveira, Edson S. Shitara & Yoko Oshima-Franco</i>	
Comparative study between two techniques of methemoglobin (Mhb) determination	
Revisão Rápida de 100%: um método eficiente na detecção de falso-negativo em citopatologia cervical..	99
<i>Edna Joana Cláudio Manrique; Rita Goreti Amaral; Nadja Lindany Alves Souza; Suelene Brito do Nascimento Tavares; Zair Benedita Pinheiro Albuquerque; Gislaíne Fonseca-Carvasan & Luiz Carlos Zeferino</i>	
100% Rapid Rescreening: an efficient method at detecting false negative cervical cytopathology	
Uso simultâneo do método do polimorfismo conformacional de fita simples e da citometria de fluxo no aumento da eficácia da detecção de anormalidades do gene e da proteína p53 na leucemia mielóide crônica...	103
<i>Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc, PhD); Claudete Esteves Klumb (MD, PhD); Eliane Pereira Simões Magluta; Marcos Antonio Mauricio Scheiner (MSc); Flávia da Cunha Vasconcelos; Virginia Pires (MSc, PhD); Gabriela Vasconcelos de Andrade (MSc); Luiz Otero de Carvalho; Jane de Almeida Dobbin (MD) & Raquel C. Maia (MD, PhD)</i>	
Simultaneous use of the single strand conformation polymorphism method and flow cytometry for increasing the detection efficacy of abnormalities in the gene and p53 protein in chronic myeloid leukemia	
Bactérias Isoladas de Ponta de Cateter Venoso Central e Suscetibilidade Antimicrobiana em um Hospital Público de Belém-PA.....	115
<i>Mariniza Alves Cardoso Melo; Rosana Cristiane da Silva Monteiro; Antonia Benedita Rodrigues Vieira; Maria Angélica Bolini Brazão & José Maria dos Santos Vieira</i>	
Isolated Bacteria of Tip of Central Veined Catheter and Antimicrobial Susceptibility in a Public Hospital of Belém-PA	
Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA.....	119
<i>José Maria dos Santos Vieira; Rosa Márcia Corrêa Saraiva; Lúcia Carla de Vasconcelos Mendonça; Viviane Oliveira Fernandes; Milene Regina de Carvalho Pinto; Antonia Benedita Rodrigues Vieira</i>	
Antibiotic susceptibility antimicrobial of uropathogens isolated from culture of patients with urinary tract infections from the University Hospital Bettina Ferro de Souza, Belém-PA	
Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.....	123
<i>Núbia Margani Wolschick, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Linda Emiko Suzuki & Cinthia Gandolfi Boer</i>	
Cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis, treatment and disease prevention	
Comportamento da reticulometria antes e após a suplementação dietética ferroso, em crianças com anemia ferropriva, em Erechim-RS.....	131
<i>Mezzomo, F.; Longo, K.; Aguiar, C.; Brandão, C.A.; Brandão, N. M.; Spinelli, R. & Canello, C.</i>	
Reticulometry behavior before and after the dietetic ironing supplementation in iron deficiency anemic in Erechim-RS	
Comparação de testes não treponêmicos utilizados no diagnóstico da sífilis e interferência da inativação do soro.....	135
<i>Michele Oto dos Santos, Vanessa Danielle Menjon Muller, Daniela Valscarengi, Juliana Bernardon Pretto Gonçalves & Ednéia Casagrande Bueno</i>	
Comparison of non treponemic assays used in syphilis diagnosis and interference of serum inactivation	
Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue.....	139
<i>Adroaldo Lunardelli; Fernanda Pires Borges; Karina Faccio Mello & Adriana Simone Alves Zeferino</i>	
Seroprevalence of Chagas' disease in blood donor candidates	
Teníase na população do bairro Nossa Senhora Aparecida, município de Correia Pinto - SC, em 2003 e 2004.....	143
<i>Aloisio Alberto Piroli Silva & Marcos Vinicius da Silva</i>	
Teniasis in the population of Nossa Senhora Aparecida district, county of Correia Pinto - SC, in 2003 and 2004	
<i>Staphylococcus aureus</i> oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital.....	147
<i>Fabiola Rossi Menegotto & Simone Ulrich Picoli</i>	
Resistant oxacillin <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA): incidence of cepas acquired in the community (CA-MRSA) and	
O papiloma vírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas - MG.....	151
<i>Aida Maria Alves Queiroz, Maria Aparecida Tedeschi Cano & José Eduardo Zaia</i>	
Papiloma human virus (HPV) in women taken care of for the SUS, the city of Patos de Minas - MG	

E mais...

Temas Livres do 34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2007
e do 7º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

2

VOLUME 39

2007

Prezados colegas,

***E**sta é mais uma edição especial da RBAC voltada para os trabalhos expostos em congressos. Mas não só por isso esta revista é especial. Esta revista traz o maior número de trabalhos expostos em congressos da SBAC nos últimos anos.*

O próprio Congresso Brasileiro de 2007 é especial e grande. Marca o último congresso nacional da SBAC antes do IFCC 2008. Este será em Belo Horizonte e o IFCC 2008 em Fortaleza.

Por isso nos esmeramos em fazer o melhor congresso, fincando nossa bandeira na gloriosa cidade de Belo Horizonte e convidando ao povo mineiro que compareça ao congresso de Fortaleza.

Como sempre digo, a SBAC está em constante evolução e o reflexo disso é o aumento do número de participantes e expositores a cada congresso.

O meu conselho também é de que participem mais da sua Sociedade. Envie seus artigos para a revista. Participe dos cursos e congressos.

Atualizem-se sempre.

Reciclem-se sempre.

Evoluam sempre.

*Esta é a grande lição que a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas pode lhes dar:
Nunca é tarde para fazer o melhor, nem tão cedo para começar.*

Um abraço e aproveitem BH 2007.

*Ulisses Tuma
Presidente da SBAC*

Diretor Responsável

Prof. Mateus Mandu de Souza

Vice-Diretor

Prof. João Ciribelli Guimarães

Este periódico é órgão oficial da SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS – SBAC, e destinado à divulgação de trabalhos científicos, observações pessoais, informações de interesse geral em defesa da classe dos que militam no ramo das análises clínicas, constituindo elo de união dos profissionais e fonte de estímulo na aquisição de conhecimentos que melhor os capacitem no desempenho da profissão, em benefício da comunidade.

Assinatura Anual: R\$ 105,00

Exterior US\$ 50.

Indexada no LILACS – www.bireme.br

www.bireme.br/abd/P/lista_geral.htm

Portão periódicos – www.periodicos.capes.gov.br

Classificação CAPES: Qualis Nacional B

Farmácia, Medicina, Odontologia

www.capes.gov.br - <http://qualis.capes.gov.br/pesquisa/ServletPesquisa>

Tiragem: 7.500 exemplares

Bioquímica – Dr. Álvaro Largura (PR), Dr. Marcelo Quintão Mendes (MG), Dr. Geraldo Pichet (PR), Dra. Marileia Scartezini (PR), Dr. Arício Treitinger (SC), Dr. Paolo Mocarelli (ITA), Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla (SP), Dr. Ary Henrique Filho (Urinálise) (GO), Dr. Daniel Mazziota (AR), Dr. Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Dra. Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Dra. Marinez Oliveira Sousa (MG), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

Citologia – Dr. Ely Chaves (PB), Dra. Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dr. André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Carlos Eduardo Queiroz Lima (PE), Dra. Rita Gorete Amaral (GO), Dr. Alexandre Onofre (SE), Dra. Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade – Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luís Fernando Barcelos (RS)

Endocrinologia – Dr. Carlos Alberto Camargo (SP), Dra. Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia – Dra. Regina Helena Queiroz (SP), Dra. Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia – Dr. Antônio Márcio Lopes (MG), Dr. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. Amauri Simonetti (RS), Dra. Cassia Maria Zoccoli (SC), Dra. Carmen Paz Oplustil (SP)

Imunologia – Dr. Paulo Jaconi Saraiva (RS), Dr. Antônio Walter Ferreira (SP), Dra. Adelaide José Vaz (SP)

Parasitologia – Dr. Antônio Pedro Soares (MG), Dr. Paulo S. Minami (SP), Dr. Geraldo Atílio De Carli (RS), Dr. Jerolino Lopes Aquino (MT)

Micologia – Dr. Paulo Murillo Neufeld (RJ), Dra. Maria José Gianini (SP), Dra. Regina Célia Candido (SP)

Biologia Molecular – Dr. Mario Hiroyuki Hirata (SP), Dr. Rosário Domínguez Crespo Hirata (SP), Dr. Marcelo Mascarenhas (RS), Dra. Kelly Melo (SP)

Hematologia – Dr. Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Dr. Marcos Kneip Fleury (RJ), Dr. Celso Spada (SC), Dr. Paulo César Naoum (SP), Dr. Julio Cezar Merlin (PR), Dr. Paulo Henrique da Silva (PR)



SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS*

FILIAÇÃO

IFCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE

COLABIOCLI - CONFEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE

AMN - ASOCIACION MERCOSUR DE NORMALIZACION

ONA - ORGANIZAÇÃO NACIONAL DE ACREDITAÇÃO

Rua Vicente Licínio, 99 • Tel.: (0XX21) 2187-0800 • Fax: (0XX21) 2187-0805

Rio de Janeiro • RJ • 20270-902

Home page: www.sbac.org.br • e-mail: geral@sbac.org.br

Diretoria

Presidente

Dr. Ulisses Tuma (GO)

Vice-Presidente

Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS)

Secretária Geral

Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)

Secretário

Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)

Tesoureiro

Dr. Estevão José Colnago (RJ)

Tesoureiro Adjunto

Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

MEMBROS DO CONSELHO FISCAL

Titulares: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dra. Geruza Maria Caldas Maia (RN),

Dr. Tarcísio de Oliveira Moura (PE)

Suplente: Dr. Homero Jackson de Jesus Lopes (MG), Dr. José Ronaldo Cardoso (MG) e Dr. Marcelo Pilonetto (PR)

COMISSÃO DE NORMAS E HABILITAÇÃO

Coordenação: Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ)

Membros: Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Prof. Durval Mazzei Nogueira (SP), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Luiz Fernando Barcelos (RS), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

DIRETOR DE CURSOS

Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

REPRESENTANTES:

IFCC: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Ulisses Tuma (GO)

COLABIOCLI: Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. José Abol Corrêa (RJ)

AMN - Asociación Mercosur de Normalización:

Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Luiz Fernando Barcelos (RS) e Dr. Mateus Mandu de Souza (RJ)

ONA – Organização Nacional de Acreditação:

Dr. José Abol Corrêa (RJ)

Governamental: Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Irineu Keiserman Grinberg (RS)

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE

Coordenação: Dr. José Abol Corrêa (RJ)

Assessores: Dr. André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dra. Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Marcos Kneip Fleury (RJ), Dra. Maria Isabel Figueiras Neufeld (RJ), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Paulo Murillo Neufeld (RJ), Dra. Thais Lisboa Machado (RJ)

COMISSÃO DE CONGRESSOS

Membros: Dr. Álvaro largura (PR), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Dr. Tarcísio de Oliveira Moura (PE), Dr. Ulisses Tuma (GO), Dr. Elias José Cury Júnior (GO), Dra. Maria Ordália Ferro Barbosa (GO)

INFORMATIVO DA SBAC

Membros: Dr. Antônio Jaguaribe Neto (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

CONSELHO DELIBERATIVO

Membros Natos: Prof. Ediláudio Luna de Carvalho (PB), Dr. Evanyr Seabra Nogueira (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abol Corrêa (RJ), Prof. Mateus Mandu de Souza (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Ney Haushahn (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC), Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ), Humberto Marques Tiburcio (MG)

REGIONAIS DA SOCIEDADE

Bahia: Presidente: Dr. Mário Martinelli Júnior - Vice-Presidente: Dr. Petrólio Primo Coêlho - Secretário: Dr. Anderson Lobo Alvim - Tesoureiro: Dr. Luiz Roberto de Carvalho;

Ceará: Presidente: Dr. Francisco Einstein do Nascimento - Vice-Presidente: Dr. José Antonio Perez Silveira - Secretária: Dra. Maria Guilhermina Jaborandy Rodrigues - Tesoureiro: Dra. Zirlane Castelo Branco Coelho - Tesoureira Adjunta: Dra. Maria Iracema de Aguiar Patrício;

Distrito Federal: Presidente: Dr. Antônio Alves de Sousa - Vice-Presidente: Dr. Paulo Roberto Sabino Júnior - Secretário: Dr. José Persival Rico - Tesoureiro: Dr. Hélio José de Araújo;

Goias: Presidente: Dr. Elias José Cury Júnior - Vice-Presidente: Dr. Ulisses Tuma - Secretária:

Dra. Cristina Lobo Batista de A. Bastos - Tesoureira: Dra. Maria Ordália Ferro Barbosa;

Minas Gerais: Presidente: Dr. José Ronaldo Cardoso - Vice-Presidente: Dr. José Alair Couto - Secretário: Dr. Vicente Odail de Souza Espíndola - Tesoureiro: Dr. Glauco de Paulo B. Silveira;

Paraná: Presidente: Dr. Marcelo Pilonetto - Vice-Presidente: Dr. Paulo Hatschbach - Secretário: Dr. Samuel Ricardo Comar - Tesoureiro: Dr. Luciano André Perini;

Pernambuco: Presidente: Dr. Jurandi David da Silva - Vice-Presidente: Dr. João Gonçalves Júnior - Secretária: Dra. Maria Amélia Vieira Maciel - Tesoureiro: Dr. José Araújo de Carvalho;

Rio Grande do Norte: Presidente: Dra. Geruza Maria Caldas Maia - Vice-Presidente: Dra. Lenira da Silva Costa - Secretária Geral: Dra. Andréa Luciana Araújo da C. Fernandes - Secretária: Maria da Conceição Silva Fernandes - Tesoureiro: Waldenilson Dutra Germano da Silva - Tesoureira Adjunta: Dra. Dóris Cavalcante Huguenin;

Rio Grande do Sul: Presidente: Dra. Alzira Resende do Carmo Aquino - Vice-Presidente:

Dr. Marcello Ávila Mascarenhas - Secretária: Maria Cristina Bispo Freitas - Tesoureira:

Dra. Carmen Pilla;

DELEGADOS DA SOCIEDADE

Alagoas: Dr. José Pereira Mendes Júnior; **Amazonas:** Dr. João Avelino Neto; **Espírito Santo:**

Dr. Henrique Tommasi Netto; **Maranhão:** Dra. Rita Maria do A. B. Palhano; **Mato Grosso:**

Dr. Jerolino Lopes Aquino; **Mato Grosso do Sul:** Dra. Lenilde Brandão Araújo; **Pará:** Dr. Sérgio

Juiz Vasconcelos do Vale; **Paraíba:** Dra. Tereza Cristina Davi Marques; **Piauí:** Dr. Leonardo

Ferreira Soares; **Rondônia/Acre:** Dra. Alba Lucia Cordeiro Alves; **Santa Catarina:** Dr. Caio

Roberto Salvinio; **São Paulo:** Dr. Mário Hiroyuki Hirata; **Sergipe:** Dra. Maria da Conceição L.

Oliveira; **Tocantins:** Dr. Francisco Wellington Macedo.

Prevalência de casos de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* nas Secreções Endocervicais e Urinas de Primeiro Jato em um Laboratório de Análises Clínicas de Brusque-SC*

Prevalence of cases *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in endocervical secretions and first jet of urine in a laboratory of clinic analysis in Brusque – SC

Cristina Montagner¹, Célia F. da Cruz², Carlos A. Albini³, Rosmari Hörner⁴ & Patrícia Bernardi⁵

RESUMO - *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* são os menores e mais simples procariontes que conseguem ter vida livre na natureza; desprovidos de parede celular, possuem apenas uma membrana lipoprotéica. Podem ser isolados do trato genituri-nário de homens e mulheres assintomáticos como comensais mas, também, podem ser considerados agentes de uretrites, prostatites, epididimites, vaginoses, doença inflamatória pélvica, abortos, partos prematuros, corioamnionites, salpingites, febre puerperal, infertilidade, pielonefrites e infecções no recém-nascido. O presente trabalho visou estabelecer a prevalência de *M. hominis* e *U. urealyti-cum* em secreções endocervicais e urinas de primeiro jato no Laboratório Hoffmann de Análises Clínicas de Brusque, Santa Catarina, no período de agosto a dezembro de 2003. Foram analisadas 62 secreções endocervicais e 32 urinas de primeiro jato; utilizando o Kit para Micoplasma (Newprov), que permite identificação, quantificação e crescimento de colônias. Desenvolveram crescimento 25,8% das secreções endocervicais e 28,1% das urinas de primeiro jato, foi verificada presença de abundantes leucócitos em um número sig-nificativo de amostras e encontrou-se, nas secreções endocervicais, associação dos micoplasmas com outras patologias. Os resultados obtidos revelaram que o *M. hominis* e o *U. urealyticum* são patógenos importantes e devem ser pesquisados, identificados e quanti-ficados como exames de rotina nos laboratórios de análises clínicas.

PALAVRAS-CHAVE - *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, trato geniturinário.

SUMMARY - *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* are the smaller and the simplest procariont that achieves having a life free in the nature, without cellular wall, owning only a lipoprotein membrane. They can be alone in men and women genituri-narium treatment bringing no symptoms as comensals, but they can be considered urethritis agents, prostatitis, epididimitis, vaginosis, pel-vic inflammation illness, abortion, premature childbirth, chorioamnionitis, salpingitis, puerperal fever, no possibility of having children, pielonefritis and infections in babies that have just borned. This present article tried to establish the prevalence of *Mycoplasma homi-nis* and *Ureaplasma urealyticum* in endocervical secretions and first jet of urine in the Hoffmann laboratory of clinic analysis located in Brusque, Santa Catarina, during the period from August to December of 2003. We analyzed 62 endocervical secretions and 32 first jet of urine, using the Kit for "Micoplasma" (Newprov), that permitted the identification, qualification and the colonies growth. 25,8% of the endocervical secretions and 28,1% of the first jet of urine desenvolved a growth, which was noticed the appearance of abund-ants white cells in a meaningful number of samples and was found, in the endocervical secretions, the association of micoplasm with others pathologies. The results gotten, exposed that *M. hominis* and *U. Urealyticum* are important pathogens and should be searched, identified and qualified as daily exams in laboratories of clinic analysis.

KEYWORDS - *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and genituriarium treatment.

INTRODUÇÃO

Mycoplasma hominis e *Ureaplasma urealyticum* estão as-sociados principalmente com a colonização e doença do trato genital em adultos e do trato respiratório em neonatos²¹. Pertencem aos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, res-pectivamente, os quais constituem a família *Mycoplasmataceae*; que pertence à classe dos Mollicutes⁷.

São singulares entre as bactérias, uma vez que carecem de parede celular, o que os torna resistentes às penicilinas, ce-falosporinas, vancomicina e outros antibióticos que interfe-rem na síntese da parede celular²⁷. Possuem membrana tri-laminar formada por 1/3 de lipídios e 2/3 de proteína. Não se coram pelo método de Gram, mas se coram (fracamen-te) pelo Giemsa¹³.

São suscetíveis às condições adversas do meio, ocorrendo sua lise ao choque osmótico, contato com detergentes, ál-coois e anticorpos específicos ligados ao complemento. São, também, sensíveis às variações bruscas de pH e tem-peratura²⁸. São anaeróbios facultativos²⁷.

São os menores e mais simples procariontes que conse-guem ter vida livre na natureza; se autorreplicam, dividin-do-se por fissão binária. Possuem genoma pequeno, cons-tituído por DNA circular de fita dupla e RNA; o genoma é cerca de seis vezes menor que o da *E. coli*, o que torna sua capacidade biossintética limitada²¹, explicando a existência saprofítica ou parasitária dos micoplasmas^{18, 27, 28, 34}.

Mycoplasma hominis descarboxila arginina enquanto *Ure-aplasma urealyticum* hidrolisa uréia; estas provas bioquí-micas são úteis na sua identificação⁹.

Os micoplasmas têm a capacidade de aderir firmemente na

Recebido em 22/08/2006

Aprovado em 21/12/2006

*Trabalho apresentado ao Curso de Especialização em Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de especialista, realiza-do no Laboratório Hoffmann de Análises Clínicas de Brusque, Santa Catarina.

¹Aluna do Curso de Especialização em Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

²Professora do Curso de Especialização em Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Diretora Técnica do LACEN/PR.

³Professor Adjunto II – Departamento de Patologia Médica – UFPR, Professor do curso de Especialização em Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

⁴Professora de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de Santa Maria-RS.

⁵Farmacêutica – Bioquímica responsável pelo setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas Verner Willrich-Brusque, Santa Catarina

superfície celular¹⁴. Eficiente mecanismo de aderência é requisito para sua sobrevivência e patogenicidade, evitando, assim, que eles sejam expulsos através de secreções mucosas e do fluxo urinário²².

Durante o crescimento os micoplasmas liberam metabólitos e enzimas³⁴; como por exemplo o peróxido de hidrogênio e a amônia, que se acumulam e causam danos aos tecidos do hospedeiro²⁸. Dependendo da relação parasito/hospedeiro, os micoplasmas podem se tornar parasitas por excelência, pois podem não matar a célula e esta situação pode levar ao estresse, permitindo que a célula se torne mais suscetível a outras infecções e variações ambientais³⁴.

A colonização provavelmente resulta de um contato sexual primário e ocorre em mais de 80% dos indivíduos que tiveram três ou mais parceiros sexuais³². Isto também é reafirmado por estudos realizados por Belkum *et al.*, que concluíram que as infecções por *M. hominis* são vistas frequentemente no grupo de pacientes com mais alta promiscuidade⁶. A porcentagem de colonização citada na literatura varia de autor para autor e parece ser diferente de uma população para outra²⁸.

M. hominis pode ser isolado de 1-5% dos homens assintomáticos e de 30-70% das mulheres assintomáticas; as taxas aumentam para 20% e para mais de 90% em homens e mulheres, respectivamente, nos pacientes atendidos em clínicas para doenças sexualmente transmitidas. *U. urealyticum* é encontrado no trato genital de 5-20% dos homens sexualmente ativos¹⁸, e de 40-80% das mulheres sexualmente ativas^{1, 9, 18}.

Nas mulheres a colonização de *M. hominis* e *U. urealyticum* está ligada a idade jovem, baixo nível sócio-econômico, atividade sexual com múltiplos parceiros, raça e uso de contraceptivo oral⁹. Parecem isolados com maior frequência em mulheres grávidas que em mulheres não grávidas e tem-se isolado com menor frequência logo após a menopausa²⁸. Knox *et al.* mostraram que 88% das mulheres grávidas que fizeram parte do seu estudo estavam colonizadas por *U. urealyticum* em seu primeiro exame pré-natal²⁰.

De acordo com Tortora *et al.* a segunda causa mais comum de uretrite não gonocócica e infertilidade é provavelmente o *Ureaplasma urealyticum*³⁵.

Alguns estudos demonstram que a importância dos ureaplasmas é obscura por que podem ser isolados em muitas pessoas assintomáticas³¹. Porém, outros consideram o *Ureaplasma urealyticum* como patógeno do trato urogenital porque seu isolamento é mais prevalente em pacientes com uretrite não gonocócica que em assintomáticos²⁵.

Estudo realizado por Gall *et al.* em um hospital militar na Alemanha revelou uma positividade para *U. urealyticum* de 13,4% e para *M. hominis* de 5,4%; ficando estes patógenos atrás apenas da *N. gonorrhoeae* (18%) e da *C. trachomatis* (26%)¹⁶.

Dados descritos por Cordova e Cunha, trazem que o *Mycoplasma hominis* é implicado na etiologia das uretrites não gonocócicas em 3 a 4% dos casos; e o papel do *Ureaplasma urealyticum* na mesma etiologia é relevante, sendo isolado em cerca de 12% destes indivíduos¹².

Parece, também, que o *U. urealyticum* pode chegar à próstata durante infecção aguda da uretra, havendo evidências de sua etiologia nas prostatites¹². Mas é causa rara de epididimite²¹.

O papel do *U. urealyticum* em infertilidade masculina é controverso. Segundo estudos feitos por Calonge *et al.* os espermatozoides possuem receptores específicos para *U. urealyticum*, os sulfagalactoglicerolipídeos, presentes predominantemente na superfície côncava da cabeça dos gametas, permitindo a fixação destes microrganismos²⁸.

Busolo *et al.* (1984) demonstraram a habilidade dos ureaplasmas de se ligar à superfície de membrana do espermatozoide e Rose & Scott (1994) mostraram que o ureaplasma pode alterar a concentração do esperma, velocidade e motilidade dos espermatozoides e a perda da capacidade de fertilização "in vitro"; pode também produzir peróxidos que causam danos aos espermatozoides, afetando, portanto, a habilidade de fertilizar oocistos²⁴.

Também, o ataque de *U. urealyticum* aos espermatozoides poderia possibilitar o transporte passivo de microrganismos ao trato superior feminino, afetando a fertilidade feminina^{19, 28}. Um dado curioso é que o *U. urealyticum* e o *M. hominis* podem ser isolados mais frequentemente do trato geniturinário de casais inférteis que de casais férteis³⁰.

M. hominis e *U. urealyticum* são frequentemente isolados em mulheres com vaginose bacteriana, acreditando-se que a vaginose resulte de uma complexa interação entre microrganismos bacterianos aeróbios e anaeróbios, porém o papel dos micoplasmas genitais na enfermidade ainda não é completamente conhecido²¹.

Estudos têm demonstrado que a presença de "clue cells" é positivamente associada à ocorrência de infecção por *M. hominis*, sendo este, diagnosticado através de técnica de PCR⁶. A possibilidade de outro microrganismo causar a doença e ao mesmo tempo criar condições favoráveis para o crescimento dos micoplasmas não pode ser afastada²⁸. Acredita-se que os micoplasmas poderiam se aderir às células epiteliais esfoliadas pelo pH alcalino produzido pelas "clue cells"⁹.

Em um estudo foram isolados mais frequentemente *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* de mulheres com indicadores positivos de vaginose do que em mulheres sem vaginose bacteriana. Embora a patogênese esteja ainda obscura, o micoplasma urogenital na presença da *Gardnerella vaginalis* ou outra microbiota anaeróbica pode, às vezes, ser responsável por esta condição; especialmente se a microbiota normal estiver modificada, como por exemplo: ação hormonal⁹.

A gravidade aumenta quando dados demonstram que a vaginose bacteriana pode levar à Doença Inflamatória Pélvica (DIP)¹². A DIP é uma infecção da parte superior do aparelho reprodutor feminino, ascendente ao útero, trompas de Falópio, ovários e revestimento peritoneal adjacente¹³. Em cerca de 75 a 80% dos casos de doença inflamatória pélvica, o agente etiológico é sexualmente transmissível, como a *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. hominis* e *U. urealyticum*²⁸. O *M. hominis* tem sido isolado de cerca de 17% de mulheres com salpingite diagnosticada por laparoscopia¹².

A presença dos micoplasmas no trato urogenital de mulheres gestantes pode ter maiores consequências; uma vez que *M. hominis*, está ocasionalmente associado, assim como *U. urealyticum*, com corioamnionite, aborto, natimortos e morte fetal intra-uterina^{12, 20, 21}.

Pesquisas realizadas por Donders *et al.* sobre a relação de vaginose bacterianas e micoplasmas com o risco de aborto espontâneo concluíram que a interrupção da gravidez é cinco vezes mais frequente quando associada à vaginose bacteriana, e entre os microrganismos mais encontrados estão a *Gardnerella vaginalis*, o *U. urealyticum* e o *M. hominis*¹⁵.

Segundo Koneman *et al.*, *U. urealyticum* pode ter participação no aborto espontâneo, devido a sua capacidade de causar corioamnionite²¹. A corioamnionite é uma patologia caracterizada por maciça infiltração de leucócitos polimorfonucleares no córion, âmnion e cordão umbilical¹³. Abele-Horn *et al.* demonstraram que alto nível de colonização por *U. urealyticum* aumentou o risco de corioamnionite e partos prematuros e 32% das crianças prematuras tiveram baixo peso ao nascer^{1, 31}.

Ainda com relação à gestação, *M. hominis* e *U. urealyticum* têm sido isolados da cultura de sangue de mulheres com febre pós-parto; em alguns casos ambos são encontrados simultaneamente¹³. A bacteremia pós-parto resulta da ascensão do microrganismo do sítio de colonização vaginal para o endométrio, onde aparentemente causa endometrite^{21, 5}. A endometrite pós-parto (PPE) é considerada uma complicação maior da gravidez; o *M. hominis* e o *U. urealyticum* são listados como agentes etiológicos¹⁰.

Crianças nascidas de mães colonizadas por micoplasmas genitais freqüentemente também estão colonizadas²¹. Isto foi confirmado por Chua *et al.* que obtiveram uma taxa de transmissão de 88,2% para *U. urealyticum* e 30% para *M. hominis*¹¹.

Nos lactentes, podem realmente estar associados com doença pulmonar crônica, síndrome respiratória, displasia broncopulmonar, pneumonia, meningite e infecções sistêmicas^{21, 31}.

No trato urinário estes microrganismos têm causado muitos sintomas urinários crônicos em mulheres; Potts *et al.*, estudaram mulheres com piúria e obtiveram culturas positivas para micoplasmas em 48% dos casos³⁰. Também, no trato urinário superior de indivíduos com sintomas de infecção aguda, supõe-se que o *M. hominis* esteja envolvido em 5% dos casos de pielonefrite¹².

Os micoplasmas podem, ainda, estar envolvidos em outras patologias extras genitais como síndrome de Reiter (uretrite ou cervicite + conjuntivite + lesões muco cutâneas), ocorrendo na maioria dos casos em indivíduos predispostos geneticamente (aqueles que têm o antígeno de histocompatibilidade HLA – B27); ainda presentes em casos de artrite em indivíduos hipogamaglobulinêmicos, agentes infecciosos oportunistas na doença de Hodgkin, lúpus eritematoso sistêmico, transplantes, infecções em ferimentos cirúrgicos, doenças cardíacas, leucemia, artrite reumatóide e síndrome da imunodeficiência adquirida^{12, 23, 28}.

Considerando a importância dos micoplasmas, a transmissão, as várias patologias que podem estar envolvidos e suas conseqüências; o presente estudo teve por objetivo avaliar a prevalência de casos de *M. hominis* e *U. urealyticum* em secreções endocervicais e urinas de primeiro jato em um laboratório de SC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas 94 amostras, sendo 32 urinas de primeiro jato e 62 secreções endocervicais, no período de agosto a dezembro de 2003. Os materiais foram provenientes de pacientes atendidos no Laboratório Hoffmann de Análises Clínicas de Brusque - Santa Catarina, com solicitação de cultura para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. As secreções endocervicais foram coletadas com swab comum estéril no laboratório e as urinas de primeiro jato em frasco estéril.

Para a análise, seguiu-se o método descrito no Manual de procedimentos Laboratoriais em Microbiologia (PILONETTO, M. PILONETTO, D. V., 1998.).

Na identificação, foi utilizado o Kit para Micoplasma (Newprov), composto de caldo A_{3xb}, caldo MLA, caldo U₁₀ e placa de meio A₇.

Após a coleta da secreção endocervical, o swab foi colocado no meio de transporte A_{3xb} para descarregar o material colhido; a urina de primeiro jato foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante e, após, 0,5 ml do sedimento foi transferido para o meio de transporte A_{3xb}. A amostra foi inoculada nos tubos MLA, U₁₀ e na placa A₇ através de pipeta automática com ponteira estéril; transfe-

rindo-se 0,25 ml do meio de transporte para os respectivos tubos e placa, conforme ilustra a figura I. Os tubos MLA e U₁₀ foram vedados com vaselina estéril e incubados a 35-37° C por 24 a 48 horas. A placa de A₇ foi incubada em jarra com tensão de CO₂, a 35-36° C por até sete dias.

O meio de A_{3xb} restante foi congelado a -20° C.

A identificação destes microorganismos foi baseada na utilização dos substratos específicos, com conseqüente viragem do indicador de pH, tornando-se vermelho (Figura II), e também na morfologia da colônia de cada espécie.

Nas amostras que continham o *U. urealyticum* observou-se coloração vermelha rosácea no meio de U₁₀, e na placa de A₇ colônias marrom douradas. (Figura III)

Nas amostras que continham o *M. hominis* observou-se a coloração vermelha rosácea no meio MLA, e na placa de A₇ colônias semelhantes a ovo frito. (Figura IV)

Para leitura das placas de A₇, foi utilizado microscópio ótico com objetiva de 10x de aumento.

Na viragem do pH ou surgimento de colônias procedeu-se a quantificação; foi descongelado o A_{3xb} e aliqotado o meio U₁₀ ou MLA conforme o microrganismo isolado em 4 mini-tubos estéreis, cada um com 0,225 ml. Posteriormente, transferido 0,025 ml do tubo de A_{3xb} para o 1° tubo de caldo MLA ou U₁₀ e deste transferido 0,025 ml para o 2° tubo e assim, sucessivamente, até o 4° tubo; vedados e incubados conforme procedido anteriormente. (Figura V)

O resultado foi dado em Unidade Formadora de Cor (UFC/ml) Quando apenas o 1° tubo foi positivo significava um resultado ≤10 UFC/ml; o 2° tubo positivo ≤100 UFC/ml, o 3° tubo a contagem significava ≤1.000 UFC/ml e, se todos os tubos fossem positivos, o resultado foi ≥10.000 UFC/ml; e este considerado como sugestivo de infecção.

Paralelamente, foi realizada leitura a fresco de lâminas com esfregaço das secreções endocervicais e dos sedimentos urinários e, posteriormente, coradas pelo Gram; com a finalidade de realizar uma avaliação da presença e quantidade de leucócitos nas amostras e também para descartar provável contaminação do meio por outras bactérias, bem como, relacionar, nas secreções endocervicais, a associação dos micoplasmas com outras patologias como fungos ou vaginose bacterianas.

Para a quantificação dos leucócitos seguiu-se o Microscopio: coloração de Gram (Albini, C. A. *et al.*, 2002), o qual descreve da seguinte forma: raros (número inferior a 1 leucócito por campo de pequeno aumento), poucos (de 1 a 10 leucócitos por campo de pequeno aumento), moderados (de 11 a 25 leucócitos por campo de pequeno aumento) e abundantes (superior a 25 leucócitos por campo de pequeno aumento).

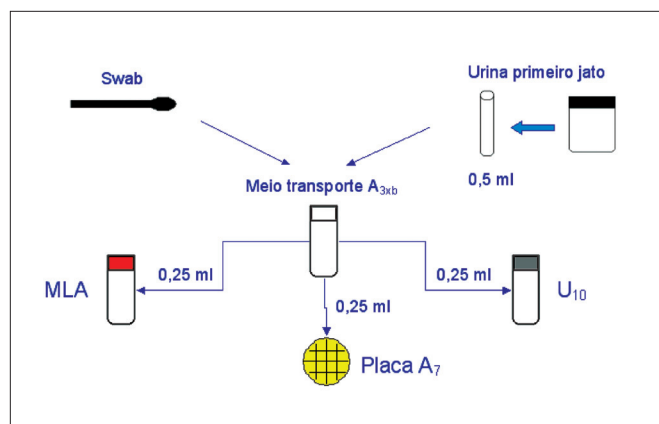
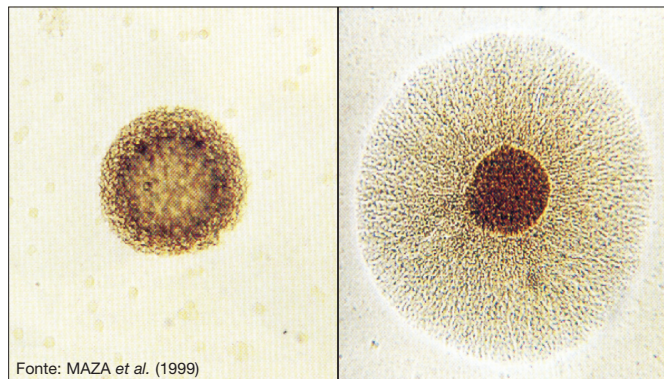


Figura I



Figura 2: Ilustração da viragem de pH de amarelo para vermelho observada nos meios líquidos.



Fonte: MAZA et al. (1999)

Figura 3: Colônia de *U. urealyticum* em meio de A7

Figura 4: Colônia de *M. hominis* em meio de A7

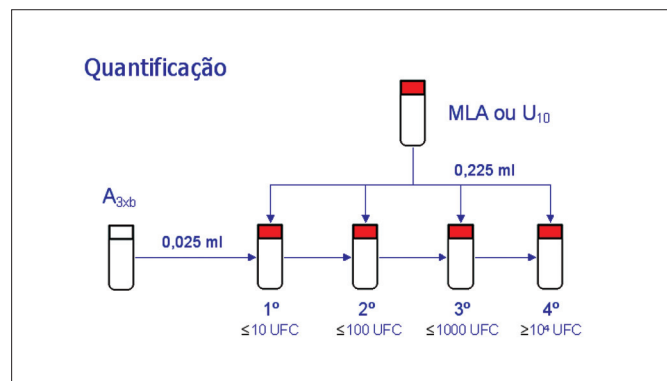


Figura 5

RESULTADOS

Das 94 amostras estudadas, 62 (66%) foram secreções endocervicais e 32 (34%) urinas de primeiro jato.

Desenvolveram crescimento 16 culturas provenientes das secreções endocervicais e 9 culturas das urinas de primeiro jato, perfazendo um percentual de 25,8% e 28,1% respectivamente. (Figura VI)

Quanto à prevalência de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* constatou-se predomínio de *U. urealyticum* em ambos materiais.

Nas secreções endocervicais, para o *U. urealyticum*, foram obtidas 3 amostras com crescimento superior a 10^4 UFC, 2 com crescimento ≤ 1000 UFC; 5 com crescimento ≤ 100 UFC e 4 amostras com crescimento ≤ 10 UFC. O *M. hominis* totalizou 2 amostras com crescimento superior a 10^4 UFC e 3 amostras com crescimento ≤ 100 UFC, como ilustra a Figura VII.

Das 9 urinas de primeiro jato que desenvolveram crescimento, obteve-se o *U. urealyticum* em 4 culturas com contagem superior a 10^4 UFC, 2 amostras com crescimento ≤ 1000 UFC e uma com crescimento ≤ 10 UFC; o *M. hominis* teve crescimento superior a 10^4 UFC em 3 amostras, crescimento ≤ 1000 UFC em uma amostra e crescimento ≤ 100 UFC também em apenas uma amostra. (Figura VIII)

A tabela I compara a quantidade de amostras com crescimento superior a 10^4 UFC entre os sexos feminino e masculino e demonstra a prevalência em percentuais.

Foi verificado crescimento de ambos os agentes em 2 das 16 amostras de secreção endocervical e em 3 das 9 culturas de urina de primeiro jato.

Através da leitura a fresco e posterior coloração de Gram dos materiais pesquisados, constatou-se presença de abundantes leucócitos (número superior a 25 leucócitos por campo de pequeno aumento) em 11 das 16 amostras de secreção endocervical; sendo destas 11, cinco amostras com crescimento superior a 10^4 UFC, três correspondentes ao *U. urealyticum* e duas ao *M. hominis*. Das 9 urinas de primeiro jato, em 6 observou-se abundantes leucócitos e destas 6, três amostras com crescimento superior a 10^4 UFC, duas correspondentes ao *U. urealyticum* e uma ao *M. hominis* (Figura IX).

Também, foi observado pelo Gram a associação dos micoplasmas com outros agentes patológicos nas secreções endocervicais: três amostras associadas com *Gardnerella vaginalis*, duas amostras com *Mobiluncus* sp e uma amostra associada com a presença de leveduras e pseudo-hifas.

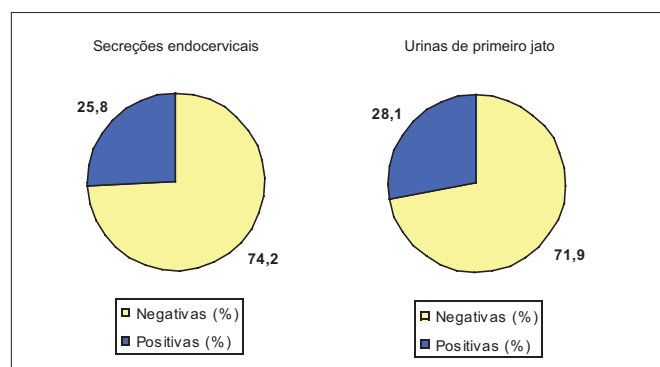


Figura 6

Percentual de positividade de acordo com o material estudado no laboratório de análises clínicas de Brusque-SC, 2003. (n= 62 secreções endocervicais e 32 urinas de primeiro jato)

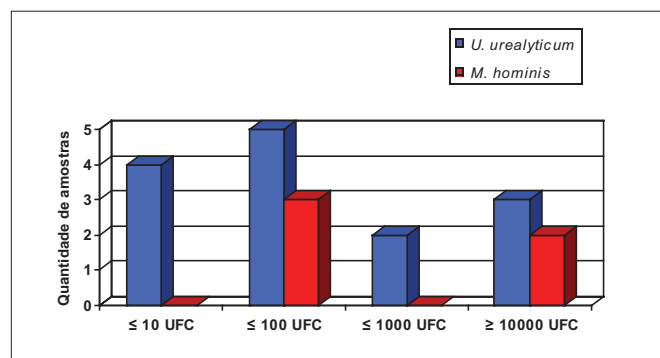


Figura 7: Relação do crescimento de *U. urealyticum* e *M. hominis*, em Unidades Formadoras de Cor, e suas respectivas quantidades de amostras nas secreções endocervicais.

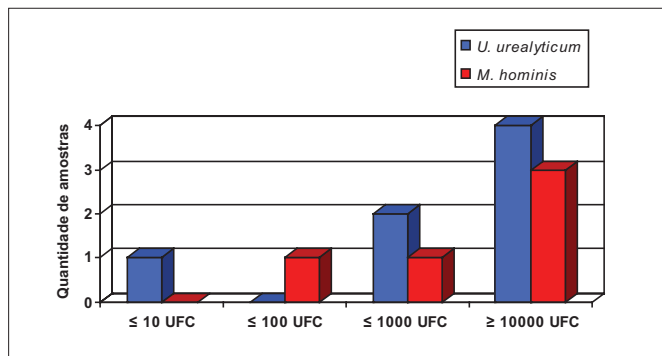


Figura 8: Relação do crescimento de *U. urealyticum* e *M. hominis*, em Unidades Formadoras de Cor, e suas respectivas quantidades de amostras nas urinas de primeiro jato.

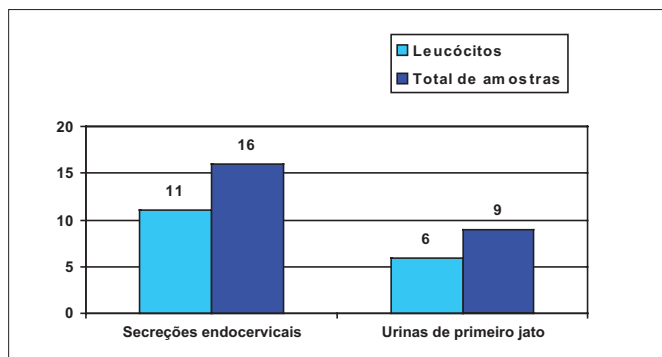


Figura 9: Representação do número de amostras com abundantes leucócitos, nos materiais pesquisados.

Tabela I

Tabela comparativa do crescimento superior a 10⁴ UFC nas duas espécies para ambos os sexos.

SEXO	Amostras analisadas	Crescimento ≥ 10 ⁴ UFC U. u *	U. u %	Crescimento ≥ 10 ⁴ UFC M. h **	M. h %
Masculino	32	4	12,5	3	9,37
Feminino	62	3	4,84	2	3,22

* U. u = *Ureaplasma urealyticum*
 ** M. h = *Mycoplasma hominis*

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi pesquisada a incidência de *M. hominis* e *U. urealyticum* em secreções endocervicais e urinas de primeiro jato, em um laboratório privado; constatou-se um percentual de positividade nas urinas de primeiro jato de 28,1%, enquanto que nas secreções endocervicais obteve-se 25,8%. Também foi superior, nas urinas de primeiro jato, a quantidade de amostras com crescimento ≥ 10⁴ UFC. De acordo com os resultados obtidos, a população masculina apresentou maior percentual, o que não corrobora com referências já descritas: "Alguns micoplasmas são habitantes do trato geniturinário, sobretudo em mulheres" (Jawetz *et al.* 1995). Segundo o mesmo autor, a taxa de isolamento em mulheres assintomáticas é de 80% enquanto que nos homens a maior porcentagem citada é 20%. Koneman *et al.*, referindo-se aos micoplasmas, também, descreve: "Foram recuperados com mais frequência do trato genital de mulheres, com taxa de isolamento vaginal de 35% a 80% dependendo da população estudada".

É necessário avaliar fatores que podem gerar falhas na análise como: a atenção na quantidade da amostra coletada para obter material adequado e suficiente; outro fator importante é o local da coleta, para alguns autores como Cummin e Mc Cormack, amostras vaginais são mais prováveis de conter *M. hominis* e *U. urealyticum* que materiais do canal endocervical, fórnix posterior ou uretra feminina²⁸. Mas Ceccareli *et al.*, obtiveram maior positividade nas secreções endocervicais dentre todos os materiais pesquisados; e salienta-se ainda que os micoplasmas, devido à ausência da parede celular, são extremamente suscetíveis às condições adversas do meio.

Tem sido relatado na literatura que o *Ureaplasma urealyticum* é o agente mais isolado em ambos materiais^{7, 8, 12, 18, 21, 27}, os dados encontrados neste trabalho são compatíveis, mas vale ressaltar que o *M. hominis* apresentou, nas urinas de primeiro jato, um percentual de crescimento superior a 10⁴ UFC de 9,37%, o qual é mais elevado que o descrito por outros autores como Gall *et al.* (1999) 5,4%, Cordova e Cunha (1999) 3% a 4% e, ainda, o *M. hominis* é causa, relativamente pouco comum, de uretrite²¹.

O resultado quantificado, obtido através das diluições, fornece ao clínico um dado útil para análise, pois um crescimento superior a 10⁴ UFC é sugestivo de infecção e contagens inferiores podem sugerir que o microrganismo pertença a microbiota normal ou que o paciente está em tratamento³.

Verificou-se presença de abundantes leucócitos em 11 das 16 amostras de secreção endocervical e em 6 das 9 urinas de primeiro jato; demonstrando que a presença de leucócitos pode ser outro dado auxiliar importante visto que, também, estavam presentes em amostras com crescimento superior a 10⁴ UFC. A presença de leucócitos, também, foi observada em um grande número de amostras pesquisadas por Cedilo-Ramírez *et al.* (2000)

No presente estudo, verificou-se a associação dos micoplasmas com outros patógenos, entre eles, a *Gardnerella vaginalis*, em três amostras; o *Mobiluncus* sp, em duas amostras; leveduras e pseudo-hifas, em uma amostra. Muitos trabalhos já evidenciaram estas associações: Ceccareli *et al.* (1995), encontraram entre os agentes mais frequentes a *Candida albicans* e a *Gardnerella vaginalis*⁸; Silva *et al.* (2000), realizaram cultura para micoplasmas e observaram, através de fotomicrografia, a presença de *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus* sp em secreções colhidas do fundo de saco posterior; descreveram assim o laudo: "Vaginose bacteriana associada à exacerbação dos micoplasmas urogenitais (*M. hominis* e *U. urealyticum*)"³³, e Belkum *et al.* (2001), nas suas pesquisas, relataram estas associações através de porcentagens: *C. albicans* 11%, vaginose bacteriana 38% e *T. vaginalis* 71%⁶.

Considerando os relatos das literaturas e os resultados obtidos neste estudo, é possível compreender a grande relação dos micoplasmas com o trato geniturinário e a dificuldade em alguns casos de considerá-los agentes patogênicos.

O número de casos clínicos com presença confirmada de micoplasmas urogenitais pode ser ainda considerado pequeno e deixar dúvidas quanto ao seu envolvimento etiológico¹³. Então, tornam-se necessários mais estudos para elucidar a diferença substancial dos resultados, em estabelecimentos públicos e privados, realizando-se coletas de vários sítios anatômicos, em ambos os sexos, idade, condição sócio-econômica, gestantes e recém-natos. Avaliar tópicos importantes como a presença e quantidade de leucócitos, infecção com ambos os agentes, e traçar um perfil da associação destes com as vaginoses bacterianas e outras patologias. Contudo, pode-se concluir que em algumas condições eles

são suspeitos de patógenos potenciais e, para tal, se faz uso de antibióticos; portanto, a detecção fidedigna desses microrganismos é essencial. Uma infecção não tratada corretamente pode levar a seqüelas graves já descritas neste trabalho.

Tendo em vista os resultados obtidos, ressalta-se a grande importância do laboratório realizar a identificação e quantificação dos agentes, bem como, a coloração de Gram, uma arma útil para investigar a associação com outros patógenos, observar a presença de leucócitos e um controle de qualidade nas possíveis contaminações, visando assim auxiliar o clínico. Existem vários métodos e kits, disponíveis no mercado, que possibilitam a identificação destes agentes, sendo de grande valia para os laboratórios, mesmo de pequeno porte, realizarem este exame como rotina. Além de um diagnóstico adequado, é também necessário a conscientização dos profissionais da saúde e da população em geral, quanto aos possíveis danos causados pelos micoplasmas; abordagens em programas de controle de doenças sexualmente transmissíveis, atenção redobrada nas infecções em imunocompetentes, acompanhamentos pré-natais para diagnóstico precoce, evitando problemas durante a gravidez e, posteriormente com o recém-nato, são medidas preventivas que podem e devem ser realizadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Análises Clínicas Hoffmann que possibilitou efetuar este trabalho e às pessoas que foram imprescindíveis na realização deste: Carmem Dickow e Dilnei Santi.

REFERÊNCIAS

1. ABELE-HORN, M.; SCHOLZ, M.; WOLFF, C.; KOLBEN, M. High-density vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as a risk factor for chorioamnionitis and preterm delivery. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 79, p. 973-978, 2000.
2. AGARWAL, P.; RAJADURAI, V. S.; PRADEEPKUMAR, V. K.; TAN, K. W. *Ureaplasma urealyticum* and its association with chronic lung disease in Asian neonates. *J. Paediatr. Child Health*, v. 36, p. 487-490, 2000.
3. ALBINI, C. A.; SOUZA, H. A. P. H. M.; PEREIRA, S. M. Manual Newprov de Microbiologia, Curitiba: Microscience, 2002. p. 95-98.
4. ALBINI, C. A.; SOUZA, H. A. P. H. M.; STINGHEN, A. E. M. Coloração de Gram – Como fazer, interpretar e padronizar, Curitiba: Microscience, 2002. p. 07.
5. ANDREWS, W. W.; HAUTH, J. C.; CLIVER, S. P.; SAVAGE, K.; GOLDENBERG, R. L. Randomized Clinical Trial of Extended Spectrum Antibiotic Prophylaxis with Coverage for *Ureaplasma urealyticum* to Reduce Post-Cesarean Delivery Endometritis. *Obstetrics & Gynecology*, v. 101, n. 6, p. 1183-1189, 2003.
6. BELKUM, A. van; SCHEE, C. van der; MEIJDEN, W. I. van der; VERBRUGH, H. A.; SLUITERS, H. J. F. A clinical study on the association of *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* infections in women attending a sexually transmitted disease (STD) outpatient clinic. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 32, p. 27-32, 2001.
7. CADEMARTORI, B. G.; FREITAS, A. L. P. Importância da Detecção de Micoplasmas e Ureaplasmas em Secreção do Trato Genital Feminino. *Revista NewsLab*, n. 50, p. 120-124, 2002.
8. CECCARELLI, V. R. S. M.; KURIKI, K. H.; VINAGRE, A. C. P.; YARA, T. I. Importância de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* em Materiais "Urogenitais". *Revista NewsLab*, n. 9, p. 28-30, 1995.
9. CEDILLO-RAMÍREZ, L.; GIL, C.; ZAGO, I.; YÁÑEZ, A.; GIONO, S. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with Some Indicators of Nonspecific Vaginitis. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 42, p. 1-6, 2000.
10. CHAIM, W.; HOROWITZ, S.; DAVID, J. B.; INGEL, F.; EVINSON, B.; MAZOR, M. *Ureaplasma urealyticum* in the development of postpartum endometritis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 109, p. 145-148, 2003.
11. CHUA, K. B.; NGEOW, Y. K.; NGEOW, K. B.; CHYE, J. K.; LIM, C. T. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* Isolation from Cervical Secretions of Pregnant Women and Nasopharyngeal Secretions of their Babies at Delivery. *Medical Journal Singapore*, v. 39, n. 7, p. 300-302, 1998.
12. CORDOVA, C. M. M.; CUNHA, R. A. F. Importância da Pesquisa de Micoplasmas no Trato Urogenital. *Revista Laes e Haes*, n. 121, p. 110-119, 1999.

13. CRUZ, C. F. Importância da Pesquisa de Micoplasmas Urogenitais. 1994. 61 p. Monografia (Especialização em Bacteriologia) – Departamento de Patologia Médica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
14. DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. Tratado de Microbiologia. ed. 2. Espanha: Salvat, 1978. p. 957-958.
15. DONDERS, G. G. G.; BULCK, B. V.; CAUDRON, J.; LONDERS, L.; VEREECKEN, A.; SPITZ, B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 183, n. 2, p. 431-437, 2000.
16. GALL, H.; BECKERT, H.; MEIER-EWERT, H.; TUMMERS, U.; PUST, R. A.; PETER, R. U. Erregerspektrum der Urethritis des Mannes. *Hautarzt*, v. 50, n. 3, p. 186-193, 1999.
17. HORNER, P.; THOMAS, B.; GILROY, C.; EGGER, M.; MCCLURE, M.; TAYLOR-ROBINSON, D. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* Heat-Shock Protein 60 kDa and Detection of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* Are Associated Independently With Chronic Nongonococcal Urethritis. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 30, n. 2, p. 129-133, 2003.
18. JAWETZ, E.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. Microbiologia Médica, 20ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 222-224.
19. KANAKAS, N.; MANTZAVINOS, T.; BOUFIDOU, F.; KOUMENTAKOU, I.; CREATSAS, G. *Ureaplasma urealyticum* in semen: is there any effect on in vitro fertilization outcome? *American Society for Reproductive Medicine*, v. 71, n. 3, p. 523-526, 1999.
20. KNOX, C. L.; TIMMS, P. Comparison of PCR, Nested PCR, and Random Amplified Polymorphic DNA PCR for Detection and Typing of *Ureaplasma urealyticum* in Specimens from Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 10, p. 3032-3039, 1998.
21. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WASHINGTON, C. W. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido, 5ª ed, Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 868-876.
22. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WASHINGTON, C. W. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1992. p. 675-698.
23. LEGG, J. M.; TITUS, T. T.; CHAMBERS, I.; WILKINSON, R.; KOENER, R. J.; GOULD, F. K. Hematoma infection with *Mycoplasma hominis* following transplant nephrectomy. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 6, n. 11, p. 619-627, 2000.
24. LEVY, R.; LAYANI-MILON, M. P.; GISCARD D'ESTAING, S.; NAJIOULLAH, F.; LORNAGE, J.; AYMARD, M.; LINA, B. Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* infection in semen from asymptomatic male partners of infertile couples prior to in vitro fertilization. *International Journal of Andrology*, n.22, p. 113-118, 1999.
25. MARTINELLI, F.; GARRAFA, E.; TURANO, A.; CARUSO, A. Increased Frequency of Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in AIDS Patients without Urethral Symptoms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 2042-2044, 1999.
26. MAZA, L. M.; PEZZLO, M. T.; BARON, E. Atlas de Diagnóstico em Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 1999.
27. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica, 3ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 289-292.
28. NOVAK, D. O. F. *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* como agentes etiológicos de doenças do trato genitourinário humano. 2000. 71 p. Monografia (Especialização em Microbiologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.
29. PILONETTO, M.; PILONETTO, D. V. Manual de procedimentos laboratoriais em Microbiologia - POPs em Microbiologia. Curitiba: Microscience, p. 18/1 – 18/4, 1998.
30. POTTS, J. M.; WARD, M.; RACKLEY, R. R. Association of chronic urinary symptoms in women and *Ureaplasma urealyticum*. *Urology*, v. 55, p. 486-489, 2000.
31. POVLSEN, K.; JENSEN, J. S.; LIND, I. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR and Biovar Determination by Liquid Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 11, p. 3211-3216, 1998.
32. SHERRIS, J. C. Medical Microbiology. ed. 3, Stamford: Appleton & Lange, 1994. p. 373-376.
33. SILVA, J. D.; SOUZA FILHO, S. D.; LIMA, A. P. S. Laudo Fotomicrográfico da Flora Microbiana do Trato Cérvico-Vaginal. *Revista NewsLab*, n. 42, p. 133-146, 2000.
34. TIMENETSKY, J. Micoplasmas e Pesquisa Biomédica. *Revista Laes & Haes*, n. 122, p. 92-102, 2000.
35. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, 6ª ed, 1ª reimpressão, São Paulo: Artmed, p.700-701, 2000.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra Cristina Montagner
Rua Vicente Shaeffer, 35/301
CEP. 88350-260 Brusque - SC
E-mail: crismontag@ibest.com.br

Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais*

Beta globin haplotypes in sickle cell anemia in patients from Rio de Janeiro: Clinical and laboratory aspects

Marcos K. Fleury

RESUMO - Foram estudados 74 pacientes com anemia falciforme matriculados no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO. Os parâmetros hematológicos foram determinados usando-se contador eletrônico e os haplótipos estabelecidos através de PCR seguidos de digestão com enzimas de restrição. Os genótipos encontrados foram 47 (63,6%) Benin / CAR, 16 (21,6%) CAR / CAR, 1 (1,3%) Benin / Senegal, 1 (1,3%) CAR / Senegal e 9 (12,2%) Benin / Benin. Os níveis de Hb F mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os haplótipos. Os genótipos Ben / CAR e Ben / Ben apresentam valores mais elevados de Hb F em relação ao grupo CAR / CAR, $p = 0,0051$ e $p = 0,0173$ respectivamente. A associação dos dados sobre a frequência dos haplótipos com registros históricos permite uma série de considerações de interesse sobre a origem e as migrações internas dos escravos no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE - Anemia falciforme, Haplótipos, Hemoglobina fetal.

SUMMARY - We studied 74 sickle cell anemia patients from Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO. The hematological parameters were carried out by electronic counter and the haplotypes were determined by PCR followed by endonuclease digestion. The genotypes were characterized as 47 (63,6%) Benin / CAR, 16 (21,6%) CAR / CAR, 1 (1,3%) Benin / Senegal, 1 (1,3%) CAR / Senegal and 9 (12,2%) Benin / Benin. The Hb F levels were significantly different among the haplotypes. The Ben / CAR and Ben / Ben genotypes showed higher Hb F values than the CAR / CAR group, $p = 0,0051$ and $p = 0,0173$ respectively. The β^s haplotypes and the historical data allow some important considerations about the slave traffic routs and internal migrations in Brazil.

KEYWORDS - Sickle cell anemia, Haplotypes, Fetal hemoglobin.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina S (Hb S) é o resultado de uma mutação AGAG $\leftarrow$ GTG, que corresponde ao sexto códon do gene da globina beta resultando numa substituição ácido glutâmico $\leftarrow$ valina na sexta posição da cadeia da globina beta.¹ As doenças falciformes são caracterizadas como aquelas nas quais a falcização produz significantes manifestações clínicas. Entre estas figuram as hemoglobinopatias SC e SD, as interações entre a Hb S e as talassemias e a anemia falciforme, sendo esta última designação reservada ao estado homozigoto para o gene S.^{2,3}

Entre as hemoglobinopatias, as doenças falciformes são as mais frequentes patologias chegando a atingir 1 em cada 500 indivíduos da raça negra.^{4,5}

A frequência do gene S na África está distribuída entre três regiões geográficas principais: África Ocidental (freq. 0,12 a 0,14); a região entre o Congo e o Zaire (freq. 0,12 a 0,14); e o Senegal, (freq. 0,08 a 0,10).^{6,7}

No Brasil as frequências do gene S variam enormemente conforme a influência africana na região. Em 1995, num dos maiores trabalhos de triagem de hemoglobinopatias já realizados no Brasil, 67.667 indivíduos de 48 cidades brasileiras foram estudados, mostrando uma frequência de 2,2% de portadores "AS".⁸

No Rio de Janeiro, num estudo realizado em 3345 indivíduos atendidos em hospitais públicos e postos de saúde municipais, foi observada uma frequência de 2,86% de heterozigotos para o gene S.⁹

As manifestações clínicas da anemia falciforme variam,

desde a morte na infância até uma total ausência de sintomas com qualidade de vida praticamente normal^{10,11}. Estas manifestações estão diretamente relacionadas com a inibição da polimerização intracelular da hemoglobina S, com a diminuição à intensidade da hemólise e com a oclusão da microcirculação.^{12,13,14}

A presença associada de alfa-talassemia, os níveis de hemoglobina fetal e os haplótipos do "cluster" do gene da globina beta têm sido considerados, freqüentemente, os fatores determinantes da variabilidade da anemia falciforme.^{15,16,17,18,19} Os haplótipos do tipo Senegal e Saudita estão comumente associados à níveis mais altos de hemoglobina fetal (acima de 15%) e a um curso clínico mais brando. No haplótipo do tipo Benin, os níveis de hemoglobina fetal são intermédios (de 5 a 15%) e os benefícios quanto ao curso clínico são menos marcantes. O haplótipo do tipo CAR, por sua vez, apresenta níveis mais baixos de hemoglobina fetal (abaixo de 5%) e o curso clínico mais grave.^{11,20}

Os haplótipos beta-S apresentam origens étnica e geográfica diferentes: O tipo CAR (República Centro Africana) no centro-sul e leste africano; o tipo Benin (BEN) originado no meio-oeste africano; o tipo Senegal (SEN) característico da África atlântica; o tipo Saudita ou Indu-árabe presente na península arábica e na Índia e o tipo Camarões encontrado nos limites geográficos deste país e numa pequena parte da costa oeste africana.¹

Até o advento da Lei Eusébio de Queiroz, promulgada em 4 de setembro de 1850, homens, mulheres e crianças das mais diferentes regiões do continente africano chegavam às costas do Brasil na condição de escravos. Essa imigração

Recebido em 27/09/2006

Aprovado em 27/12/2006

*Trabalho realizado no Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO e Faculdade de Farmácia da UFRJ.

Apoio financeiro da Fundação Universitária José Bonifácio.
Professor Adjunto de Hematologia. Faculdade de Farmácia da UFRJ.

forçada de elementos da raça negra, com línguas, costumes e religiões diversas, transformou o Brasil num imenso continente negro fora da África, influenciando, com sua cultura, a formação genética e cultural de nosso povo.²¹ O tráfico, desta forma, poderia ter resultado numa mistura de usos e costumes completamente estranhos uns dos outros. Ao contrário, o jogo das trocas comerciais estabeleceu relações precisas entre clientes e fornecedores dos dois lados do Atlântico e, assim sendo, os reagrupamentos de negros de certas "nações" africanas foram realizados insensivelmente em algumas regiões do Novo Mundo.²¹ Os negros oriundos de golfo de Benin foram na maior parte encaminhados para a Bahia, enquanto que os escravos bantos, do Congo e Angola, eram mais frequentes no resto do Brasil.²² Em resumo, pode-se concluir que o Brasil recebeu, principalmente, elementos pertencentes às culturas Sudanesas e Bantos. Os sudaneses, portadores de cultura mais elevada e procedentes da Costa da Guiné, espalharam-se pelo recôncavo da Bahia e vizinhanças. Já os Bantos, de cultura mais rudimentar e oriundos do Congo (Zaire), de Angola e de Moçambique, difundiram-se pelo Maranhão, Zona da Mata Nordestina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo.²³

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 74 pacientes com diagnóstico de anemia falciforme, matriculados no Instituto Estadual de Hematologia "Arthur de Siqueira Cavalcanti" – HEMORIO, com idades de 2 a 51 anos com uma média de 18,4 anos.

Em relação à naturalidade dos indivíduos, encontramos 67 (90,5%) do Rio de Janeiro, 2 (2,7%) da Bahia, 1 (1,4%) do Maranhão, 1 (1,4%) de Minas Gerais, 2 (2,7%) da Paraíba e 1 (1,4%) do Piauí.

Os parâmetros hematológicos foram determinados usando-se equipamento automatizado Coulter Counter modelo T-890.

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos colhidos do sangue periférico.²⁴

Os haplótipos foram determinados a partir de 5 sítios polimórficos localizados no "cluster" do gene da globina beta (5'Gama G, Gama G, Gama A, Pseudo-beta, 3' Beta), que foram amplificados e o polimorfismo identificado através de digestão com endonucleases de restrição.¹¹

As análises estatísticas foram realizadas através do programa EPI-Info (Versão 6,04b). O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$ para todas as análises.

Visando o estudo dos resultados laboratoriais relacionados com a idade e, considerando a influência dos níveis de hemoglobina fetal, subdividimos a amostra em dois grupos: Crianças - idades de 2 a 13 anos e Adultos - idades de 14 a 51 anos. O Grupo de Crianças é constituído de 32 indivíduos com média de idade de 8,5 anos e o Grupo de Adultos é formado por 42 indivíduos com média de 26,0 anos.

Os pacientes foram agrupados segundo seus genótipos e as comparações estatísticas dos parâmetros hematológicos foram realizadas entre os grupos formados^{10,11,25}.

RESULTADOS

A observação dos parâmetros hematológicos através das médias e dos desvios padrão revela uma grande variação dos valores encontrados, demonstrando, desta forma, a grande variabilidade clínico-laboratorial da anemia falciforme (Tabela 1). O grupo de pacientes, ($n = 74$), apresentou média ($\pm$ desvio padrão) de hemácias $2,61 (\pm 0,49) \times 10^6/\text{mm}^3$, hemoglobina $7,93 (\pm 1,26) \text{ g/dl}$, hematócrito $23,38 (\pm 3,54) \%$, VGM $90,51 (\pm 8,73) \text{ fl}$, HGM $30,53 (\pm 3,69) \text{ pg}$, CHGM $33,74 (\pm 1,74) \%$, reticulócitos $11,80 (\pm 6,64) \%$ e hemoglobi-

na fetal $6,66 (\pm 4,61) \%$. Sobre a hemoglobina fetal, observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre os sexos ($p = 0,0275$). Os pacientes do grupo masculino apresentaram média de 4,92% enquanto o grupo feminino 6,40%.

A amplificação dos cinco sítios polimórficos do cluster do gene da globina beta realizada em cada um dos pacientes estudados permitiu a determinação dos haplótipos dos 74 indivíduos.²⁵

Os genótipos encontrados foram: 47 indivíduos Benin / CAR (63,6%), 1 Benin / Senegal-Saudita (1,3%), 1 CAR / Senegal-Saudita (1,3%), 16 CAR / CAR (21,6%) e 9 Benin / Benin (12,2%). Desta forma, temos 148 cromossomos analisados; 80 cromossomos CAR (54,0%), 66 cromossomos Benin (44,6%) e 2 cromossomos Senegal/Saudita (1,4%) (Tabela 2).

As médias e os desvios padrão de cada parâmetro para cada um dos grupos de indivíduos segundo seus haplótipos estão apresentadas na Tabela 3.

As comparações em relação aos grupos Ben / Sen e CAR / Sen não foram incluídos neste estudo por terem sido estes genótipos observados uma única vez.

A análise comparativa dos parâmetros hematológicos entre os indivíduos com haplótipos Ben/CAR e CAR/CAR revelou resultados estatisticamente significativos somente em relação à hemoglobina fetal ($p = 0,0051$), onde o grupo Ben/CAR apresentou média superior. O mesmo ocorrendo na comparação entre os grupos Ben/Ben e CAR/CAR onde a hemoglobina fetal mostrou-se mais elevada no grupo Ben/Ben ($p = 0,0173$).

No estudo dos parâmetros hematológicos entre os grupos com haplótipos Ben/Ben e Ben/CAR, não foram encontradas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros. As médias, os desvios padrão e o valor de "p" foram determinadas para cada um dos parâmetros hematológicos em cada grupo de pacientes, segundo seu genótipo (Tabela 4).

Tabela I
Parâmetros hematológicos, médias, desvios padrão e valor de "p" apresentados nos grupos de adultos e crianças com anemia falciforme ($n = 74$).

	Adultos (N = 42)	Crianças (N = 32)	p
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$2,63 \pm 0,55$	$2,60 \pm 0,41$	0,8699
Hemoglobina (g/dl)	$8,02 \pm 1,44$	$7,80 \pm 0,99$	0,5738
Hematócrito (%)	$23,82 \pm 3,98$	$22,80 \pm 2,80$	0,3308
VGM (fl)	$91,34 \pm 9,29$	$88,94 \pm 7,48$	0,3762
HGM (pg)	$30,49 \pm 3,59$	$30,34 \pm 3,69$	0,9210
CHGM (%)	$33,54 \pm 1,69$	$33,94 \pm 1,78$	0,1549
Reticulócitos (%)	$11,19 \pm 6,31$	$12,56 \pm 7,05$	0,4276
Hemoglobina Fetal (%)	$5,42 \pm 3,79$	$8,29 \pm 5,12$	0,0464

Tabela II
Distribuição dos haplótipos e cromossomos na população estudada ($n = 74$).

	Nº de Indivíduos		Nº de Cromossomos		
	(%)	Benin	CAR	Senegal	
Benin / CAR	47 (63,6%)	47	47	-	
Benin / Senegal	1 (1,3%)	1	-	1	
Benin / Benin	9 (12,2%)	18	-	-	
CAR / Senegal	1 (1,3%)	-	1	1	
CAR / CAR	16 (21,6%)	-	32	-	
Total	74 (100%)	66 (44,6%)	80 (54,0%)	2 (1,4%)	

Tabela III
Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos para cada um dos grupos de pacientes estabelecidos.

	HAPLÓTIPOS		
	Benin/CAR (n= 47)	Benin/Benin (n=9)	CAR/CAR (n=16)
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2,54 $\pm$ 0,450	2,82 $\pm$ 0,644	2,65 $\pm$ 0,518
Hemoglobina (g/dl)	7,81 $\pm$ 1,359	8,19 $\pm$ 0,790	7,94 $\pm$ 1,212
Hematócrito (%)	23,01 $\pm$ 3,718	24,39 $\pm$ 2,633	23,49 $\pm$ 3,497
VGM (fl)	91,13 $\pm$ 7,812	89,00 $\pm$ 14,448	89,25 $\pm$ 8,136
HGM (pg)	30,77 $\pm$ 3,484	29,89 $\pm$ 5,487	30,00 $\pm$ 3,425
CHGM (%)	33,81 $\pm$ 1,861	33,44 $\pm$ 1,944	33,69 $\pm$ 1,401
Reticulócitos (%)	12,23 $\pm$ 5,947	11,03 $\pm$ 5,262	12,81 $\pm$ 9,699
Hemoglobina Fetal (%)	6,92 $\pm$ 4,136	7,42 $\pm$ 4,362	3,96 $\pm$ 3,417

Tabela IV
Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos estabelecidos para cada um dos haplótipos observados.

Parâmetros	HAPLÓTIPOS				
	Benin / CAR (n=47)	Benin / Benin (n=9)	Benin / Sen (n=1)	CAR / CAR (n=16)	CAR / Sen (n=1)
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2,54 (0,450)	2,82 (0,644)	-	2,65 (0,518)	-
Hemoglobina (g/dl)	7,81 (1,359)	8,19 (0,790)	-	7,94 (1,212)	-
Hematócrito (%)	23,01 (3,718)	24,39 (2,633)	-	23,49 (3,497)	-
VGM (fl)	91,13 (7,812)	89,00 (14,448)	-	89,25 (8,136)	-
HGM (pg)	30,77 (3,484)	29,89 (5,487)	-	30,00 (3,425)	-
CHGM (%)	33,81 (1,861)	33,44 (1,944)	-	33,69 (1,401)	-
Reticulócitos (%)	12,23 (5,947)	11,03 (5,262)	-	12,81 (9,699)	-
Hemoglobina Fetal (%)	6,92 (4,136)	7,42 (4,362)	-	3,96 (3,417)	-

População	Nº de Cromossomos	CAR No (%)	Benin No (%)	Senegal No (%)
Belém (PA)	60	40 (66,7)	18 (30,0)	2 (3,3)
Salvador (BA)	188	95 (50,5)	92 (49,0)	1 (0,5)
Ribeirão Preto (SP)	67	49 (73,0)	17 (25,5)	1 (1,5)
Campinas/ São Paulo (SP)	142	92 (64,7)	50 (35,2)	0 (0,0)
Porto Alegre (RS)	49	39 (79,6)	9 (18,4)	1 (2,0)
Rio de Janeiro (RJ)	148	80 (54,0)	66 (44,6)	2 (1,4)
Fortaleza (CE)	34	14 (41,2)	19 (55,9)	1 (2,9)
Total	688	409 (59,4)	271 (39,4)	8 (1,2)

Quadro 1 – Frequência de distribuição (%) dos haplótipos em algumas regiões brasileiras.^{31, 32, 1}

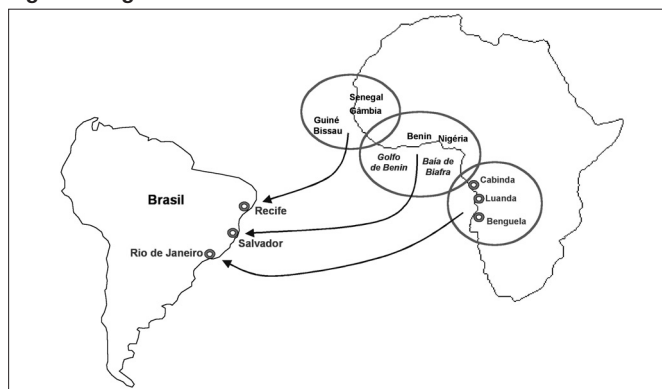


Figura 1 – Principais portos africanos fornecedores de escravos para as cidades brasileiras

DISCUSSÃO

O curso clínico da anemia falciforme é influenciado por uma série de fatores genéticos, adquiridos e por diferenças ambientais. Entre as condições que podem modificar o curso da doença estão a alfa talassemia e os polimorfismos encontrados na região do gene beta, (haplótipos). Entretanto, as tentativas de associação entre os achados clínico-laboratoriais e os haplótipos têm sido, na maioria dos casos, frustradas^{7,26,27,28,29,30}.

Os valores de hemoglobina fetal observados para os grupos masculino e feminino mostram uma diferença significativa. Esta diferença, embora não completamente explicada, seria a responsável por uma maior longevidade e uma sintomatologia mais branda em pacientes do sexo feminino¹. O grupo de crianças apresenta média de hemoglobina fetal significativamente maior que o grupo dos adultos. Estes resultados podem ser explicados baseados na mudança gradual do ritmo de síntese entre as cadeias gama e cadeias beta que ocorre no período peri-natal. Os recém-nascidos apresentam níveis elevados de hemoglobina fetal, que decrescem ao longo do tempo. Os pacientes falcêmicos só apresentarão os sintomas típicos da doença quando os níveis de hemoglobina S atingirem cerca de 75%, ou seja, após o decréscimo dos níveis de Hb F.

Em relação à frequência dos haplótipos observada na amostra estudada, encontramos 80 (54,0%) cromossomos CAR, 66 (44,6%) cromossomos Benin e 2 (1,4%) cromossomos Senegal. A literatura nacional não é rica em dados sobre os haplótipos do cluster beta, entretanto, segundo os dados disponíveis, nossa amostra apresenta-se de forma semelhante aos dados brasileiros que mostram uma predominância dos cromossomos tipo CAR entre os pacientes estudados.^{31,32}

Os valores de hemoglobina fetal apresentaram-se superiores nos grupos Ben/CAR e Ben/Ben quando comparamos cada um deles com o grupo CAR/CAR. A comparação entre os genótipos Ben/Ben x Ben/CAR, não apresentou diferenças significativas em nenhum dos parâmetros hematológicos, nem mesmo em relação à hemoglobina fetal.

Esses resultados, em parte, estão de acordo com a literatura que relata maiores níveis de hemoglobina fetal associados ao haplótipo Senegal seguido do haplótipo Benin e, por último, ao haplótipo CAR.^{33,34} Os resultados observados entre os genótipos CAR/CAR x Ben/CAR e Ben/Ben x CAR/CAR em relação à hemoglobina fetal, ratificam a descrição do haplótipo Benin como mais benigno quando comparado ao haplótipo CAR, principalmente por causa da maior concentração desta hemoglobina.

Embora os pacientes portadores do haplótipo Senegal não tenham sido incluídos nestas análises, é interessante notar os níveis de hemoglobina fetal observados. O paciente CAR / Sen apresenta valor de hemoglobina fetal de 21,6%, e o paciente Ben / Sen 6,8%. O primeiro é uma criança de 3 anos, onde esperaríamos níveis elevados de hemoglobina fetal porém não neste nível. O segundo, um rapaz de 17 anos, apresenta valor de Hb F superior ao da média encontrada na população estudada. É importante observar que estes níveis de hemoglobina fetal elevados são concordantes com o relatado pela literatura.^{10,11,33,14,18,19}

Os níveis de hemoglobina fetal são descritos na literatura como haplótipo dependente e diretamente correlacionados ao curso clínico da doença^{10,14,35}. Em nosso grupo de pacientes os valores observados para hemoglobina fetal apresentaram variações importantes entre os haplótipos, mostrando que os níveis desta hemoglobina seriam influenciados pelos haplótipos.

Os dados encontrados sobre a frequência dos haplótipos do "cluster" da globina beta no Brasil associados aos fatos históricos e às características do período escravocrata brasileiro, permitem algumas considerações.

Com base nos registros históricos, sabemos que os primeiros escravos africanos, chegados à época das capitânias hereditárias, seriam oriundos do Noroeste da África, isto é, da região do haplótipo Senegal. Estes primeiros escravos chegaram ao Brasil através dos portos de São Luís e, principalmente, do Recife.³⁶

No entanto esta rota do tráfico não durou muito tempo, sendo logo substituída pela rota que partia da Baía de Benin em direção a capital Salvador, na Bahia. Durante muitos anos esta foi a principal rota do tráfico negreiro para o Brasil, principalmente para suprir de mão de obra a crescente lavoura açucareira do nordeste.

Com descoberta de ouro nas Minas Gerais tornou-se difícil para a Coroa portuguesa o controle da mineração a partir da capital Salvador. Este fato talvez tenha sido um dos principais motivos da mudança da capital da Colônia para o Rio de Janeiro, em 1763. A partir da mudança da capital intensifica-se o tráfico entre a região de Angola (Luanda, Benguela e Cabinda) e o Rio de Janeiro (Figura 1).²² A necessidade premente de mão de obra na região mineradora foi um dos principais fatores da intensificação desta rota, pois a maior proximidade geográfica entre as Minas gerais e o Rio de Janeiro facilitava o deslocamento de escravos para a região das minas. Desta forma, o Rio de Janeiro passou a receber escravos de uma região africana distinta da que abastecia Salvador. A região de Angola apresenta maior frequência do haplótipo CAR²².

Com a prosperidade da mineração do ouro e a proibição inglesa do tráfico de escravos ao norte da linha do Equador, cresce o papel do Rio de Janeiro não só como principal porto de comércio brasileiro como também centro distribuidor de escravos para o resto do país.

Os documentos pesquisados caracterizam muito bem esta diferenciação entre as rotas do tráfico negreiro. Partindo da região da Baía de Benin o destino brasileiro era o porto de Salvador, enquanto o Rio de Janeiro recebia escravos da região de Angola (Figura 1).

A partir destes fatos, é possível especular que inicialmente a maioria dos escravos chegados ao Brasil seriam da região do haplótipo Benin e que a Bahia e as regiões vizinhas apresentariam este haplótipo em maior frequência. Já em relação ao Rio de Janeiro, a frequência maior seria do haplótipo CAR. O haplótipo Senegal deveria ser encontrado na região nordeste a partir de Pernambuco até o Maranhão. Estas previsões, no entanto, não levam em conta a alta taxa de mortalidade dos escravos no início da colonização e as migrações internas. Todavia, de modo geral, este quadro representaria de maneira satisfatória uma previsão da distribuição dos haplótipos no Brasil.

Os dados disponíveis relacionados à frequência dos haplótipos no Brasil mostram uma predominância do haplótipo CAR em todas as regiões estudadas (Quadro 1). Nota-se que a região de São Paulo, assim como Porto Alegre, apresentam frequências bastante elevadas deste haplótipo. Estas observações estão de acordo com os relatos históricos que mostram o Rio de Janeiro como centro distribuidor de escravos para estes estados^{31,32,37}.

A região de Salvador também apresenta predomínio do haplótipo CAR embora esta região tenha sido abastecida intensamente por escravos oriundos da região da Baía de Benin. Talvez a alta mortalidade, causada pelo péssimo tratamento dispensado aos escravos no início da colonização, e

as migrações internas ocorridas em direção a Minas Gerais e Rio de Janeiro, possam explicar as frequências encontradas nesta área. Também não devemos deixar de considerar que, talvez, o número de indivíduos analisados ainda não seja o suficiente para cálculos mais precisos. De qualquer forma, a predominância do haplótipo CAR em Salvador, não corresponde ao esperado.

Os resultados observados no Pará mostram a maior frequência do haplótipo Senegal encontrada no país (3,3%), embora o haplótipo CAR seja o mais freqüente naquela população. A frequência do haplótipo Senegal nesta região mostra-se concordante com a história e com as expectativas desta discussão.³¹

Nossos dados estão de acordo com o observado no resto do país mostrando um predomínio do haplótipo CAR (54,0%), seguido do haplótipo Benin (44,6%) e Senegal (1,4%). Como descrito anteriormente, considerando-se a origem dos escravos chegados ao Rio de Janeiro a predominância do haplótipo CAR nesta região seria, realmente, o mais provável.

Um fato interessante refere-se ao haplótipo Senegal que foi observado somente em dois pacientes. Um deles (Ben/Sen) é natural do Maranhão e o outro (CAR/Sen), embora seja natural do Rio de Janeiro tem os pais maranhenses. Esta observação, embora em apenas dois casos, é no mínimo curiosa mostrando a presença do haplótipo Senegal naquela região e os elevados níveis de Hb fetal associados, o que está de acordo com a história do tráfico.

Analizando as referências bibliográficas relativas ao período colonial, nota-se uma grande escassez de dados sobre a escravidão no Brasil principalmente em relação ao século XIX. Uma grande parte dos documentos sobre a questão dos escravos e do tráfico foi destruída em 1891, após a abolição da escravatura. Este ato "aboliconista" atribuído a Rui Barbosa, então Ministro das Finanças, é controverso e discutível.

Desta forma, acreditamos que a determinação dos haplótipos do "cluster" da globina beta seja de grande importância não só para o acompanhamento e prognóstico dos pacientes de anemia falciforme, como também como ferramenta para estudos antropológicos que contribuam no esclarecimento da origem dos africanos que tanto contribuíram na formação etnológica, econômica, cultural e social do Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. Raven Press: New York, 1994.
2. Williams: Hematology, McGraw-Hill, Inc. New York. fifth Edition, 1995.
3. Wintrobe MM. Clinical Hematology, Williams & Wilkins, Baltimore. Tenth edition, (1), 1998.
4. WHO: Community Control of Hereditary anaemias: Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 1983; 61 (1): 63.
5. WHO: Update of the progress of haemoglobinopathies control. Report of 3rd and 4th Annual Meeting of the WHO Working Group of the Community Control of Hereditary Anemias, Bangkok. 1985.
6. Kan YW, Dozy AM: Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. Science 1980; 209: 388-391.
7. Serjeant GR: Geography and the clinical picture of sickle cell disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1990; 565: 109-119.
8. Alvarez FF, Naoum PC, Moreira HW, Cruz R, Manzato AJ, Domingos CR. Age and racial geographic distribution of S hemoglobin in Brazil. Sangre (Barc) 1995; 40 (2): 97-102.
9. Fleury MK, Lima JCS. Resultados de um programa preventivo para hemoglobinopatias na cidade do Rio de Janeiro. Rev. Bras. Pat. Clin. 1989; 25(2): 42-46.
10. Powars DR. Natural history of sickle cell disease - The first ten years. Semin. Hematol. 1975; 12: 267-285.

11. Powars D, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Sem. Hematol.* 1990; 27: 360-376.
12. Higgs DR, Pressley L, Serjeant GR, Clegg JB, Weatherall DJ. The genetics and molecular basis of alpha thalassaemia in association with Hb S in jamaican negroes. *Br. J. Haemat.* 1981; 47: 43-56.
13. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Mayes RJ, Grandison Y, Lowrie Y, Mason KP, Serjeant BE, Serjeant GR. The interaction of alpha-thalassaemia and homozygous sickle cell disease. *New Engl. J. Med.* 1982; 1306: 1441-1446.
14. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *New Engl. J. Med.* 1999; 340 (13): 1021-1030.
15. Jackson JF, Odom J L; Bell W N. Amelioration of sickle cell disease by persistent fetal hemoglobin. *JAMA.* 1961; 177: 867-871.
16. Schroeder WA. The human α - chain variants. A review. *Hemoglobin* 1977; 6 (1): 513-515.
17. Nogushi CT, Rodgers GP, Serjeant GR, Schechter AW. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 1988; 313: 96.
18. Kéclard L, Ollendorf V, Berchel C, Loret H, Méréault G. Beta S haplotypes, alpha globin gene status, and hematological data of sickle cell disease patients in Guadeloupe (FWI). *Hemoglobin* 1996; 20 (1), 75-78.
19. Steinberg MH. The Interaction of alpha-thalassemia with Hemoglobinopathies. *Hem. Onc. Clin. North America* 1991; 5 (3): 453-473.
20. Hirokawa K, Ohene-Frempong K, Horiuchi K: Determination of HbF level, maturation and morphology of individual sickle cell via image cytometry. *Blood.* 86 (10): 139a, 1995.
21. Silva LD. Estudos sobre a escravidão negra.. Ed. Massangana - Fundação Joaquim Nabuco, 1988.
22. Verger P. Fluxo e refluxo. Do tráfico de escravos entre o golfo de Benin e a Bahia de Todos os Santos dos séculos XVII a XIX. Ed. Corrupio, 1989.
23. Koster H. Viagens ao Nordeste do Brasil. Recife, 1978.
24. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.* 1988; 16: 1215.
25. Fleury MK. Determinação dos Haplótipos do Grupamento do Gene da Globina Beta em Pacientes com Anemia Falciforme no Rio de Janeiro 2000. (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas) Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
26. Billet HH, Kim K, Fabry ME, Nagel LE. The percentage of dense red cells does not predict incidence of sickle cell painful crisis. *Blood* 1986; 68: 301-303.
27. Serjeant GR. The determinants of irreversibly sickled cells in homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol.* 1978; 40: 431.
28. Serjeant GR. Red cell size and the clinical and haematological features of homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol.* 1981; 48: 445.
29. Steinberg MH, Hebbel RP. Clinical diversity of sickle cell anemia: genetic cellular modulation of disease severity. *Am J Hematol.* 1983; 14: 405-416.
30. Davies SC; Oni L. Fortnightly review: Management of patients with sickle cell disease. *Brit. Med. J.* 1997; 315 (13) 656-660.
31. Pante-de-Sousa G, Ribeiro RCM, Santos EJM, Zago MA, Guerreiro JF. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. *Genet Mol Biol.* 1998; 21(4): 427-430.
32. Gonçalves MS et al. BS-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz. J Med. Biol. Res.* 2003; 36: 1283-1288.
33. Powars DR: Beta-S-Gene-Cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematological features. *Clin. of North Amer.* 1991; 5: 475-493.
34. Steinberg MH. Modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Hemoglobin* 1996; 20 (1), 1-9.
35. Gilman JG: Activator protein binding to -158/-161 region of α -globin gene promoter. *Blood* 1995; 86 (10): 5.
36. Curtin PD. The Atlantic slave trade. A census. Milwaukee: University of Wisconsin Press, 1969
37. Neto GCG, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira MLC, Farias DAB. Análise dos haplótipos do gene da bs-globina no Ceará. *J. Brás. Patol. Méd. Lab.* 2005; 41 (5), 315-21

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Faculdade de Farmácia - UFRJ
Ilha do Fundão
CCS Bloco A - sala 29 - 2º andar
CEP. 21941-590
E-mail: mkfleury@ufrj.br

34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas 7º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

10 a 14 de junho de 2007

Local:
Centro de Convenções - EXPOMINAS
Belo Horizonte - MG



Promoção e Realização
SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Título de Especialista em Análises Clínicas

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

Os candidatos para se inscreverem no Concurso do TEAC, deverão solicitar regulamento e ficha de inscrição na SBAC-Nacional ou Regionais/Delegacias, por fax, telefone, e-mail, carta ou pessoalmente.

Condições para inscrição no Concurso do TEAC:

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

As Disciplinas:

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

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

As Provas:

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

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

Avaliação da Prova de Títulos a Outorga do TEAC.:

Os Candidatos aprovados terão que enviar no prazo máximo de 2 anos (de acordo com o Regulamento do TEAC), Currículo Vitae e cópia de documentação comprobatória de exercício profissional e atualização de conhecimentos.

Validade do TEAC:

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

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

Próximo Concurso do TEAC:

Informamos, que o 67º Concurso para Outorga do TEAC – Título de Especialista em Análises Clínicas, será realizado em 09/06/2007 de 08 às 12h (Prova Escrita/Slide) e 13:30 às 18h (Prova Oral), durante o 34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 7º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, em BELO HORIZONTE – MG.

A taxa de inscrição para o Concurso do TEAC e TECC é no valor R\$ 198,00 (cada). Para os inscritos no 34º CBAC e 7º CBCC, haverá desconto de 50% nas inscrições.

O prazo de recebimento das fichas de inscrição para o Concurso do TEAC será até o dia 26/05/2007, (data de postagem).

Lembramos que a ficha de inscrição e o pagamento da taxa para o Concurso do TEAC, deverão ser enviados para a SBAC-Nacional, Rua Vicente Licínio, 99 – Tijuca – 20270.902 – RIO DE JANEIRO – RJ.

**No caso de dúvida e esclarecimentos,
entre em contato conosco:**

**SBAC, através dos tel./fax (21) 2187-0800 e 2187-0805 ou
através do e-mail: teac@sbac.org.br**

**SBCC, através dos tel./fax (62) 3229-0468 e 3223-5661 ou
através do e-mail: sbacco@terra.com.br**

Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb)

Comparative study between two techniques of methemoglobin (MHb) determination

Thiago Magalhães Camargo¹, Maria Izalina Ferreira Alves², Sara de Jesus Oliveira³, Edson S. Shitara⁴ & Yoko Oshima-Franco⁵

RESUMO - A hemoglobina é a proteína responsável pelo transporte de oxigênio, função vital ao organismo. A oxidação de um átomo de ferro da hemoglobina resulta na formação de MHb, condição que pode ser de origem congênita ou adquirida. Metemoglobinemia é caracterizada quando uma concentração superior a 2% (Evelyn e Malloy, 1938; Hegesh *et al.*, 1970) ou a 3,8% (Naoum *et al.*, 2004) da hemoglobina encontra-se na forma oxidada. O objetivo desta pesquisa, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISO, foi verificar a correlação existente entre a técnica de Hegesh *et al.* (1970) com a recente proposta por Naoum *et al.* (2004), através do coeficiente de correlação (r) de Pearson. Os voluntários (50 estudantes da UNISO) que participaram da pesquisa após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eram hematimetricamente normais e não-fumantes. Obteve-se um coeficiente de correlação linear próximo a 1 ($r=0,93$), indicando correlação positiva entre os métodos e estatisticamente significativa pelo teste t-Student ($p<0,01$). Embora não se possa afirmar que exista diferença estatística entre as duas técnicas, dado que são medidas em escalas diferentes, conclui-se que a técnica de Naoum é vantajosa sobre a de Hegesh quanto à estabilidade, toxicidade de reagentes, riscos ao analista e custos.

PALAVRAS-CHAVE - metemoglobinemia, método analítico, oxidação da hemoglobina.

SUMMARY - The hemoglobin is a protein responsible by the transport of oxygen, vital function to the organism. Methemoglobin (MHb) occurs when the hemoglobin is oxidized to the ferric form, condition that could have genetic or acquired source. Methemoglobinemia is characterized when level higher to 2% (Evelyn e Malloy, 1938; Hegesh *et al.*, 1970) or to 3,8% (Naoum *et al.*, 2004) of hemoglobin is oxidized. The objective of this study, approved by Committee for Ethics in Clinical Research (UNISO) and after obtained the Informed Consent, was to verify the existent correlation between the Hegesh *et al.* (1970) with the recent proposed by Naoum *et al.* (2004) techniques, by using of Person's coefficient (r). The volunteers (50 students from UNISO) were with normal hematimetric values and were no-smokers. A coefficient of linear near to 1 was obtained ($r=0,93$), indicating a significant ($p<0,01$) and positive correlation between the techniques. Although the techniques could not be compared statistically, since the scale are not equals, we can conclude that the Naoum technique is advantageous on the Hegesh relative to the analytical stability, reagents toxicity, risks to analyst and costs.

KEYWORDS - analytical method, methemoglobinemia, oxidation of hemoglobin.

INTRODUÇÃO

O oxigênio (O_2) existente no ar é uma molécula diatômica. Exceto por alguns organismos unicelulares, todos os animais, plantas e bactérias necessitam de O_2 para uma eficiente produção de energia pela cadeia de transporte de elétrons dependentes de O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1998). A hemoglobina, proteína constituinte da hemácia, realiza duas funções biológicas principais: transporte de O_2 do pulmão para os tecidos periféricos e transporte de CO_2 dos tecidos periféricos ao pulmão, para posterior excreção (Rodwell, 1998). Ela é constituída por duas cadeias beta, em cujo centro se localiza o grupo heme contendo um íon Fe^{2+} (estado ferroso), onde liga o O_2 . Quando o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} (estado férrico), a hemoglobina torna-se incapaz de transportar o O_2 aos tecidos causando, então, hipóxia. Nesta condição, a hemoglobina passa a ser chamada de metemoglobina (MHb).

A MHb pode ser de origem congênita ou adquirida, sendo esta a causa mais freqüente e podendo ser provocada por medicamentos, alimentos e vários outros agentes químicos. As consequências decorrentes da MHb elevada podem ser várias, sendo a principal a cianose refratária à oxigenioterapia (Lepera, 2003).

Historicamente, a primeira técnica de determinação de MHb foi a de Evelyn e Malloy (1938), que foi posteriormente adaptada por Hegesh *et al.* (1970). Os valores de refe-

rência de cada determinação são obtidos de acordo com a técnica analítica empregada. Assim, os valores normais encontrados na literatura para a MHb variam de 1,5 a 2% em relação à Hb total. Nessas técnicas usualmente são empregadas sais de cianeto (cianeto de sódio e ferricianeto de potássio), tóxicos para todo tipo de vida animal, pois bloqueiam o transporte de oxigênio no metabolismo, pela extrema afinidade do cianeto com a enzima citocromo-oxidase, responsável pela respiração celular. Recentemente, uma nova técnica analítica foi proposta por Naoum *et al.* (2004) sem a utilização de substâncias de alta toxicidade, com parâmetros de normalidade de MHb entre 1,9 a 3,8%. Assim, este estudo teve como objetivo verificar a existência ou não de correlação entre as duas técnicas de dosagem (Hegesh *et al.*, 1970 e Naoum *et al.*, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISO, sob protocolo 003/04.

Sujeitos do estudo

Foram voluntários os estudantes ($n=50$) da UNISO que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aparentemente saudáveis, hematimetricamente normais e não-fumantes.

Recebido em 25/10/2006

Aprovado em 13/11/2006

*Universidade de Sorocaba – UNISO – Curso de Farmácia

Cidade Universitária, Rodovia Raposo Tavares km 92,5; Caixa Postal 578/587, CEP 18023-000.

Apoio Financeiro: Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PROBIC/UNISO)

¹Acadêmico do Curso de Farmácia e Bolsista de Iniciação Científica; ²Estatístico e Docente; ³Bióloga e Docente; ⁴Hematologista e Docente; ⁵Farmacêutica e Docente

Método analítico

Foram empregados para a dosagem de MHb o método espectrofotométrico pela técnica de Hegesh *et al.* (1970) e Naoum *et al.* (2004). As dosagens de MHb foram realizadas em duplicata e imediatamente após a coleta das amostras. Os reagentes e os fluxogramas dos procedimentos técnicos de ambos os autores são mostrados a seguir, no item 2.5 (Esquemas 1 e 2, respectivamente). O perfil hematológico e hemograma foram determinados no sistema automatizado Pentra 80 (ABX) e o VHS pelo método de Westergreen.

Amostra

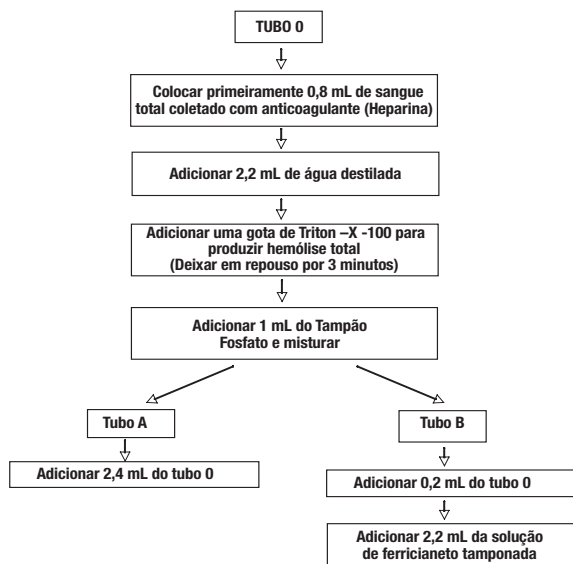
As amostras de sangue (5 mL para cada técnica empregada) foram coletadas diretamente para tubos comerciais de vácuo (Vacutainer®) com pressões negativas que contêm a concentração correta de anticoagulante (heparina e EDTA, respectivamente, para as técnicas acima citadas), minimizando as possíveis fontes de erro. Amostras colhidas com EDTA também foram utilizadas para as análises hematológicas.

Reagentes e fluxograma do procedimento técnico

1. Esquema 1 (Hegesh *et al.*, 1970)

Reagentes:

- Solução de $K_3Fe(CN)_6$ (ferricianeto de potássio) 5% (p/v)
- Conservar em frasco escuro e preparar mensalmente.
- Tampão Fosfato pH 7,2
Solução A : Pesar 68g de KH_2PO_4 e completar para 1 litro com água destilada.
Concentração desta solução: 0,5M
Solução B: Pesar 20g de NaOH e completar para 1 litro com água destilada.
Concentração desta solução: 0,5M
Misturar 100mL da solução A com 70mL da solução B. O pH deve ser 7,2.
- Solução de Ferricianeto tamponada
Colocar 0,2 mL da solução de ferricianeto 5% com 2,5 mL do tampão fosfato. Completar para 110 mL com água destilada. Preparar diariamente.
- Solução de cianeto de sódio a 5% (p/v)
Se no lugar de NaCN for usado KCN, pesar 13,3 g para 100 mL.
- Solução de ácido acético 12% (v/v)
- Solução neutralizada de cianeto
Misturar 1 mL da solução do cianeto de sódio 5% com 0,9 mL da solução de ácido acético 12%. O tempo de validade desta solução é de 6 horas.



Ajustar o espectrofotômetro em 632 nm e acertar o zero contra o ar e fazer a leitura dos tubos A e B.

Adicionar em ambas as cubetas 80 µL da solução neutralizada de cianeto e fazer novamente a leitura de C (cubeta 1) e D (cubeta 2).

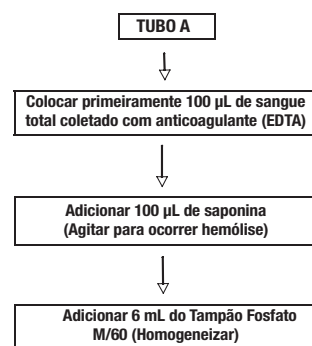
$$\bullet \text{Cálculo de MHb (\% Hb)} = \frac{A - C}{(B - D) \times 12}$$

- O valor normal de metemoglobina para adultos sadios é até 2% e o valor máximo tolerado é de 5%.

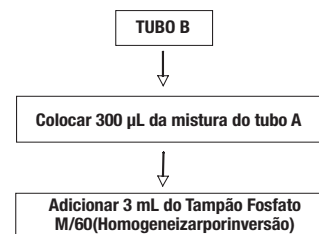
2. Esquema 2 (Naoum *et al.*, 2004)

Reagentes

- Solução estoque de Tampão Fosfato M/15:
 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ _____ 9 g
 KH_2PO_4 _____ 5,7 g
 H_2O q.s.p. _____ 1,0 litro
- Solução trabalho Tampão Fosfato M/60 diluir 250 mL da solução estoque para 1 litro (q.s.p.) de água destilada.
- Saponina 1%



Ajustar o espectrofotômetro em 630 nm e usar o Tampão Fosfato M/60 como branco, acertar o zero e fazer a leitura do tubo A.



Ajustar o espectrofotômetro em 540 nm e usar o Tampão Fosfato M/60 como branco e acertar o zero e fazer a leitura do tubo B.

$$\bullet \text{Cálculo da MHb (\% da Hb)} = \frac{D.O. \text{ 630 nm} \times 100}{D.O. \text{ 630nm} + (D.O. \text{ 540nm} \times 10)}$$

- Os valores normais de metemoglobina variam de 1,9 a 3,8%. Acima de 4% considera-se elevada.

Verificação de correlação entre as técnicas

As médias das leituras em absorbância foram obtidas e os valores de MHb calculados, conforme preconizados pelos autores das duas técnicas. Para verificar a reprodutibilidade e a sensibilidade entre as duas técnicas empregou-se o coeficiente de correlação de Pearson (r), e o teste t-Student para testar a significância estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, duas técnicas de dosagem de MHb foram comparadas, a de Hegesh *et al.* (1970) e a recente descrita por Naoum *et al.* (2004), conforme a Tabela 1, em amostras de sangue de voluntários (n=50), com valores hematimetricamente normais, como mostrado na Tabela 2.

Tabela I
Determinação de MHb (%) pelas técnicas de
Hegesh *et al.* (I) e Naoum *et al.* (II)

Voluntário	I	II	Voluntário	I	II
1	1,5	3,4	26	1,5	3,4
2	0,6	2,7	27	0,3	2,2
3	0,8	2,7	28	0,4	2,3
4	1,9	3,6	29	1,1	3,1
5	0,9	2,8	30	0,2	1,9
6	0,6	2,5	31	0,4	1,9
7	1	2,9	32	1,1	2,9
8	0,4	2,3	33	0,4	2,3
9	0,2	1,9	34	1,2	3,1
10	0,4	2,3	35	1,8	3,7
11	1,8	2,4	36	1,3	3,4
12	1,2	2,9	37	1,3	3,2
13	0,4	2,0	38	0,7	2,6
14	1	2,9	39	0,2	2,1
15	0,9	2,8	40	0,7	2,7
16	1	2,9	41	2	3,8
17	0,1	2,0	42	0,4	2,3
18	0,3	2,2	43	1,6	3,4
19	0,9	2,7	44	0,2	2,2
20	1,2	3,1	45	1,2	3,1
21	1	2,9	46	0,1	1,9
22	0,4	2,3	47	1,8	3,6
23	0,3	2,2	48	0,2	2,0
24	2	3,9	49	0,8	2,7
25	1,7	3,7	50	1,2	3,1

Tabela II
Valores hematimétricos dos voluntários

Análise realizada (valores de referência)	Média ± DP
Eritrócito (4 – 6 milhões / μ L)	5 ± 0,1
Hemoglobina (11,5 – 15,5 g/dL)	14,7 ± 0,3
Hematócrito (37 – 47%)	43,2% ± 0,7
VHS (1-20 mm)	8,6 ± 1,3
Leucócitos (4.000 – 10.000 / μ L)	7.800 ± 2
Neutrófilos (45 – 72%)	57% ± 1,4
Linfócitos (20 – 35%)	31% ± 1,2
Monócitos (2 – 8%)	8% ± 0,3
Eosinófilos (1 – 4%)	3% ± 0,4
Basófilos (0-1%)	1% ± 0,04
Plaquetas (150.000 – 400.000 / μ L)	265.000 ± 0,3

Os resultados foram analisados para se verificar a existência ou não de correlação entre ambas as técnicas. A Figura 1 mostra que as técnicas guardam uma relação significativa ($p < 0,01$) e positiva entre si, com $r = 0,93$, bem próximo de 1, o que garante a sua confiabilidade. Pode-se observar também que pode ser ajustada uma reta de regressão linear,

$$Y = 1,899 + 0,9406 X$$

onde Y são os valores obtidos pela técnica de Hegesh *et al.* (0 - 2%) e X os obtidos pela técnica de Naoum *et al.* (1,9 - 3,8%), ou seja, através dos valores obtidos pela primeira técnica pode-se estimar quanto seria obtido sobre o mesmo indivíduo pela segunda técnica.

As médias obtidas foram $0,89 \pm 0,57$ e $2,74 \pm 0,57$, pela técnica de Hegesh e Naoum, respectivamente, o que confirma que embora não comparáveis devido às diferentes escalas entre elas, ambas tiveram desvios padrões iguais, confirmando a igualdade quanto ao resultado.

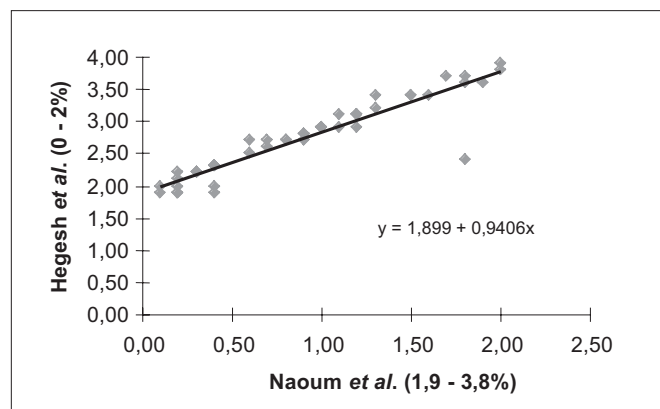


Figura 1 - Diagrama de dispersão e reta de regressão ajustada pela relação entre as técnicas.

Embora a avaliação da concentração de metemoglobina seja pouco solicitada aos laboratórios — uma das razões, provavelmente, esteja no desconhecimento de sua importância como marcador biológico em processos oxidativos? ela deveria fazer parte da prática médica, já que um dos subprodutos da formação da metemoglobina é o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), um radical livre nucleofílico (Gregus e Klaassen, 2001), com importância em inúmeros processos fisiopatológicos.

A metemoglobina é um parâmetro importante que pode denunciar uma situação incompatível com a vida, e cuja presença em níveis elevados na corrente sanguínea impede o transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos periféricos, causando hipóxia e cianose. Embora a MHb congênita seja importante, a adquirida assume grande relevância, uma vez que várias substâncias químicas são metemoglobinizantes, incluindo até mesmo alguns medicamentos (Lepera, 2003). Vale salientar que, culturalmente, o Brasil é um país cuja população se automedica e, além disso, as tentativas de suicídio e até mesmo os casos de intoxicações acidentais são frequentes.

Naoum *et al.* ao desenvolver a sua técnica tomou como referência a técnica de Evelyn e Malloy, que foi desenvolvida em 1938 e utiliza derivados do cianeto. Em 1970, Hegesh *et al.* modificaram a técnica de Evelyn e Malloy (1938), passando a utilizar pequenos volumes de amostra e reagentes (na ordem de μ L). Em uma avaliação feita por Dusse *et al.* (1998), a técnica de Hegesh *et al.* (1970) foi mais precisa e sensível do que a técnica original.

Os valores de referência das duas técnicas (em percentuais) de MHb são diferentes, ou seja, a técnica de Hegesh tem um valor de normalidade até 2%, já a de Naoum apresenta como normais, valores entre 1,9 a 3,8%. Essa diferença de normalidade entre as duas análises é fundamentada pelas reações químicas com os derivados de cianeto, ferricianeto de potássio e cianeto de sódio (Hegesh *et al.*, 1970) e na espectrometria específica de cada componente sem interferentes químicos (Naoum *et al.*, 2004).

Os princípios do método de Hegesh *et al.* (1970) foram bem abordados por Kohn *et al.* (2002), sendo: as concentrações de MHb e Hb em hemolisados têm máxima absorção em comprimento de onda em torno de 630 nm. Para se obter a medida de MHb, a absorbância do hemolisado a 632 nm foi

primeiro determinada na ausência de cianeto. Nova leitura foi obtida após a adição de solução neutralizada de cianeto (contendo cianeto de sódio e ácido acético) ao hemolisado. A adição de cianeto elimina a contribuição de MHb neste comprimento de onda. A absorbância na ausência de cianeto menos aquela na presença de cianeto é a medida da conversão de MHb presente na amostra a cianometemoglobina. A quantidade de Hb total no hemolisado foi determinada pela oxidação de todo heme para MHb, com ferricianeto de potássio, e o registro da absorbância a 632 nm. Nova leitura foi obtida após a adição de solução neutralizada de cianeto. A diferença na absorbância entre essas amostras reflete a concentração total de Hb no hemolisado. O princípio da técnica de Naoum *et al.* (2004) para a dosagem da concentração de MHb, em valores percentuais, fundamenta-se na avaliação da solução de Hb, previamente estabilizada em tampão fosfato M/60, em dois comprimentos de onda específicos para MHb (630 nm) e oxiemoglobina (540 nm).

Desta forma, é importante que as técnicas analíticas existentes sejam avaliadas, para a escolha racional daquela a ser utilizada, incluindo custos, baixa toxicidade dos reagentes, reprodutibilidade e acima de tudo confiabilidade na determinação. Tais fatores sendo considerados levarão à maior rapidez, tanto na análise, como na instituição da terapêutica adequada (administração intravenosa de azul de metileno), medida essencial em casos de intoxicação por substâncias metemoglobinizantes.

CONCLUSÃO

Ambas as técnicas mostraram-se eficientes na determinação de MHb. Embora não se possa afirmar que exista diferença estatística entre as duas técnicas, pois são medidas em escalas diferentes, dado que houve correlação significativa e positiva entre as duas técnicas, pode-se escolher a técnica de Naoum que, na prática, mostrou-se vantajosa sobre a de Hegesh, pois não utiliza derivados do cianeto em sua análise, é uma técnica muito estável no momento da leitura das amostras, é de menor custo e ainda isenta o analista de contaminações, exceto aquelas próprias decorrentes do tipo da amostra empregada.

REFERÊNCIAS

1. Dusse, L.M.S.; Alvarez-Leite, E.M.; Silva, Z.L.; Lages, G.F.G. Metemoglobina: aspectos fisiológicos, etiológicos e analíticos. *Rev. Bras. Toxicol.*, v.11, n.2, p. 51-60, 1998.
2. Evelyn, K.A.; Malloy, H.T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.*, v.126, p. 655-662, 1938.
3. Gregus, Z.; Klaassen, C.D. Mechanisms of Toxicity. In: Casarett, L.J.; Doull's, J. *Toxicology – The Basic Science of Poisons*. 6ª ed. New York, 2001.
4. Halliwell, R.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ª ed. London, 1998.
5. Hegesh, E.; Gruener, R.N.; Cohen, S.; Bochkovsky, R.; Shuval, H.I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. *Clin. Chim. Acta*, v.30, p. 679- 682, 1970.
6. Kohn, M.C.; Melnick, R.L.; Ye, F.; Portier, C.J. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug Metab. Dispos.*, v. 30, n. 6, p. 676-683, 2002.
7. Lepera, J.S. Agentes Metemoglobinizantes. In: OGA, S. *Fundamentos da Toxicologia*. 2ª ed. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2003, p. 163-174.
8. Naoum, P.C.; Radispiel, J.; Moraes, M.S. Dosagem espectrométrica de metemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.26, n. 1, p. 19 -22, 2004.
9. Rodwell, V.W. Proteínas: Estrutura e Função. In: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. 8ª ed. São Paulo, Harper: Bioquímica, 1998. p. 41- 62.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Rua das Garças, 80
CEP. 13405-132 – Nova Piracicaba – Piracicaba (SP)
e-mail: yofranco@terra.com.br Fone (019) 9625-0063

ERRATA RBAC VL. 39 - Nº 01/2007:

No trabalho intitulado "**Efeito do tabagismo sobre o perfil lipídico e suas implicações em detentos maternos do Presídio Estadual de Erechim - RS**", a Tabela nº 3 é a seguinte:

TABELA III
Lipídios séricos, glicose, pressão sanguínea e idade
em não-fumantes e fumantes de acordo com o
consumo de cigarros por dia

Parâmetros (mg/dL)	Não Fumantes n=22	Fumantes (cigarros/dia)			p
		≤ 10 n=6	11 — 20 n=13	> 20 n=9	
CT	150,09 ± 25,91	162,50 ± 40,04	145,38 ± 21,34	165,33 ± 41,73	0,378
TG	104,95 ± 60,03	128,16 ± 110,64	100,07 ± 64,25	139,62 ± 93,82	0,592
HDL-C	43,77 ± 12,22	39,66 ± 9,93	46,61 ± 8,58	35,87 ± 6,40	0,122
LDL-C	84,04 ± 22,55	97,00 ± 28,14	78,69 ± 24,76	99,37 ± 24,76	0,295
GLICOSE	78,81 ± 7,83	76,16 ± 7,65	77,53 ± 6,70	74,25 ± 3,84	0,450
PS	12,13 ± 0,77	12,66 ± 0,51	12,30 ± 0,75	12,62 ± 0,51	0,236
PD	8 ± 0,53	8 ± 0,89	7,92 ± 0,45	8,12 ± 0,35	0,882
IDADE	29,90 ± 9,13	29,83 ± 7,67	27,46 ± 6,23	27,87 ± 6,10	0,796

Revisão Rápida de 100%: um método eficiente na detecção de falso-negativo em citopatologia cervical*

100% Rapid Rescreening: an efficient method at detecting false negative cervical cytopathology

Edna Joana Cláudio Manrique¹; Rita Goreti Amara²; Nadja Lindany Alves Souza³; Suelene Brito do Nascimento Tavares³; Zair Benedita Pinheiro Albuquerque³; Gislaine Fonseca-Carvasan⁴ & Luiz Carlos Zeferino⁵

RESUMO - Este estudo teve como objetivo comparar o desempenho da revisão rápida de 100%, revisão aleatória de 10% como métodos de controle interno da qualidade dos esfregaços cervicais negativos no escrutínio de rotina. Foram analisados 3.149 esfregaços desses, 173 foram classificados como positivos, 2.887 como negativos e 89 esfregaços insatisfatórios. Os esfregaços classificados como negativos foram submetidos aos métodos de revisão rápida de 100% e revisão aleatória de 10%. A revisão rápida de 100% identificou 92 esfregaços suspeitos, desses 42 foram considerados positivos pelo diagnóstico final. Dos 289 esfregaços encaminhados para a revisão de 10%, quatro foram considerados alterados, mas apenas um foi confirmado como positivo pelo diagnóstico final. A revisão rápida de 100% é mais eficiente na detecção de resultados falso-negativos do que a revisão aleatória de 10% e pode ser recomendada como método de controle interno da qualidade.

PALAVRAS-CHAVE - câncer do colo uterino, controle de qualidade, revisão rápida, revisão aleatórias de 10% , esfregaço falso-negativo

SUMMARY - The aim of this study was to compare the performance of the 100% rapid rescreening and the 10% random rescreening as methods for internal quality control of cervical smears classified as negative during routine screening. A total of 3,149 smears were analyzed, 173 were classified as positive and 2,887 as negative, while 89 smears were considered unsatisfactory. The smears classified as negative were submitted to the 100% rapid rescreening and the 10% random rescreening. The 100% rapid rescreening method identified 92 suspect smears, where 42 were considered positive as final diagnosis. Of the 289 smears submitted to the 10% rescreening method, 4 were considered abnormal, but only one was confirmed positive as the final diagnosis. The 100% rapid rescreening method is more efficient to detect false negative results than the 10% random rescreening and should be recommended as an internal quality control method.

KEYWORDS - cervical cancer, quality control, rapid screening, 10% random rescreening, false negative smear

INTRODUÇÃO

É consenso mundial que o câncer invasivo de colo uterino pode ser evitado através do diagnóstico precoce e tratamento de suas lesões precursoras. Para esse fim, o exame citopatológico é o método mais utilizado para o rastreamento dessas lesões, pela sua sensibilidade, simplicidade e baixo custo (Koss, 1989; Mandelblat *et al.*, 2002). Porém, desde a década de oitenta vem sofrendo uma série de críticas relacionadas à alta taxa de resultados falso-negativos, que variam de 2% a 62%, os quais são atribuídos principalmente a erros de coleta, escrutínio e interpretação dos resultados (Bosch, 1992; Mitchell & Medley, 1995; Michalas, 2000). Os resultados falso-negativos limitam o diagnóstico preciso da doença e postergam o início da terapêutica, com graves consequências para a paciente (Arcuri *et al.*, 2002). Na tentativa de minimizar os resultados falso-negativos, algumas recomendações são necessárias: melhoria na técnica de coleta, otimização do controle interno da qualidade dos laboratórios com a participação dos profissionais nos programas de educação continuada, aprimoramento individual e teste de proficiência (Doornewaard *et al.*, 1997; Mody *et al.*, 2000; ASC, 2001; Brasil, 2002). O controle interno da qualidade em citopatologia ginecológica visa identificar casos falso-negativos não identificados no escrutínio de rotina e prover meios para o laboratório assegurar o melhor serviço possível à mulher, não só informando resultados corretos, mas também em tempo e formato correto (CDC, 1992; Mody *et al.*, 2000; ASC, 2001; Arcuri *et al.*, 2002).

O método mais adotado como controle interno da qualidade dos exames citopatológicos é a revisão aleatória de 10% dos esfregaços negativos, mas não tem demonstrado ser eficiente para reduzir os índices de falso-negativos (Kraemer, 1989; CDC, 1992; Melame & Flehinger, 1992; Tabbara & Sidawy, 1996; Baker *et al.*, 1995; Melamed, 1996; Dudding, 2001). No Brasil, de acordo com a Portaria Conjunta N°92/2001 do Ministério da Saúde, ficou estabelecido as normas do controle da qualidade do exame citopatológico cervical, onde os laboratórios deverão adotar práticas que permitam a revisão de pelo menos 10% dos exames realizados que deverão ser selecionados de acordo com os roteiros de critérios clínicos e citopatológicos, todos os esfregaços insatisfatórios em decorrência de hemorragia, esfregaços negativos aleatórios totalizando, no mínimo 5% do total dos exames realizados (Brasil, 2002).

Outro método que tem sido abordado com a finalidade de minimizar os resultados falso-negativos é a revisão rápida de 100% de todos os esfregaços interpretados previamente como negativos (Baker, 1991; Faraker, 1993; Faraker, 1996; Dudding *et al.*, 2001; Faraker, 2001). Esse método consiste em escrutinar rapidamente durante 30 a 120 segundos todos os esfregaços interpretados previamente como negativos. Após a revisão rápida, os esfregaços identificados como suspeitos são submetidos a uma revisão detalhada por um profissional experiente, que determinará o diagnóstico final (Baker *et al.*, 1995; Dudding *et al.*, 2001; Amara *et al.*, 2005). Outros estudos mostraram que a revisão rápida de 100% dos esfregaços negativos é uma al-

Recebido em 30/10/2006

Aprovado em 16/02/2007

Prêmio CFF de 2006 - *Laboratório de Análises Clínicas Rômulo Rocha da Faculdade Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

Estes resultados estão vinculados a Dissertação de Mestrado da primeira autora.

¹Aluna de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás; ²Professora, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás; ³Citologista, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás; ⁴Estatística, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;

⁵Professor, Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 403402/2004-2.

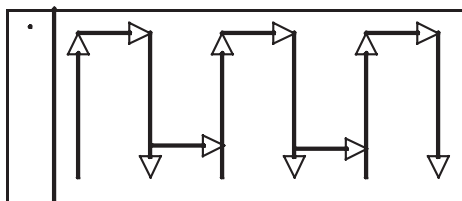
ternativa eficiente na detecção de resultados falso-negativos além de apresentar melhor relação custo-benefício (Hutchinson, 1996; Arbyn, 2000; Amaral *et al.*, 2005). Em resumo, um dos problemas que os laboratórios de citopatologia enfrentam é a alta taxa de resultados falso-negativos e a revisão de 10% dos esfregaços negativos não tem demonstrado eficácia enquanto método de controle interno da qualidade. Assim, este estudo teve como objetivo comparar o desempenho da revisão rápida de 100% e revisão aleatória de 10% como método de controle interno da qualidade dos esfregaços cervicais negativos no escrutínio de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa instituição. No período de março a junho 2005 foram analisados 3.149 esfregaços dos quais o escrutínio de rotina classificou 173 esfregaços positivos, 2.887 negativos e 89 esfregaços insatisfatórios.

Os esfregaços classificados como negativos pelo escrutínio de rotina foram submetidos à revisão rápida de 100% e revisão aleatória de 10%, conforme o seguinte roteiro:

1-Revisão rápida de 100%, utilizando a objetiva de 10X e a técnica Turret (Dudding *et al.*, 2001), no tempo médio de um minuto, conforme esquema abaixo:



2- Revisão de 10% dos esfregaços negativos selecionados aleatoriamente, utilizando tempo similar ao escrutínio de rotina (em média cinco minutos) e classificado de acordo com a alteração encontrada.

Para a realização da revisão rápida de 100%, a equipe foi previamente treinada, enquanto que, para a revisão aleatória de 10%, entendeu-se que não havia necessidade de treinamento prévio, pois este era o método utilizado como controle interno da qualidade na rotina do Laboratório.

Todos os esfregaços identificados como suspeitos ou alterados por qualquer uma das revisões foram submetidos à revisão detalhada e analisados por outros dois citologistas. Os resultados concordantes foram considerados como diagnóstico final. Quando havia discordância, os esfregaços eram revisados por um terceiro citologista e o diagnóstico final definido em uma reunião de consenso.

As etapas de revisões foram às cegas e os resultados foram classificados de acordo com a Nomenclatura de Bethesda 2001 (Solomon & Nayar, 2004). Seis citologistas participaram deste estudo, sendo que dois eram responsáveis pelo escrutínio de rotina, e os outros quatro se alternavam na realização das revisões, de tal forma que eles não revisaram a mesma lâmina mais de uma vez.

RESULTADOS

Dos 92 esfregaços suspeitos pela revisão rápida, 42 foram confirmados como alterados pelo diagnóstico final. Dos quatro esfregaços considerados como alterados pela revisão de 10% apenas um foi confirmado pelo diagnóstico final e classificado como LSIL (Tabela 1 e Tabela 2).

Dos 42 esfregaços falso-negativos confirmados pelo diagnóstico final, 19 foram classificados como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), dois como células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H), 19 como lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e dois como lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) (Tabela 2).

A tabela 3 mostra que dos 42 esfregaços alterados que não foram detectados pelo primeiro escrutínio, mas detectado pela revisão rápida e confirmados pelo diagnóstico final representou 19,5% do total de 215 esfregaços positivos da população de estudo. A maioria dos esfregaços falso-negativos foram classificados pelo diagnóstico final como ASC-US/H (9,8%), seguido de LSIL (8,8%), apenas 0,9% de HSIL. Nenhum esfregaço adicional de carcinoma escamoso e atipia glandular foi identificado. Enquanto que, a revisão de 10% representou 0,46% do total de 215 esfregaços positivos.

Tabela I
Desempenho da revisão rápida de 100% e Revisão de 10%

Categoria	n
Esfregaços submetidos à revisão rápida	2.887
Negativos pela revisão rápida	2.795
Suspeitos pela revisão rápida	92
Positivos pelo diagnóstico final	42
Esfregaços submetidos à revisão aleatória de 10%	289
Alterados pela revisão de 10%	04
Positivos pelo diagnóstico final	01

Tabela II
Esfregaços suspeitos pela revisão rápida de 100% e alterados pela revisão aleatória de 10% e confirmados pelo diagnóstico final

Revisões	Nº de casos
Revisão Rápida de 100%	
Casos suspeitos	92
Confirmados pelo diagnóstico final	42
ASC-US	19
ASC-H	02
LSIL	19
HSIL	02
Revisão Aleatória de 10%	
Casos alterados	04
Confirmados pelo diagnóstico final	01
LSIL	01

ASC-US- Células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H- Células escamosas atípicas não é possível excluir uma lesão intra-epitelial de alto grau; LSIL- Lesão intra-epitelial de baixo grau; HSIL- Lesão intra-epitelial de alto grau

Tabela III
Resultados alterados encontrados no primeiro escrutínio, na revisão rápida de 100% e revisão de 10%: 215/3.149 esfregaços

Categoria diagnóstica	Primeiro escrutínio	Revisão rápida	Revisão de 10%	Total
ASC-US	64 (2,0 3%)	19 (0,6 0%)	-	83 (2,6%)
ASC-H	05 (0,1 6%)	02 (0,0 6%)	-	07 (0,2%)
LSIL	65 (2,0 6%)	19 (0,6 0%)	01 (0,03%)	84 (2,7%)
HSIL	32 (1,0 2%)	02 (0,0 6%)	-	34 (1,1%)
Ca invasivo	01 (0,0 3%)	-	-	01 (0,03%)
AG	08 (0,2 5%)	-	-	08 (0,25%)
Total	173 (5,5%)	42 (1,3%)	01 (0,03%)	215 (6,8%)

ASC-US – Células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – Células escamosas atípicas não é possível excluir uma lesão intra-epitelial de alto grau; LSIL – Lesão intra-epitelial de baixo grau; HSIL – Lesão intra-epitelial de alto grau; AG – Atipia glandular

DISCUSSÃO

Este estudo mostrou um bom desempenho do método de revisão rápida de 100% que detectou 42 vezes mais esfregaços falso-negativos do que a revisão aleatória de 10%. Esse resultado representa um acréscimo de 1,3% de esfregaços alterados identificados pela revisão rápida de 100%, ao passo que, a revisão aleatória de 10% apresentou um acréscimo de 0,03%. O único esfregaço falso-negativo identificado pela revisão aleatória de 10% também foi identificado como suspeito pela revisão rápida de 100%.

Observou-se, também, que 0,9% dos esfregaços falso-negativos detectados pela revisão rápida foram classificados como HSIL. Esses resultados são concordantes com outros estudos (Diehl & Prolla, 1998; Dudding, 2001; Amaral *et al.*, 2005; Ferraz *et al.*, 2005).

Amaral *et al.* (2005) compararam o desempenho dos métodos de revisão rápida de 100% e revisão aleatória de 10% dos esfregaços negativos como métodos de garantia interna da qualidade. Observaram que a revisão rápida apresentou sensibilidade de 73,5% enquanto que, a revisão de 10% obteve sensibilidade de 40,9%. Esse estudo mostrou que a revisão rápida é uma alternativa eficiente para reduzir as taxas de resultados falso-negativos dos exames citopatológicos.

Em outro estudo de revisão rápida de 100% os autores concluíram que esse método é mais eficiente do que a revisão de 10% na detecção de anormalidades dos esfregaços cervico-vaginais (Ferraz *et al.*, 2005).

Lemay & Meisels (1999) em um estudo de revisão rápida detectou 329 esfregaços suspeitos, e a revisão detalhada confirmou 43 casos falso-negativos, dos quais, 36 foram classificados como ASCUS e 7 LIE-BG. Aproximadamente a cada sete esfregaços suspeitos, um foi confirmado pela revisão detalhada. Os autores concluíram que a revisão rápida de todos os esfregaços negativos é um método mais eficiente como controle interno da qualidade do que a revisão aleatória de 10%, porém às custas de um grande número de falso-positivos. O presente estudo obteve uma frequência de falso-positivos da revisão rápida bem menor do que o estudo acima citado, a cada dois esfregaços suspeito um foi confirmado pelo diagnóstico final.

Arbyn *et al.* (2000) em um estudo de metanálise, concluíram que a revisão rápida de 100% dos esfregaços negativos é um método eficiente e tem melhor relação custo-benefício como controle interno da qualidade do que a revisão aleatória de 10%.

Em um editorial onde foi comparada a relação custo-benefício de diversos métodos alternativos de revisão, a revisão rápida de 100% foi a que detectou mais casos falso-negativos com menor custo. Apesar de não ser o objetivo deste estudo analisar custo-benefício, observou-se que os dois métodos de controle interno da qualidade praticamente não exigem investimentos; os equipamentos são os mesmos utilizados rotineiramente no laboratório e tem o custo operacional relativamente baixo (Hutchinson, 1996).

O Laboratório Rômulo Rocha adotava como método de controle interno da qualidade a revisão aleatória de 10%. A partir deste estudo observou-se a vantagem de implementar o método de revisão rápida de 100% como controle interno da qualidade, pois além de detectar um maior número de resultados falso-negativos quando comparado com a revisão aleatória de 10%, possibilita também a avaliação contínua do desempenho da equipe, bem como identificar a variabilidade interobservadores em relação aos diagnósticos limítrofes.

REFERÊNCIAS

1. Amaral R.G., Zeferino L.C., Hardy E., Westin M.C.A., Martinez E.Z., Montenor E.B.L. Quality assurance in cervical smears: 100% rapid rescreening versus 10% random rescreening. *Acta Cytol*; 49:244-248, 2005.
2. Arbyn M. Detection of false negative pap smears by rapid reviewing. *Acta Cytol*; 44:497-57, 2000.
3. Arcuri R.A., Cunha K.C.F.C., Alves E.C., Castro A.A., Maciel R.A., Rosmanino A.C. et al. Controle interno da qualidade em citopatologia ginecológica: um estudo de 48.355 casos. *J Bras Patol Med Lab*; 38:141-7, 2002.
4. ASC. American Society of Cytopathology – Cervical Cytology Practice Guidelines. *Acta Cytol*; 45:201-6, 2001.
5. Baker A., Melcher D. Rapid cervical cytology screening. *Cytopathol*; n.2, p. 299-302, 1991.
6. Baker A., Melcher D., Smith R. Role of re-screening of cervical smears in internal quality control. *J Clin Pathol*; 48:1002-4, 1995.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Prevenção do Câncer do Colo do Útero. Manual Técnico para Laboratórios. Brasília, DF, 2002. 19 p.
8. Bosch M.M.C., Rietveld S.P.E.M., Boon M.E. Characteristics of false negative smears; *Acta Cytol*; 36:711-6, 1992.
9. CDC - Center For Disease Control - Regulations for Implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: A Summary. *MMWR* 1992; 17p.
10. Diehl A.R.S. e Prolla J.C. – Rapid rescreening of cervical smears for internal quality control. *Acta. Cytol*; 42:949-53, 1998.
11. Doornewaard H., Seijp H., Woudt J.M.C., et al. Negative cervical smears before CIN/ 3 carcinoma. Reevaluation with the PAPNET testing system. *Acta Cytol*; 41:74-78, 1997.
12. Dudding N., Hewer E.M., Lancucki L., Rice S. Rapid screening: a comparative study. *Cytopathol*; 12:235-48, 2001.
13. Dudding N. Rapid Rescreen: A Viable Alternative to 1:10 ? *Diag Cytopathol*; 24:219-21, 2001.
14. Faraker, C.A. Partial re-screening of all negative smears: an improved method of quality assurance in laboratories undertaking cervical screening. *Cytopathol*; 4: 47-50, 1993.
15. Faraker C.A., Boxer M.E. Rapid review (partial rescreening) of cervical cytology. Four years experience and quality assurance implications. *J C Pathol*; 49: 587-591, 1996.
16. Faraker, C.A. Rapid Review: current practice (Invited Commentary). *Cytopathology*; 12: 249-250, 2001
17. Ferraz M.G.M.C., Dall'Agnol M., Loreto C. di, Pirani W.M., Utagawa M.L., Pereira S.M.M. et al. 100% Rapid Rescreening for Quality Assurance in a Quality Control Program in a Public Health Cytologic Laboratory. *Acta Cytol*; 49:639-643, 2005.
18. Hutchinson M.L. Assessing the costs and benefits of alternative rescreening strategies. *Acta Cythol*; 40:4-8, 1996.
19. Koss L. G. The Papanicolaou test for cervical cancer detection; a triumph and a tragedy. *JAMA*; 261:737-43, 1989.
20. Kraemer B.B. Quality assurance activities of the College of American Pathologist. *Acta Cytol*; 33:343-8, 1989.
21. Lemay C., Meisels, A. 100% Rapid (Parcial) Rescreening for Quality Assurance. *Acta Cytol*; 43:86-8, 1999.
22. Mandelblatt J. et al. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer. *JAMA*; 287:372-81, 2002.
23. Melamed M.R. e Flehinger B.J. Reevaluation of quality assurance in the cytology laboratory. *Acta Cytol*; 36:461-5, 1992.
24. Melamed M.R. Rescreening for Quality Control in Cytology. *Acta Cytol*; 40:12-3, 1996.
25. Michalas S.P. – The Pap Test: George N. Papanicolaou (1883-1962) A screening test for the prevention of cancer of uterine cervix. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio*; 90: 135-8, 2000.
26. Mitchell H., Medley G. Differences between Papanicolaou smears with correct and incorrect diagnoses; *Cytopathol*; 6:368-75, 1995.
27. Mody D.R., Davey D.D., Branca M., Raab S.S., Schenck U.G., Stanley M.W. et al. Quality Assurance and Risk Reduction Guidelines. *Acta Cytol*; 44:496-507, 2000.
28. Solomon D., Nayar R. – The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, Springer-Verlag New York, Inc 2004; 191p.
29. Tabbara S.O., Sidawy M.D. Evaluation of the 10% rescreen of negative gynecologic smears as a quality assurance measure. *Diag Cytopathol*; 14:84-6, 1996.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra Rita Goreti Amaral
Av. Belo Horizonte Qd 39 Lt 04, Setor Jaó
CEP-74 673-020, Goiânia-GO
E-mail: amaral@farmacia.ufg.br

PRÊMIO SBAC

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio SBAC é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O Prêmio SBAC tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Análises Clínicas no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio SBAC, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio SBAC, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio SBAC é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio SBAC obrigatoriamente, deve ser apresentado na Sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio SBAC

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • Rio de Janeiro • RJ • 20270-902

Uso simultâneo do método do polimorfismo conformacional de fita simples e da citometria de fluxo no aumento da eficácia da detecção de anormalidades do gene e da proteína p53 na leucemia mielóide crônica*

Simultaneous use of the single strand conformation polymorphism method and flow cytometry for increasing the detection efficacy of abnormalities in the gene and p53 protein in chronic myeloid leukemia

Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc, PhD)^{1,2}; Claudete Esteves Klumb (MD, PhD)^{2,4}; Eliane Pereira Simões Magluta²; Marcos Antonio Mauricio Scheiner (MSc)²; Flavia da Cunha Vasconcelos²; Virginia Pires (MSc, PhD)³; Gabriela Vasconcelos de Andrade (MSc)³; Luíze Otero de Carvalho^{3,5}; Jane de Almeida Dobbin (MD)⁴ & Raquel C. Maia (MD, PhD)^{1,4}

RESUMO - Introdução: A proteína p53 desempenha um importante papel no controle do ciclo de celular e reparo no DNA danificado. Em pacientes com leucemia de mielóide crônica (LMC) as mutações neste gene são encontradas em até 30% dos casos, especialmente na crise blástica (LMC-CB), sendo a detecção de alterações nesse gene ou proteína importantes na avaliação da evolução clínica da LMC. O sequenciamento de DNA é descrito como o método capaz de identificar as mutações do gene *TP53*, sendo, no entanto uma técnica complexa e dispendiosa, o que dificulta seu emprego em larga escala, sendo, atualmente, proposto a pesquisa da proteína p53 por métodos imunológicos e a técnica da reação em cadeia da polimerase seguida pelo estudo do polimorfismo conformacional de fita simples (PCR/SSCP). **Métodos:** Analisaram-se amostras de 72 pacientes com LMC: 54 de LMC em fase crônica (33 fase inicial ou LMC-FCi e 21 em fase crônica tardia ou LMC-FCtd), 7 em fase acelerada ou LMC-Ac e 11 em crise de blástica (LMC-CB). Foram realizados PCR para os exons 5-9 para posterior estudo pelo SSCP e a expressão de proteína de p53 foi feita por citometria de fluxo. **Resultados:** Na análise do PCR-SSCP, alterações de mobilidade eletroforética indicativa de mutação do gene de *TP53* foi observado em 11/72 pacientes e a expressão da proteína p53 em 17/72 pacientes. O SSCP anormal foi visto em dois casos de LMC-FCi (exon 7), quatro LMC-FCtd (um exon 7, um exon 8 e dois exons 8-9), um na LMC-Ac (exon 8) e quatro na LMC-CB (dois no exon 5, um no exon 6 e um no exon 8-9). Neste grupo, a proteína de p53 estava expressa sete casos (todas LMC-CB e AC e 2 LMC-FCtd), havendo correlação estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos. **Conclusões:** Estes resultados sugerem que os dois métodos conjuntamente empregados podem aumentar a sensibilidade na detecção de anormalidades do gene e proteína p53 nos pacientes com LMC. A presença de SSCP anormal associado à expressão da proteína de p53 nas fases avançadas desta doença na maioria de casos, sugere que estes exames possam ser empregados como indicadores de progressão para a LMC.

PALAVRAS-CHAVE - Mutação do gene *TP53*; proteína p53; reação em cadeia da polimerase; polimorfismo conformacional de fita simples; citometria de fluxo; leucemia mielóide crônica.

SUMMARY - Context: The p53 protein play an important role in the control of the cell cycle and DNA repair. In patients with chronic myeloid leukemia (CML) mutation in this gene were found in up to 30%, especially among those in blast crisis. At present, the only widely available technology that reliably detects and defines all mutations is DNA sequencing. However, the routine sequencing of the entire *TP53* gene in all cases suggestive of mutation in the laboratorial routine is prohibitively costly, complex, and time consuming. To screen for *TP53* abnormalities in CML patients, both p53 protein expression by immunologic methods and single strand conformation polymorphism of polymerase chain reaction products (SSCP-PCR) is proposed. **Methods:** We report the results of an analysis of 72 samples from CML patients: 54 in chronic phase (33 in initial phase (ICP-CML) and 21 in late phase (LCP-CML), 7 in accelerated phase (AP-CML) and 11 in blast crisis (BC-CML). DNA structure for 5-9 exons of the *TP53* gene were analyzed by PCR-SSCP and p53 protein expression by flow cytometry (CF). **Results:** By PCR-SSCP analysis, shifts in electrophoretic mobility of the *TP53* gene were detected in 11 out of 72 CML patients and p53 protein expression in 17 out of 72 CML patients. The abnormal SSCP pattern were showed in two cases of ICP-CML (exon 7), four LCP-CML (one exon 7 and exon 8 and two exons 8-9), one in AP-CML (exon 8) and four in BC-CML (two in exon 5, one in exon 6 and one in exon 8-9). In this group, the p53 protein were express in 17 cases (all CB and AC of CML patients and 2 out of 5 LCP samples of CML patients) and the statistical analysis by qui-square test showed correlation between this two tests. **Conclusions:** These results suggest that the two methods together can increase the sensibility of screening for p53 abnormalities in CML patients. The presence of abnormal SSCP associated to the p53 protein expression in advanced phases of this disease in the most of cases, suggesting that these tests can be used as an indicator of progression of CML.

KEYWORDS - *TP53* gene mutation; p53 protein; Polymerase Chain Reaction; Single Strand Conformation Polymorphism; Flow Cytometry; Chronic Myeloid Leukemia.

INTRODUÇÃO

Mutações do gene *TP53* e / ou inativação da proteína p53 são as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos humanos, ocorrendo em cerca de 50%

dos casos¹⁻³. A presença ou ausência de mutações nesse gene tem importantes implicações prognósticas para alguns tipos de tumores. Em tumores de mama ela é indicativa de uma pior evolução de doença metastática e também de falha na resposta a quimioterapia⁴. A avaliação do *status* do

Recebido em 29/06/2006

Aprovado em 26/02/2007

Prêmio SBAC 2006

*Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer (LHCM/HC-I / INCA/RJ). ¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT / UFRN), ²Laboratório de Hematologia celular e Molecular do Hospital do Câncer I; Instituto Nacional de Câncer (LHCM/HC-I/INCA-RJ); ³Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO/INCA-RJ); ⁴Serviço de Hematologia do HC-I/INCA-RJ; ⁵Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

gene e proteína p53 também pode ser útil em outras formas de câncer como nos casos de câncer de cólon e bexiga, atuando com fator prognóstico independente^{1-3,5}.

Nas hemopatias malignas, alteração do gene e da proteína p53 tem sido observada com menor frequência, quando comparadas com os tumores sólidos, predominando, porém, em doenças com curso clínico desfavorável⁶⁻¹³, tais como na recorrência da leucemia linfóide aguda (LLA), transformação da síndrome mielodisplásica (SMD) para leucemia mielóide aguda (LMA) e na transformação da leucemia linfóide crônica (LLC) para síndrome de Richter⁶⁻¹³. Em portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) a expressão da proteína p53 mutada tem sido mais observada na fase de crise blástica (LMC-CB), com incidência de 20 a 30% dos casos¹²⁻¹³. Na fase crônica da doença (LMC-FC) essa frequência gira em torno de 5%, sugerindo que a mutação do gene *TP53* possa ser um evento adquirido ao longo do processo evolutivo da doença (Figura 01)^{1,12-15}. Nessas doenças, tem sido constatada maior frequência da expressão da proteína p53 mutada nos casos de LMC em crise blástica mielóide quando comparadas com a LMC em crise blástica linfóide¹⁵.

Os métodos de detecção das alterações do gene e da proteína p53 disponíveis incluem os métodos imunológicos de detecção da proteína p53, as análises moleculares e estudos das alterações estruturais dos cromossomos 17 envolvendo o locus 13p17¹⁶.

A detecção da proteína por meio de anticorpos monoclonais (AcMo) anti-p53 baseia-se na premissa de que a proteína p53 funcional (selvagem) encontra-se presente no núcleo das células em pequena concentração e que, tendo a sua vida média reduzida (de 6 a 20 minutos), não pode ser facilmente detectada¹⁶⁻¹⁹. Quando, porém, ocorre a inativação da proteína p53 por mutação do gene *TP53* ou mesmo por outro mecanismo, vários fatores que regulam a sua expressão são acionados, tornando a proteína mais estável e detectável por técnicas imunológicas, tais como a imunohistoquímica, imunocitoquímica ou Western blot¹⁶⁻²⁰. As desvantagens desses métodos estão relacionadas ao fato de que deles serem incapazes de identificar a proteína p53 em tumores com mutação *non sense* em suas seqüências genéticas, visto que, em tais mutações, ocorre ausência de transcrição para a proteína p53 (mutação *stop codon*). Calcula-se, no entanto, que essas alterações ocorram em menos de 20% das mutações do gene *TP53* em tumores humanos²⁰. Outra grande dificuldade na elaboração dessas metodologias é o fato das mesmas serem laboriosas o que dificulta o seu emprego na rotina laboratorial¹⁶⁻¹⁷.

Mais recentemente, a citometria de fluxo (CF) tem se destacado como um método eficaz na detecção da proteína p53 em células tumorais^{16-17,21-25}. Este método apresenta como vantagem sobre os demais o fato de ser uma técnica semi-automatizada onde se pode processar e analisar rapidamente um grande número de amostras em tempo reduzido¹⁶⁻¹⁷.

A CF apresenta a vantagem de ser uma técnica semi-automatizada em que se pode processar e analisar, conjuntamente, um grande número de amostras em tempo reduzido¹⁷, apresentando também como vantagem a possibilidade da análise multiparamétrica, fornecendo informações adicionais tais como análise simultânea de dois ou mais antígenos concomitantemente além da possibilidade de quantificação antigênica¹⁷.

Dentre as análises moleculares, as técnicas de sequenciamento de DNA conseguem detectar mutações através da leitura de seqüência de nucleotídeos a partir de DNA extraídos a partir de amostras de células tumorais. Por se tra-

tarem de técnicas de alta sensibilidade, o sequenciamento consegue detectar praticamente todas as mutações atualmente descritas no gene *TP53*^{20,26}. As técnicas de sequenciamento de DNA, no entanto, oferecem a desvantagem de somente identificarem a presença de mutações no gene *TP53* quando a presença de alelos da forma selvagem não excedam 2/3 do material analisado, caso contrário, poderão existir falsos resultados negativos^{20,26}. Isso dificulta a realização e interpretação desses exames em neoplasias hematológicas em virtude da contaminação das amostras por células não neoplásicas e, portanto, contendo alelo selvagem do gene *TP53*^{20,26}. Deve-se, também, levar em conta, o fato de que as técnicas são métodos caro e trabalhosos que dependem de equipamentos sofisticados, razão pela qual não se recomenda o seu uso em grande número de amostras ou como método de diagnóstico de rotina.

A reação em cadeia de polimerase ou PCR do inglês *polymerase chain reaction* seguida pela análise do polimorfismo conformacional de fita simples ou SSCP do inglês *single-stranded conformational polymorphism analysis* tem sido apontado como um ótimo método de triagem para mutação do gene *TP53*²⁸⁻³². Trata-se de uma técnica mais simples que permite a identificação de amostras com mutação do tipo *missense*, sendo mais adequada para estudos com grande número de amostras, além de ter boa correlação com a expressão da proteína p53 mutada²⁶⁻³³.

O PCR/SSCP permite detectar alterações moleculares em DNA de fita simples que causam mudanças na mobilidade eletroforética³⁰. Teoricamente, a mudança de um único nucleotídeo é capaz de induzir a diferença de mobilidade eletroforética na fita simples em gel de poliacrilamida não desnaturante³⁰. A sensibilidade desse método é considerada alta, conseguindo detectar até 80% das mutações presentes em fragmentos menores que 300 pares de bases (bp)³⁰. As desvantagens desse método estão relacionadas ao fato de que ele ser incapaz de identificar certas alterações como deleções e iniciadores flanqueando uma região maior que 300 bp também não são recomendadas, uma vez que a sensibilidade desta técnica é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento amplificado³⁰.

Embora indiretamente, uma outra forma de avaliação do status do gene *TP53* é a análise citogenética que pode ser útil na detecção de deleções no braço curto do cromossomo 17 em particular (região 17p13)²³. Adicionalmente, técnicas de citogenética molecular ou *hibridização in situ*, podem ser utilizadas graças ao uso de sondas fluorescentes capazes de hibridizar com a região p13 do cromossomo 17. Essas alterações cromossômicas são comumente observadas nas formas graves de LLC¹⁰, crise blástica da LMC^{10,34-35} e também na transformação de SMD para LMA⁷⁻¹⁶.

Este trabalho teve objetivo investigar alterações do gene e da proteína p53 em pacientes com LMC, empregando simultaneamente um método de detecção de mutação para o gene *TP53* e de expressão da proteína p53: o polimorfismo conformacional de fita simples e a citometria de fluxo respectivamente.

Adicionalmente, procuramos correlacionar estes resultados entre si, estágios evolutivos da LMC e com fatores prognóstico para esta doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS

1. Pacientes

Foram selecionados para estudo uns totais de 71 pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) em diversos estágios

evolutivos da doença e atendidos no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular (LHCM) do Serviço de Hematologia do Hospital do Câncer I (HC-I), Instituto Nacional de Câncer-RJ (INCA): 33 fase crônica inicial (LMC-FCin), 21 em fase crônica tardia (LMC-FCTd) 7 em fase acelerada (LMC-FAC) e 11 em crise blástica (LMC-CB) dos quais, 9 em crise blástica mielóide e 2 em crise blástica linfóide. O diagnóstico da LMC baseou-se em critérios clínicos e laboratoriais proposto pela WHO (*The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1977*)³⁶⁻³⁷. Os dados laboratoriais empregado neste estudo incluíram o hemograma, contagem de plaquetas, mielograma, determinação de fosfatase alcalina leucocitária, análise citogenética e pesquisa do BCR/ABL. Os dados do hemograma, contagem de plaquetas e fosfatase alcalina leucocitária foram obtidos no Serviço de Patologia Clínica do HC-I - INCA; a citogenética e pesquisa do BCR/ABL nos Laboratórios de Citogenética e Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea do (CEMO/ INCA), os aspirados de medula óssea no Serviço de Hematologia do HC-I /INCA. Informações sobre os dados demográficos, clínicos e laboratoriais obtidos foram devidamente agrupados com relação aos fatores prognósticos descritos para a LMC (Tabela I)³⁷⁻⁴² para posterior correlação com a expressão da proteína p53 e análise do PCR/SSCP.

2 Amostras controle

2.1. Amostras controle para expressão positiva e negativa da proteína p53 por citometria de fluxo.

As linhagens de células tumorais humanas foram empregadas como controle de expressão positiva e negativa para a expressão da proteína p53 por CF. Células das linhagens GLC-4, Raji, Namalva e HT-29 que expressam a proteína p53 mutada, as linhagens MCF-7, H460, MT-2 e C91pl, que expressam a p53 selvagem foram utilizadas como controles positivos e as linhagens K562, Lucena, Daudi, HL-60 e Jurkat como controle negativo^{17,43-44,53}. Paralelamente, foram utilizadas células mononucleares de 40 indivíduos sadios (doadores de sangue) para o estabelecimento do ponto de corte dos níveis de expressão da proteína p53 pela CF^{17,44,49,53}.

2.2. Amostras controle para o estudo da reação em cadeia da polimerase e polimorfismo conformacional de fita simples de DNA (PCR/SSCP).

Como controles positivos para o PCR/SSCP foram utilizados DNA extraído de amostras de linfoma de Burkitt que tinham mutação para diversos exons do gene TP53 e que apresentaram um padrão alterado de migração no PCR/SSCP³³ e também amostras de DNA extraídos de linfócitos procedentes de indivíduos saudáveis, os quais serviram como padrão de migração normal.

Todas as amostras dos pacientes e doadores de sangue foram coletados após os indivíduos ou seus representantes legais serem esclarecidos dos objetivos do presente trabalho e assinado o termo de consentimento pós-informado.

MÉTODOS

1. Cultivo das células das linhagens leucêmicas humanas

Células procedentes de linhagens leucêmicas foram cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura de células (Tubos Falcon, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo meio de cultura RPMI (RPMI-medium 1640 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), suplementado com soro fetal bovino (Bovine Calf Sera, Gibco™, Invitrogen Corporation, Burlington, Canada). As células foram encuba-

das inicialmente em uma concentração de $3 - 10 \times 10^5$ células / mL a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂^{17,44-45}.

2. Separação de células mononucleares

Amostras de MO e SP foram coletadas em tubos heparinizados e as células mononucleares separadas em gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque, 1077 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Após esse procedimento, as células mononucleares foram lavadas três vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e ressuspensas em meio de cultura RPMI (RPMI-medium 1640 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB / Biomast, Brasil) sendo ajustadas para a concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/mL^{17,44}.

3. Teste de viabilidade celular

As células mononucleares foram incubadas em solução de azul de tripan (Triplan blue / Merck, Frankfurter, Germany) a 0,5% em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4 (*Phosphate Buffer Saline* – PBS / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), na proporção de 9/1. Após a homogeneização, a mistura foi observada ao microscópio óptico, sendo descartadas amostras com viabilidade inferior a 80%^{17, 44-45}.

4. Detecção da proteína p53 por citometria de fluxo

A pesquisa da proteína p53 pela CF foi realizada em triplicata para cada linhagem celular, em 40 diferentes amostras de sangue de doadores sadios e em todas as amostras dos pacientes com LMC, empregando solução de lise (Becton Dickinson's FACS lysing solution, San José CA, USA) para a permeabilização celular^{17,35,44}.

A suspensão celular ajustada na concentração $1,0 \times 10^6$ / células por mL por tubo foi incubada com solução de lise previamente diluída a 10% em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação a 1.500 rpm por 7 minutos, descarte do sobrenadante e homogeneização do sedimento. Após ressuspender o sedimento em 2 mL de solução de Tween-20 diluído a 0,5% em PBS (Tween-20 / BHD, England), esta mistura foi centrifugada 2 vezes a 1.500 rpm^{17,35,44}.

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi homogeneizado e adicionado sobre o mesmo 10µL de AcMo anti-p53 (DO-7 / Dako, Carpintaria, CA, USA) conjugado a isotiocianato de fluorosceína (FITC), seguida de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esta etapa, o sedimento foi homogeneizado em 2 mL de solução de PBS/Tween-20, seguida de centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos, desprezado o sobrenadante e o sedimento ressuspensionado e submetido a mais uma lavagem com solução de PBS/Tween-20. Após o descarte do sobrenadante, ao sedimento final foi adicionado 1 mL de solução de formaldeído diluído a 1% em PBS (Formaldeído PA / Vetec, Brasil) e estocado na geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no CF^{17,35,44}.

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

A leitura e as análises foram realizadas no citômetro Fluorescence Activated Cell Analyser (FACScan, San Jose, CA, USA) empregando o software Cell Quest (The Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC e SSC em escala linear e FL1 em escala logarítmica que detecta a fluorescência verde, ou seja, a reação antígeno/anticorpo conjugado ao FITC^{17,35, 44}.

Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas (Figura 2) com valores de percentual da população celular com reação positiva para o AcMo anti-p53 e também a quantificação antigênica da proteína p53 através da intensidade média de fluorescência (IMF), calculada pela razão entre a IMF do tubo com o AcMo anti p53 e a IMF, calculado a partir da razão do IMF do tubo com células da mesma amostra marcado com anticorpos inespecíficos^{17,35,44,49,53}.

5. Reação em cadeia da polimerase e polimorfismo conformacional de fita simples de DNA (PCR/SSCP).

Os estudos da mutação para os exons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *TP53* foram realizados em todas as amostras dos pacientes com LMC, paralelamente ao estudo da expressão da proteína p53 por CF. Este procedimento foi realizado através da técnica do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) nos produtos de amplificação para os exons acima citados.

5.1. Extração de DNA genômico

As amostras de sedimento de células mononucleares separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque (*buffy coat*) e ajustadas na concentração de $1,0 \times 10^6$ terão o seu DNA extraído usando o kit de extração de DNA genômico (Genomic DNA isolation; Kit Gentra systems, Minneapolis, USA).

Quando o concentrado de células mononucleares continha hemácias, as amostras foram previamente tratadas com solução de lise para glóbulos vermelhos. Em um microtubo cônico de 1,5 mL (Eppendorf, Westbury, NY, USA), foi adicionado 15 -25µL de *buffy coat*. Adicionado sobre o mesmo, solução de eritrócitos (RBC Lysis Solution; Kit, Gentra Systems, Minneapolis, USA) na proporção de 3 partes de RBC lyse solution para 1 parte de *buffy coat*. O tubo foi invertido várias vezes para homogeneizar a mistura e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, invertendo novamente o tubo pelo menos uma vez durante o tempo de incubação. Os tubos foram centrifugados por 20 segundos a 13.000 - 16.000 rpm, o sobrenadante descartado com uma pipeta, deixando o sedimento visível de células brancas e aproximadamente 10 - 20 µL de líquido residual.

Em seguida, os tubos foram vigorosamente agitados em um vortex para ressuspender as células no líquido residual. Em seguida, adicionou-se sobre a suspensão de celular, 300µL de solução de lise celular (Cell Lysis Solution, Kit, Gentra Systems; Minneapolis, USA), misturando bem com uma pipeta para lisar as células. Se ainda assim os agregados se mostrarem visíveis, procedeu uma incubação da mistura a 37°C, por uma hora ou à temperatura ambiente, por 24 horas até que a solução tornar-se homogênea.

Adicionou-se 1,5µL de solução de Rnase (RNase A Solution; Kit, Gentra Systems; Minneapolis, USA) ao lisado de células e o tubo foi invertido 25 vezes para misturar a amostra e, então, incubado em um banho maria a 37°C por 15 - 60 minutos. Após este período, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente, e sobre a mesma adicionada 100µL de solução de precipitação protéica (Protein Precipitation Solution; Kit Gentra Systems, Minneapolis, USA) ao lisado de células. A mistura foi então homogeneizada vigorosamente em um vortex em velocidade alta por 20 segundos objetivando misturar uniformemente a solução de precipitação protéica ao lisado de células.

A solução foi então centrifugada a 13.000 - 16.000 rpm por 10 minutos. O precipitado protéico forma um sedimento visível com tonalidade variando de marrom a branco. Quando o sedimento não se mostrou visível, a mistura foi submetida a uma nova homogeneização no vortex e incubada em gelo por 5 minutos sendo então novamente centrifugada. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA foi

transferido para um tubo cônico limpo de 1,5 mL contendo 300µL de Isopropanol 100% (2- propanol, Merck). Após o descarte do sedimento protéico, a mistura foi homogeneizada delicadamente e congelada em um freezer por uma hora para obtenção de uma melhor precipitação do DNA, que se mostrará visível como uma pequena nuvem branca suspensa no isopropanol. A mistura foi então centrifugada a 13.000 - 16.000 rpm por 5 minutos e o DNA surgiu como um pequeno precipitado branco no fundo do tubo. O sobrenadante foi delicadamente descartado, o tubo drenado em um papel de absorvente limpo para retirar o excesso de isopropanol. Após esse procedimento, foi adicionado sobre o mesmo 300µL de etanol 70%, (Etanol, Merck) e o tubo foi invertido várias vezes para lavar o precipitado de DNA. O tubo foi então novamente centrifugado a 13.000 - 16.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado cuidadosamente para não perder o DNA. O tubo foi novamente invertido e drenado brevemente em papel absorvente limpo e, em seguida, a amostra foi deixada exposta à temperatura ambiente por 30 minutos para total evaporação do etanol.

Ao DNA precipitado, foi pipetado 50µL de solução de hidratação de DNA (DNA Hydration Solution; Kit Gentra systems, Minneapolis, USA). O DNA re-hidratado foi incubando por uma hora a 65°C ou *overnight* a temperatura ambiente. As amostras foram então estocadas a -4°C até o momento de análise.

5.2. Leitura da concentração de DNA genômico

A concentração de DNA nas amostras foi determinada através da leitura em espectrofotômetro, utilizando-se as medidas de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Para tal, uma alíquota de 1µL de DNA de cada amostra foi diluída em 999µL de água Milli Q estéril completando um volume final de 1000µL. O espectrofotômetro marca Ultrospec 3000 (Pharmacia, Biotech) foi calibrado a 260 e 280nm e a absorbância das amostras diluídas foi medida. O DNA foi considerado de boa qualidade quando a relação da densidade óptica obtida (DO) no comprimento de onda de 260/280 foi maior que 1,7.

5.3. Avaliação da integridade do DNA genômico

A integridade do DNA extraído foi inicialmente avaliada através de corrida eletroforética a 50 volts em gel de agarose a 1% no tampão TAE 1X (Trizma base, EDTA 0,5 M pH 8,0, ácido acético glacial). Para tal, foi aplicado 10µL de DNA e 2µL do corante azul de bromofenol e xilenocianol, sendo o gel corado com brometo de etídeo (0.5mg/mL), durante 10 minutos, e visualizados por meio da incidência de radiação ultravioleta, em uma câmara escura equipada com um transiluminador, e registrado por uma câmera digital acoplada a um microcomputador dotado de um *software* de captura e análise de imagens em tempo real (ChemImagerTM).

Adicionalmente, a avaliação da integridade do DNA genômico também foi feita a partir de amplificações do gene constitutivo gliceraldeído phosphato desidrogenase (GAPDH), sendo descartadas as amostras que não obtiveram amplificação. O GAPDH foi escolhido como controle pelo fato de ser expresso de maneira constante e abundante nas células de mamífero⁴⁶.

5.4. Reação em cadeia da polimerase para os exons 5, 6, 7, 8 e 8-9 do gene *TP53*.

Os *primers* usados na reação de PCR foram sintetizados pela GIBCO-BRL. As seqüências de nucleotídeos dos *primers* foram: 5F 5'- CAGTACTCCCCTGCCCTCAA-3', 5R 5'-CACCATCGCTATCTGAGCAG-3'; 6F 5'-CACTGATTGCTCTTAGGTCT-3', 6R 5'-AGTTGCAAACCA-GACCTCAG-3'; 7F 5'-CTAGGTTGGCTCTGACTGTA-3', 7R 5'-TGACCTGGAGTCTTCCAGTG-3'; 8F 5'-

CTTCTCTTTTCCTATCCTGA-3', 8R 5'-TCTTGTCCT-GCTTGCT-3'; 8/9F 5'-AGTGGTAATCTACTGGGACG-3', 8/9R 5'-TCTCCATCCAGTGGTTTCTT-3'.

Para a reação da PCR foram utilizados 100-500ng de DNA, 25 pmoles de cada primer dos exons 5, 6, 7, 8, 8/9, 0.2mM de DNTPs, 1U de Taq Polimerase (GIBCO/BRL) 1,5 a 3mM/L de $MgCl_2$ (GIBCO/BRL), em um volume final de 45 μ L (exon 6 e 8, 25 μ L). O programa da reação de PCR incluiu 35 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento (temperaturas de anelamento foram adequadas para cada par de primers) e extensão a 72°C sendo realizado em um termociclador (PC-100, MJ Research, USA).

A partir da obtenção dos produtos de amplificação da PCR (amplicons), alíquotas de 5 μ L de cada amostra foram adicionadas a 1 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30,00%) e então analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), contendo Tris-HCl a 0,45mM, ácido bórico a 0,45mM e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 2,5mM em pH 8,0. Os parâmetros de eletroforese adotados foram 100 V de corrente por 30 minutos. O número de bases do DNA amplificado foi determinado por comparação a um marcador de peso molecular e 100bp utilizado foi o DNA "ladder" de 100 bp (Gibco-BRL). Após a separação eletroforética, cada gel foi cuidadosamente removido e corado por imersão em uma solução de brometo de etídio a 0,5 μ g/mL por 3 minutos. Dessa solução, os géis de agarose contendo os produtos de PCR eram lavados com água destilada (dez minutos) e visualizados por meio da incidência de radiação ultravioleta de modo similar ao do DNA genômico. Após os devidos ajustes de exposição cada imagem foi documentada e armazenada em formato digitalizado, tornando-se disponível para a etapa de análise de imagem. O tamanho dos amplicons foram: 190bp para o exon 5, 144bp para o exon 6, 118bp para o exon 7, 180 bp para o exon 8, 289 bp para o exon 8/9 e 110 bp para o gene constitutivo GAPDH (Figura 3).

5.5. Análise do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) do gene TP53.

A técnica do PCR/SSCP foi baseada no método descrito originalmente por Orita e colaboradores (1989)⁴⁷ e padronizada e adaptada no LHCM/ HC-1/INCA-RJ por Klumb e colaboradores³³. Os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:2 em tampão desnaturante, contendo formamida a 98%/10mM EDTA, 0,1% de azul de bromofenol e 0,025% de xileno cianol; aquecidos a 95°C durante 10 minutos, imersas imediatamente em gelo e aplicadas em gel de poliacrilamida em concentração de 8% (exons 5 e 6) e 10% (exons 7, 8 e 8-9), contendo TBE (pH 8.3). A corrida foi realizada a 40-60 volts à temperatura de 18 a 20°C com duração variando de 14 a 19 horas. Após eletroforese, os géis foram corados por nitrato de prata de acordo com o protocolo inicialmente proposto por Bassam e colaboradores (1991)^{33,48}. Em uma primeira etapa, os géis foram fixados em solução fixadora contendo etanol 10% e ácido acético glacial 0,75% por 10 minutos, sob agitação leve, porém constante. Em seguida, foi realizada a coloração do gel por solução de nitrato de prata 0,3% por 10 minutos, também sob agitação constante. Para retirada do excesso de prata do gel, foram realizadas duas lavagens sucessivas com água Milli-Q, que não ultrapassaram um minuto de duração. Por fim, foi adicionada, sob agitação constante dos géis, uma solução reveladora contendo hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,3%, por tempo suficiente para que as bandas fossem visualizadas. A seguir, a revelação foi bloqueada com a solução fixadora inicial^{33,48}. Os géis foram se-

cos em papel celofane, com ou sem glicerol a 10%, "scaneados" e analisados. Como controle positivo de migração alterada foram empregadas amostras de DNA extraído dos casos em que foi detectado previamente um padrão alterado de migração no PCR/SSCP e DNA procedentes de linfócitos de indivíduos saudáveis, os quais serviram como amostras padrão de controle de migração normal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos dois ensaios foram analisados por diferentes testes estatísticos através do software estatístico *Statistic Pack for Social Sciences* (SPSS for Windows versão 9.0; Copyright © SPSS, INC), sendo considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Para comparação dos resultados da expressão da proteína p53 e resultados do PCR/SSCP empregou-se o teste do qui quadrado, na correlação da expressão da proteína p53 e do PCR/SSCP com fatores prognósticos, empregou-se os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A avaliação dos valores de expressão, medias e desvio padrão para a proteína p53 nas amostras de pacientes, foram realizadas empregando o software Microsoft® Excel 2000 versão 9.0, o qual também foi utilizado na construção do gráfico de figura de dispersão relativo a intensidade antigênica a proteína p53 determinado pela citometria de fluxo dos pacientes com LMC (Figura 5).

RESULTADOS

1.Características gerais dos pacientes

Os dados laboratoriais dos pacientes estudados estão contidos na tabela III. A leucometria superior a 50.000/mm³ estava presente na maioria dos casos em todas as fases evolutivas da doença, correspondendo a 63% dos casos em fase crônica inicial, 61,9% dos pacientes em fase crônica tardia, 57% na fase acelerada e 63,6% dos pacientes em crise blástica. O percentual de blastos no SP inferior a 10% foi observado em todos os pacientes na fase crônica da doença. Quatro pacientes em fase acelerada apresentavam contagem de células blásticas variando entre 10 e 19% e três com contagem dessas células oscilando entre 20 e 29%. Todos os pacientes em crise blástica apresentavam contagem de blastos maior que 30%.

A contagem de plaquetas foi maior que 150.000/mm³ na maioria dos pacientes em fase crônica. Na fase acelerada e crise blástica observou-se plaquetopenia na maioria dos casos.

Os níveis de hemoglobina dentro dos limites de normalidade estavam presentes na maioria dos pacientes na fase crônica inicial e tardia da doença representando 66,7 e 51,7% dos casos respectivamente. Pacientes com anemia acentuada (dosagem de hemoglobina inferior a 10,0g/dL) foram observadas nos casos mais graves como na crise blástica e na fase acelerada representando 63,6 e 57,1% dos casos respectivamente.

A análise citogenética foi feita em 55 casos (24/33 pacientes em fase crônica inicial, 12/21 em fase crônica tardia, todos os 7 pacientes em fase acelerada e 8/11 pacientes em crise blástica). O cromossomo Philadelphia (Ph) ou t(9;22)(q34.1;q11.21) foi detectado em 16/33 casos de LMC em fase crônica inicial, 10/21 casos em fase crônica tardia, 4/7 em fase acelerada e 4/11 pacientes em crise blástica. Ausência do cromossomo Ph foi observada em 5 /33 casos em fase crônica inicial, 1 /21 em fase crônica tardia, 3/7 em fase crônica acelerada, e 3/7 em fase acelerada e 2/11 pa-

cientes em crise blástica. As alterações citogenéticas adicionais à t(9;22) foram vistas em 9,1% dos casos de LMC na fase crônica inicial, 23,8% da LMC fase crônica tardia, 42,9% das LMC em fase acelerada e em 18,2% dos casos de LMC em crise blástica.

2. Análise da proteína p53 por citometria de fluxo

2.1. Amostras controle

A análise da expressão da proteína p53 nas células de linhagens leucêmicas humanas GLC-4, HT-29, H460, MT-2, C91pl, Raji e Namalva por CF mostraram elevado percentual de células positivamente marcadas e valores expressivos de IMF, contrastando com as linhagens HL-60, Daudi, Jurkat, K562 e Lucena onde se observou ausência de expressão da proteína p53. Resultados similares aos observados nas células oriundas das linhagens HL-60, Daudi, Jurkat, K562 e Lucena também foram observados em linfócitos normais procedentes de 40 doadores de sangue sadios que serviram como valores de *cut-off* para expressão da proteína p53 pela CF. Estes valores de expressão oscilaram de 0 a 4% de células positivamente marcadas e 1,0 a 1,4 nos valores do IMF (Tabela II).

2.2. Amostras dos pacientes com LMC

Nas análises da expressão da proteína p53 em amostras dos pacientes com LMC, os resultados foram considerados positivos quando as células apresentaram o valor do IMF maior que 1,4 de acordo com os valores do *cut off* estabelecidos no LHCM/HCI-INCA-RJ, mediante a análise prévia das células controles (linhagens de células tumorais e linfócitos normais oriundos de 40 doadores de sangue)^{17,44,49,53}.

Os níveis de expressão da proteína p53 na totalidade dos casos de LMC, assim como em seus subtipos evolutivos, estão demonstrados na figura 6, constando de 17 casos positivos (23,6%) e 55 (76,4) negativos na totalidade dos casos analisados. A proteína p53 estava expressa em 6,0% dos casos de LMC-FCin, em 14,3% da LMC-FCtd, em 57,5% da LMC-FAc e 72,3% na LMC-CB, sendo observada correlação estatisticamente significativa entre a expressão da proteína p53 estágios mais avançados da LMC ($p=0,0002$). Em relação ao percentual de células p53 positivas e aos níveis de intensidade antigênica, observaram-se valores mais significativos nas fases mais avançadas da LMC (Ac e CB) quando comparadas com as amostras coletadas de indivíduo na fase crônica da doença (Tabela IV e Figura 5).

3. Resultados da técnica do polimorfismo conformacional de fita simples (PCR/SSCP) e correlação dos mesmos com a expressão da proteína p53.

Um padrão de migração alterado para o PCR/SSCP indicativo de mutação foi observado no exon 5 em duas amostras (ambas LMC-CB), uma no exon 6 (LMC-CB), três no exon 7 (todos LMC-FCtd), dois no exon 8 (um LMC-FCtd e um LMC-FAc) e três nos exons 8-9 (dois em LMC-FAc e um em LMC-CB), totalizado 11/72 casos (15,3%) (Tabela V).

A presença de amostras com expressão da proteína p53 associada ao PCR/SSCP com padrão alterado de migração foi observada em 7 casos (9,7%), expressão da proteína p53 e PCR/SSCP com padrão normal de migração em 10 amostras (13,9%), padrão anormal do PCR/SSCP, porém sem expressão da proteína p53 em 4 casos (5,6%). A associação dos resultados duplamente negativos, ou seja, a presença de PCR/SSCP sem alterações de migração e ausência de expressão da proteína p53 foi observada em 54 amostras (75%) (Tabela VI).

4. Correlação entre a expressão da proteína p53 e resultados do PCR/SSCP com os fatores prognósticos dos pacientes com LMC.

Na tabela VII estão discriminadas as correlações entre a expressão da proteína p53, resultados do PCR/SSCP e fatores prognósticos para a LMC. Com relação a expressão da proteína p53, observou-se correlação estatisticamente significativa com: a idade, plaquetopenia, níveis de hemoglobina inferiores a 10g/dL, contagem elevada de células blásticas no SP, alterações citogenéticas, esplenomegalia e hepatomegalia. Entretanto, nas análises dos resultados do PCR/SSCP foi observado correlação estatisticamente significativa apenas com a plaquetopenia, contagem elevada de células blásticas no SP, esplenomegalia e hepatomegalia.

DISCUSSÃO

As alterações genéticas envolvendo o gene *TP53* ocorrem em aproximadamente 50% dos tumores humanos e incluem a troca de nucleotídeos na sequência do gene *TP53* (mutação *missense*), assim como deleções, inversões e translocações envolvendo o cromossomo 17, havendo uma estreita correlação dessas alterações genéticas com a estabilização e acúmulo da proteína p53 no núcleo das células^{1-2,10,53}. Tal fato tem levado numerosos estudiosos a pesquisar a expressão da proteína p53, como indicadora de prognóstico em neoplasias humanas de diversas origens.

Outras formas de inativação da proteína p53 incluem interações com outras proteínas regulatórias do ciclo celular como as proteínas p16 e MDM2 e também proteínas virais como o antígeno TAX do vírus linfotrófico de células T humana (HTLV) e EBNA5 do vírus Epstein-Barr (EBV)^{16,53}. Essas proteínas, quando interagem com a proteína p53 levam a inativação, estabilização e acúmulo da proteína p53 no núcleo da célula, tornando possível a sua detecção^{16,53}.

A associação entre a mutação e a superexpressão da proteína p53 e a evolução clínica desfavorável nas leucemias têm sido observada em vários trabalhos^{1,4-12,33}. Na LMC, este achado genético é raramente observado nas fases iniciais da doença, apresentando, no entanto, tendência a aumentar nas fases mais avançadas da doença, havendo uma estreita correlação desse achado com fatores prognóstico desfavoráveis, resistência ao tratamento e menor tempo de sobrevida global^{5-15,53}.

Os principais objetivos deste estudo foram de investigar a incidência de alterações do gene e da proteína p53 na LMC. Para este fim, foi inicialmente padronizada e aplicada a técnica de PCR/SSCP em amostras de MO e/ou SP desses pacientes, para, então, correlacionar esses resultados com a expressão da proteína p53 e fatores prognóstico para esta doença contidos na tabela I. Para este fim, inicialmente, foram realizadas amplificações para os exons 5 - 9 em todas amostras pela reação da PCR. A escolha destes exons para avaliação de mutação se deu pelo fato de ser nessa região que se concentram mais de 90% das mutações do gene *TP53* em humanos^{3,6,10,53}.

Tendo em vista o método do PCR/SSCP se basear na observação do padrão de migração, se fez necessária a presença de amostras contendo sabidamente padrões de migração alterado e normal para, então, se poder fazer uma comparação com as amostras a serem testadas. Como padrão de migração alterado, foram empregadas amostras de DNA procedentes de pacientes com linfoma de Burkitt anteriormente testadas pela técnica do PCR/SSCP, nas mesmas condições do trabalho por Klumb CE e colaboradores (2003)³³. Como padrão de migração normal para o

PCR/SSCP foram aproveitadas amostras de DNA extraídas de linfócitos normais que serviram como controle de expressão negativa para a proteína p53 por CF. Na detecção da proteína p53 por CF, empregou-se como controle células tumorais referidas na literatura como positivas e negativas na expressão da proteína p53, as quais foram testadas em triplicata para confirmar a reprodutibilidade do método. Paralelamente também foram empregados linfócitos periféricos normais procedentes de 40 indivíduos sadios, os quais serviram como controles negativos e para o estabelecimento do ponto de corte para níveis de expressão antigênica da proteína p53^{17,44,49,53}. Observou-se nestes casos, intensidade antigênica elevada em células das linhagens com mutação do tipo *missense* para o gene *TP53*: Namalva com mutação nos codons 248 do exon 7^{17,43}; Raji (codon 234, exon 7)^{17,43}; HT-29 (codon 273, exon 8)^{17,45} e GLC-4 (codon 132, exon 5)^{10,43,51}, em detrimento das linhagens MCF-7¹⁷; H460¹⁷ e MT-2¹⁷. Essas linhagens expressam a forma selvagem do gene e, possivelmente, apresentam outros mecanismos de estabilização da proteína^{17,53}. As linhagens K-562 e Daudi, que também apresentam mutação do gene *TP53* no codons 135 do exon 5 e codon 213 do exon 6, respectivamente, não mostraram expressão da proteína p53 pelo fato destas mutações impedirem a transcrição da proteína (mutação do tipo *stop codon*)^{7,17,45,52-53}, ocorrendo o mesmo com a linhagem Jurkat que também apresenta mutação do tipo *stop codon* no codon 196 do exon 6^{17,45,53}. A linhagem HL60 apresenta ausência de transcrição da proteína p53 por apresentar deleção no locus 13p do cromossomo 17^{7,17,45,53}. Os resultados das análises da expressão da proteína p53 nas amostras dos pacientes com LMC, obtidas por CF, mostraram diferentes níveis de expressão, havendo, no entanto, níveis mais elevados nos casos de doença mais avançada (Tabela IV e Figura 5). A presença do PCR/SSCP, com padrão de migração eletroforético alterado observado em 11 amostras, corresponderam, na maioria dos casos, a pacientes com tempo mais prolongado de doença e que também expressaram a proteína p53 (Tabelas V e VI), tratando-se de achados compatíveis com o descrito na literatura, onde é relatada a presença de mutações para o gene *TP53* nas fases mais avançadas da LMC^{6,10,15,53}. O fato dessa alteração molecular também ter sido detectada nas fases crônica da LMC (dois na LMC-FCi e quatro na LMC-FCtd), pode ser o indicio de evolução da doença ainda não detectado clinicamente. Na LMC-CB esta alteração ocorre em cerca de 30% nos casos, sendo mais freqüente na crise blástica mielóide do que na linfóide. Isto tem sido atribuído a uma maior freqüência de alterações cromossômicas (deleções e translocações) envolvendo o cromossomo 17 em pacientes com crise blástica mielóide quando comparadas aos casos de LMC com evolução para crise blástica linfóide^{10,13,15,24,35,38-39,53}. Tal fato foi observado no presente artigo, onde se constatou que todos os 4 casos de LMC-CB com o PCR/SSCP com padrão de migração eletroforético alterado e que também expressaram a proteína p53 eram de pacientes em crise blástica mielóide, sendo que dois destes pacientes apresentaram alteração estrutural envolvendo o cromossomo 17 (Tabelas V e VI). Dentre outros fatores de mau prognóstico para LMC, a expressão da proteína p53 apresentou correlação estatisticamente significativa com baixos níveis de hemoglobina e plaquetopenia, correlacionando também com o percentual elevado de blastos no SP, presença de alterações citogenéticas adicionais, esplenomegalia, hepatomegalia e idade avançada. Trata-se de correlações esperadas, pois estes referenciais

são fatores descritos como de mau prognóstico para LMC, e que se mostram mais presentes nos estágios mais avançados da doença. Assim como constatado nos resultados da análise do PCR/SSCP, resultados positivos para esse marcador observado ainda na fase inicial da LMC de alguns pacientes também podem refletir indicio de evolução clínica desfavorável, não detectado clinicamente (Tabela VII).

Com relação à correlação entre resultados obtidos pelo PCR/SSCP e fatores prognósticos para a LMC, observou-se correlação estatisticamente significativa apenas com a presença de esplenomegalia, hepatomegalia, elevado número de células blásticas no SP e correlação inversa com a contagem de plaquetas (Tabela VII). Estes achados refletem, de certa forma, uma maior sensibilidade da detecção da proteína p53 pela CF quando comparado com o PCR/SSCP na avaliação da detecção das alterações do gene e / ou proteína p53.

O PCR/SSCP é descrito como método de elevada sensibilidade para detecção de mutação do gene *TP53*, girando em torno de 80% dos casos, quando os fragmentos dos produtos de amplificações do PCR analisados apresentam peso molecular variando em torno de 100 a 300 bp. No entanto, nem todas as mutações podem ser detectadas por este método, tais como mutações em fragmentos maiores que 300 bp. Além do mais, este é método inadequado à detecção de mutações não *missense* como deleções ou em fragmentos de DNA com peso molecular maior que 300 bp, uma vez que a sensibilidade desta técnica é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento amplificado⁵³.

Uma das limitações das técnicas de biologia molecular na investigação de mutações do gene *TP53* em amostras de sangue são os resultados falsos negativos em decorrência da amplificação de alelos selvagens do gene *TP53* pela reação da PCR, que pode ocorrer por causa da contaminação das amostras por células não tumorais, embora isto seja mais freqüente nas reações de sequenciamento, quando comparadas com PCR/SSCP. O fato é que diante desta situação torna-se necessária a adição de métodos de clonagem dos produtos de PCR para só então posteriormente proceder a realização do PCR/SSCP e / ou o sequenciamento de DNA.

Outra limitação da interpretação das análises do PCR/SSCP é o fato dessas alterações dos padrões de migração eletroforética também ocorrerem em amostras que contenham polimorfismo para o gene *TP53*, tornando recomendável uma posterior análise de sequenciamento de DNA das amostras positivas para a confirmação da mutação.

Tais limitações metodológicas dificultam a realização e interpretação desses testes, que também podem ser implicados como indicadores para elevação do tempo e custos para a realização destes exames, dificultando sua utilização na rotina laboratorial em larga escala.

No entanto, o padrão de migração alterado para o PCR/SSCP observados nas amostras de pacientes com LMC do presente estudo reforça a possibilidade de que os padrões de migração eletroforética anormal sejam de fato decorrentes de mutação *missense* em razão da ausência de relatos sobre polimorfismos constitucional para os exons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *TP53*.

Reforçando as considerações acima descritas, a correlação direta entre amostras que apresentaram PCR/SSCP com alteração de migração eletroforética concomitantemente com a superexpressão da proteína p53, bem como a associação de amostras com padrão de eletroforese normal e fenótipo p53 negativo, na maioria dos casos, reforçam a possibilidade de que as amostras com SSCP alterado de fato continham mutação do tipo *missense* para o gene *TP53*.

Adicionalmente, o pequeno número de amostras de paci-

entes com LMC-FCi que apresentaram o PCR/SSCP alterado, em contraste com o maior número de casos com as mesmas alterações do PCR-SSCP nas amostras procedentes de casos mais avançados da doença, mostram-se dentro do descrito pela literatura, que relata maior frequência de alterações do gene e proteína p53 nos casos mais avançados da LMC⁵³, reforça ainda mais a convicção de que os resultados do PCR/SSCP com padrão de migração alterado eram de fato decorrentes da presença de mutação *missense* no gene *TP53*.

Tabela I

Fatores prognósticos para LMC empregados neste estudo

Variáveis	Favorável	Desfavorável
Idade	< 55 anos	≥ 55 anos
Sexo	Feminino	Masculino
Leucometria Global	< 100.000 / mm ³	≥ 100.000 / mm ³
Plaquetas	≥ 100.000 / mm ³	≥ 100.000 / mm ³
Hemoglobina	> 10g / dL	≤ 10,0g/dL
SNC	Ausente	Presente
Hepatomegalia	Ausente	Presente
Esplenomegalia	Ausente	Presente
Blastos (SP)	> 1%	< 1%
Status	Fase crônica	Fase Acelerada; Crise Blástica
Citogenética	Ph (+)	Ph (-); alterações adicionais

Ph: t(9;22), Cromossomo Philadelphia

Referências: Tura ³⁷; Socal ³⁸; Serra *et al* ¹³; Barnett e Eaves ³⁹; Foti ⁴¹.

Tabela II

Expressão da proteína p53 em células de linhagem tumoral humana e linfócitos de doadores sadios obtidos por citometria de fluxo.

Células tumorais	Citometria de fluxo	
	(%) Variação (m*)	IMF Variação (m*)
HT-29	97 ± 1 (98)	12,2 ± 0,2 (12,1)
HL-60	0	1,0
GLC-4	98 ± 1 (98)	45,2 ± 1,2 (45,2)
K562	0	1,3 ± 0,1 (1,3)
Lucena	0	1,2 ± 0,1 (1,2)
Jurkat	0	1,1 ± 0,1 (1,3)
MT-2	86 ± 1 (87)	3,5 ± 0,2 (3,5)
C91pl	88 ± 8 (88)	4,4 ± 1,1 (4,2)
Daudi	2 ± 1 (3)	1,1 ± 0,1 (1,1)
Raji	93 ± 7 (93)	52,2 ± 2,9 (51,3)
Namalva	92 ± 5 (93)	43,9 ± 11,8 (42,4)
H460	80 ± 5 (82)	2,5 ± 0,6 (2,6)
MCF-7	44 ± 1 (44)	2,2 ± 0,5 (2,2)
Doadores (n. 40)	2 ± 2 (0,47)	1,2 ± 0,2 (1,08)

OBS: (m) média dos valores determinados pela realização dos testes em triplicata, exceto em linfócitos normais (controle negativo) oriundas de 40 diferentes doadores; (%): percentual de células positivamente marcadas; (IMF) índice médio de intensidade de fluorescência.

Tabela III
Características laboratoriais dos pacientes com LMC

Dados Laboratoriais	LMC / FC in. n (%)	LMC / FC td. n (%)	LMC / AC. n (%)	LMC / CB. n (%)
	33	21	7	11
Leucócitos (x 10³)				
≥ 50,0	21 (63,6)	13 (61,9)	04 (57,1)	07 (63,6)
49,0 – 20,0	07 (21,2)	04 (19,0)	01 (14,3)	01 (9,1)
< 20,0	05 (15,1)	04 (19,0)	02 (28,6)	03 (27,3)
% Blastos (SP)				
≥ 30	00 (-)	00 (-)	00 (-)	11 (100)
20 - 29	00 (-)	00 (-)	3 (42,6)	00 (-)
10 - 19	00 (-)	00 (-)	4 (57,1)	00 (-)
<10	33 (100)	21 (100)	00 (-)	00 (-)
Plaquetas (x 10³)				
≥ 150,0	32 (97,0)	13 (61,9)	02 (28,6)	00 (-)
< 150,0 – 100,0	01 (3,0)	03 (14,3)	02 (28,6)	03 (27,3)
< 100,0	00 (-)	05 (23,0)	05 (71,4)	08 (72,7)
HB (g /dL)				
≥ 12,0	22 (66,7)	12 (57,1)	01 (14,3)	02 (18,2)
11,9 – 10,0	10 (30,3)	08 (38,1)	02 (28,6)	02 (18,2)
< 10,0	01 (3,0)	01 (4,8)	04 (57,1)	07 (63,6)
Citogenética				
Cromossomo Ph (+)	16 (48,5)	10 (47,6)	04 (57,1)	04 (36,4)
Cromossomo Ph (-)	05 (15,1)	01 (4,8)	00 (-)	02 (18,2)
Ph / +AD	03 (9,1)	05 (23,8)	03 (42,9)	02 (18,2)
Não realizado	09 (27,3)	05 (23,8)	00 (-)	03 (27,3)

MC/FCin) Leucemia mielóide crônica em fase crônica inicial; (LMC/ FCtd) Leucemia mielóide crônica em fase crônica dia; (LMC/AC) Leucemia mielóide crônica em fase acelerada; (LMC/CB) Leucemia mielóide crônica em crise blástica; 1) Cromossomo Philadelphia; (Ph / + AD) Cromossomo Philadelphia mais alterações citogenéticas adicionais.

Tabela IV

Variáveis dos valores de expressão da proteína p53 por citometria de fluxo em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica.

LMC, n.72	Min - Max	MD	Me	dp
Percentual				
Total de casos	0 - 98	13	0	± 27
Fase crônica inicial	0 - 15	2,0	0	± 1,0
Fase crônica tardia	0 - 49	2	0	± 5,0
Fase acelerada	0 - 86	36	26	± 37
Crise blástica	0 - 98	54	58	± 34
IMF				
Total de casos	1,0 - 11,9	1,59	1,0	± 1,66
Fase crônica inicial	1,0 - 1,4	1,10	1,0	± 0,07
Fase crônica tardia	1,0 - 1,8	1,13	1,0	± 0,05
Fase acelerada	1,0 - 3,3	1,84	1,67	± 0,81
Crise blástica	1,0 - 11,9	3,79	2,30	± 0,30

(MD) média; (Me) mediana; (dp) desvio padrão; (Min-Max) mediana mínima e máxima; (IMF) índice médio de intensidade de fluorescência.

Tabela V

Correlação entre PCR/ SSCP com migração anormal, expressão da proteína p53, alterações citogenéticas e fases evolutivas da leucemia mielóide crônica.

Casos (status)	SSCP (exons)	Proteína p53 (IMF)	Citogenética
# 01 - FCin	7	1,0	Ph+
# 02 - FCin	7	1,4	Ph+
# 03 - FCtd	8 - 9	3,0	Ph+
# 04 - FCtd	8 - 9	1,3	Ph+
# 05 - FCtd	8	1,1	Ph+
# 06 - FCtd	7	2,2	Ph+
# 07 - FAc	8	1,6	Ph+, del 8 (p11); trissomia 19
# 08 - CBmi	5	11,9	Ph+, del 17 (p1)
# 09 - CBmi	5	3,2	Ph+
# 10 - CBmi	6	1,7	Ph+, del 5; del 17
# 11 - CBmi	8 - 9	9,1	Normal (Ph-)

(FAc) fase acelerada; (FCtd) fase crônica tardia; (FCi) fase crônica inicial; (CBmi) Crise blástica mielóide; (Ph) Cromossomo Philadelphia.

Tabela VI
Associação entre a expressão das proteínas p53 e análise do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)

Expressão da proteína p53	SSCP (migração eletroforética alterada)		
	Positivo n. (%)	Negativo n. (%)	<i>p</i>
positivo	07 (9,7)	10 (13,9)	0,0024*
negativo	04 (5,6)	51 (70,8)	

(*) Teste do qui-quadrado corrigido pelo Fisher exato; (n) número de casos estudados

Tabela VII
Correlação entre a expressão da proteína p53 e as alterações do PCR/SSCP com fatores prognóstico nos pacientes com LMC.

FATORES PROGNÓSTICOS	Expressão da p53		SSCP	
	Teste	<i>p</i>	Teste	<i>p</i>
Idade	< 55a			
	Mann -Whitney	0,044	Mann -Whitney	0,44
Sexo	F M			
	Mann -Whitney	0,76	Mann -Whitney	0,22
Leucometria / mm ³	(≥ 100.000)			
	Mann -Whitney	0,88	Mann -Whitney	0,38
Plaquetometria / mm ³	(< 100.000)			
	Mann -Whitney	0,00 037	Mann -Whitney	0,046
Hb / g/dL	(< 10)			
	Mann -Whitney	0,033	Mann -Whitney	0,22
Blastos % (SP)	< 10% 10 – 29% > 30%			
	Kruskal-Wallis	0,0003	Kruskal-Wallis	0,04
Citogenética	Ph+ Ph-			
	Kruskal-Wallis	0,044	Kruskal-Wallis	0,99
Esplenomegalia				
	Mann -Whitney	0,0007	Mann -Whitney	0,0004
Hepatomegalia				
	Mann -Whitney	0,0005	Mann -Whitney	0,0001

Resultados estatisticamente significativo (*p* < 0,05). (PCR/SSCP) Reação em cadeia da polimerase e polimorfismo conformacional de fita simples ou single-stranded conformational polymorphism (Ph) Cromossomo Philadelphia

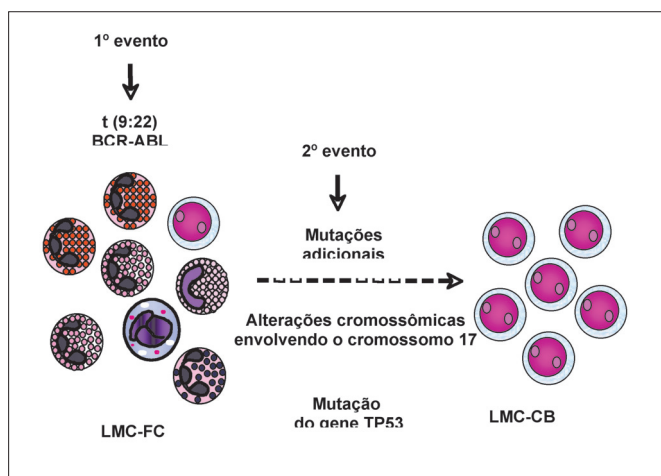


Figura 01 – Modelo proposto para o mecanismo de envolvimento do gene TP53 na evolução clínica da leucemia mieloide crônica. Na LMC, diversos estudos têm demonstrado que alterações no gene ou proteína p53 ocorrem principalmente nas fases de transformação e crise blástica (CB), estando diretamente relacionada com as alterações envolvendo o cromossomo 17. No início da fase crônica da LMC (LMC-FC) ocorre o primeiro evento relacionado a doença que é o surgimento da t (9;22) ou cromossomo Philadelphia. Nas fases de transformação surgem alterações citogenéticas adicionais, muitas das quais envolvendo o sítio de localização do gene TP53, levando a mutação do gene TP53.

Baseado em Rotter e Prokocimer 1 e Cavalcanti Júnior 53.

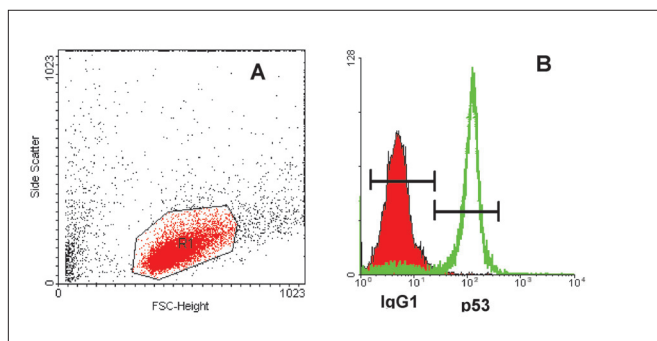


Figura 02 - Exemplos de histogramas com a expressão da proteína p53 e controle isotípico IgG1 em uma amostra de um paciente com LMC.

A: Representação gráfica de um histograma do tipo dot-plot do espalhamento luminoso das características físicas das células (tamanho e complexidade interna). Em destaque (vermelho) a população analisada. B: Gráfico de intensidade de fluorescência: em vermelho controle isotípico de marcação inespecífica e em cor verde, histograma representativo de marcação positiva com anticorpo monoclonal DO-7.

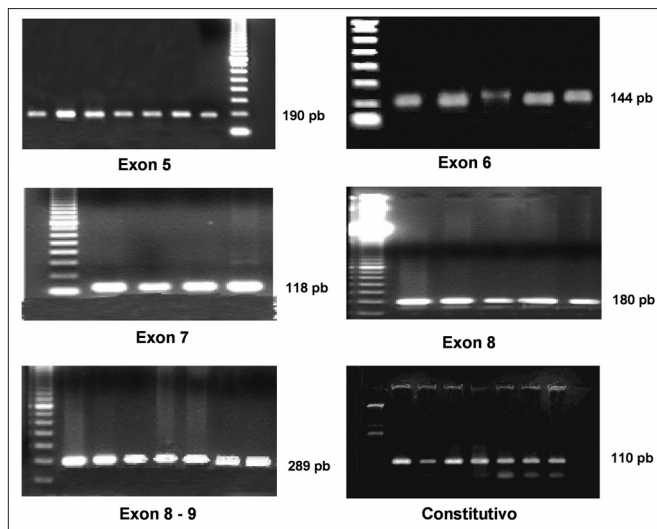


Figura 3.-Eletroforese realizada em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio, revelando os produtos de amplificação para os exons 5, 6, 7, 8 e 8 – 9 do gene TP53 e do gene constitutivo gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH).

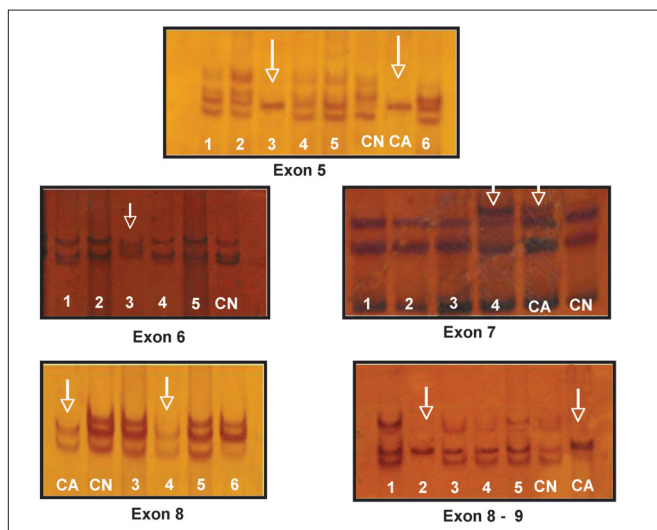


Figura 4 – PCR /SSCP em amostras de pacientes com leucemia mieloide crônica após coloração pela prata. CN: controle normal; CA: controle anormal. Em destaque na seta, as amostras dos pacientes e controles com padrão de migração eletroforético alterado.

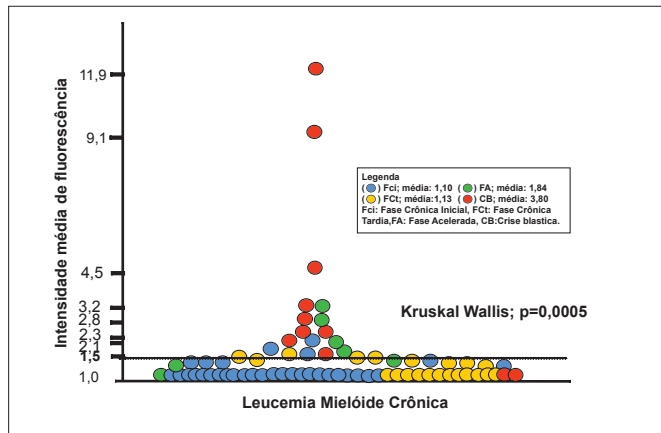


Figura 05- Correlação dos níveis de intensidade antigênica da proteína p53 determinado por intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo e e estágios evolutivos da leucemia mieloide crônica.

OBS: os valores abaixo das linhas tracejadas representam os resultados negativos.

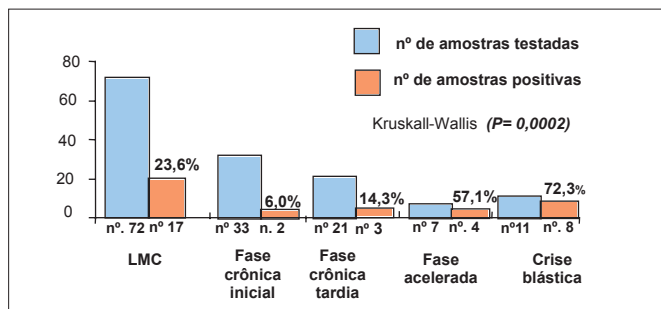


Figura 6 - Leucemia mieloide crônica e a expressão da proteína p53 de acordo com o estágio evolutivo.

CONCLUSÃO

Em última análise, conforme pode ser constatado, os níveis de expressão da proteína p53 e o padrão de migração alterado do PCR/SSCP estavam mais presentes nas fases acelerada e de crise blástica da LMC, quando comparadas com os casos examinados ao diagnóstico (LMC-FCi), sugerido desta forma que a pesquisa das alterações do gene e da proteína p53 possam ser empregadas como biomarcador adicional de monitoramento de evolução clínica desfavorável para esta doença.

REFERENCIAS

1. Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res* 1991; 53: 257-272.
2. Soussi T, Debouche K, Bérout C. L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains: le lien entre l'épidémiologie et la carcinogenèse. *M/S Synthese* 2000; 16: 1387-1396.
3. Soussi T, Debouche K, Bérout C. p53 Website and analysis of p53 gene mutation in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Human Mut* 2000; 15: 105-113.
4. Vojteřek B, Lane DP. Regulation of p53 expression in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 1996; 73: 29-35.
5. Martin A. Le gène suppresseur de tumeur p53 (2ª partie): applications en pathologie humaine. *Ann Pathol* 1995; 15 (3): 184-191.
6. Imamura J, Miyoshi I, Koefler P. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84 (8): 2412-2421.
7. Prokocimer M, Rotter V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood* 1994; 84 (8): 2391-2411.

8. Prokocimer M, Shakai M, Ben Bassat H, Wolf D, Goldfinger N, Rotter V. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 68 (1): 113-118.
9. Preudhomme C, Fenaux P. p53 et hemopathies malignes. *Pathol Biol* 1997; 45 (10): 777-908.
10. Cavalcanti Júnior GB, Klumb CE, Maia RC. p53 e as hemopatias malignas. *Rev Brás.Can* 2002;419-427.
11. Prokocimer M, Shakai M, Ben Bassat H, Wolf D, Goldfinger N, Rotter V. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 68 (1): 113-118.
12. Preudhomme C, Fenaux P. p53 et hemopathies malignes. *Pathol Biol* 1997; 45 (10): 777-908.
13. Serra A, Guerrasio A, Gaidano G, Rosso C, Rege-Cambrim G, Petroni D, Mazza U, Saglio G. Molecular defects associated with the acute phase CML. *Leuk Lymphoma* 1993; 11 (supl 1), 25-28.
14. Feintein E, Cimino G, Gale P et al. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6293 - 6297.
15. Ahuja HG, Bar-Eli M, Advani SH, Benshimol S, Cline MJ. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6783-6788.
16. Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24 (2): 111-115.
17. Cavalcanti Júnior GB, Scheiner MAM, Oliveira JGP, Vasconcelos FC, Ferreira ACS, Maia RC. Citometria de fluxo, imunocitoquímica e Western blot na detecção da expressão da proteína p53 em células tumorais: uma análise comparativa. *Rev Bras Anal Clin* 2003; 35 (3): 135-142.
18. Bonsing BA, Cover WE, Gorsira MCB et al. Specifics of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy and flow cytometry. *Cytometry* 1997; 28: 11-24.
19. Turpeinen M, Serpi R, Rahkolin M, Vähäkangas K. Comparison of anti p53 antibodies in immunoblotting. *Bioch Bioph Res* 2002; 293: 850-856.
20. Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 233-239.
21. Danova M, Giordano M, Mazzini G, Riccardi A. Expression of p53 protein during the cell cycle measured by flow cytometry in human leukemia. *Leuk Research* 1990; 14 (5): 417-422.
22. Kimura O, Sugamura K, Kijima T, Makino M, Shigeru T, Ito H, Kaibara N. Flow cytometry examination of p53 protein in primary tumors and metastases to the liver and lymphonodes of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1996; 39 (12): 1428-1433.
23. Fillippini G, Griffin S, Uhr M, Eppenberger H, Bonilla J, Cavalli F, Soldati G. A novel flow cytometry method for the quantification of p53 gene expression. *Cytometry* 1998; 31: 180-186.
24. Konikova E, Kuseuda O, Babusikova I. Flow cytometry of p53 protein expression in some hematological malignancies. *Neoplasma* 1999; 46 (6): 368-376.
25. Konikova E, Kuseuda O. p53 protein expression in human leukemia and lymphoma cells. *Neoplasma* 2001; 48 (4): 290-298.
26. Soussi T, Debouche K, Bérout C. p53 Website and analysis of p53 gene mutation in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Human Mut* 2000; 15: 105-113.
27. Bossaro S, Viale G. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Vichows Arch* 1995; 427: 229-241.
28. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
29. Murakami Y, Hayashi K, Skiya T. Detection of aberrations in a human tumor cells lines by single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 3356-3361.
30. Hayashi K. PCR-SSCP: a simples and sensitive method for detection in genomic DNA/PCR. *Meth and Appl* 1991; 1: 34-38.
31. Logullo AF, Pereira de Moura R, Nonogaki S, Kowalski LP, Nagai MA, Simpson AJG. A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-Based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. *Diag Mol Pathol* 2000; 91: 35-40.
32. Fujino M, Dosaka-Akita H, Kato M, Kinoshita I, Akie K, Kawakami Y. Simultaneous use of the PCR-SSCP Method and Immunohistochemistry for Increasing the detection Efficacy of p53 Abnormalities in Human Lung Cancer.

- Am J Clin Pathol 1995; 104: 319-324.
33. Klumb CE, Furtado DR, Resende LMM et al. DNA sequence profile of TP53 gene mutation in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. *Eur J Haematol* 2003; 71: 81-90.
 34. Martin A. Le gène suppresseur de tumeur p53 (2^a partie): applications en pathologie humaine. *Ann Pathol* 1995; 15 (3): 184-191.
 35. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular Abnormalities in chronic myeloid leukemia: Desregulation of cell Growth and apoptosis. *The Oncologist* 2000; 5: 405-415.
 36. Carvalho LO, Cavalcanti Junior GB, Andrade GV, Silva MLM, Pires V, Fernandez TS, Maia RC, Tabak DG. Chromosome 17 abnormalities and mutation of the p53 gene: correlation between cytogenetics analysis, flow cytometry and molecular analysis in three cases of chronic myeloid leukemia. *Gen Mol Bio* 2005; 28 (1): 40-43.
 37. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November, 1977. *Hematol J* 2000; 1 (1): 53-66.
 38. Tura S, Baccarini M, Corbelli G and Italian Cooperative Study Group. Staging of chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1981; 47: 105-119.
 39. Socal JE, Cox EB, Baccarini M et al and Italian Cooperative Study Group. Prognostic discrimination in "good risk" of chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; 63: 789-799.
 40. Barnett MJ, Eaves CJ. Chronic myeloid leukemia. in: Henderson ES; Lister TA; Greaves MF. *Leukemia*, cap 25, pag 535 - 553; 6^a edição, Editora WB Saunders, London, England; 1996
 41. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific p210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 1986; 233: 212-214.
 42. Foti A, Ahuja HG, Allen SL et al. Correlation between molecular and clinical events in the evolution of chronic myelocytic leukemia to blastic crisis. *Blood* 1991; 77 (11): 2441-2444.
 43. Foti A, Bar-Eli M, Ahuja HG, Cline MJ. A splicing mutation accounts for the lack of p53 gene expression in a CML blast crisis cell line: a novel mechanism of p53 gene inactivation. *Br J Haematol* 1990; 76 (1): 143-145.
 44. IARC TP53: <http://www.iarc.fr/p53> (acessado em maio de 2006).
 45. Cavalcanti Junior GB, Scheiner MAM, Vasconcelos FC, Dobbin JA, Klumb CE, Maia RC. Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot. *Rev Bras Canc* 2004; 50 (3): 191-202.
 46. American Type Culture Collection (ATCC): <http://www.atcc.org>. (acessado em maio de 2006).
 47. Henriques GS, Silva AGH, Hirata RDC, Hirata MHH, Cozzolino SMF. Transcrição reversa na determinação da expressão do mRNA para a enzima conversora da angiotensina testicular em animais tratados com zinco. *Rev Nutrição da PUCCAMP* 2005; 18 (6): 733-742.
 48. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-2770.
 49. Bassan BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991; 196: 80-83.
 50. Cavalcanti Júnior GB, Vasconcelos FC, Faria GP, et al. Co-expression of p53 protein and MDR functional phenotype in leukemias: The predominant association in chronic myeloid leukemia. *Cytometry* 2004; 61 (1): 1-8.
 51. Lane DP. p53 and human cancers. *Br Med Bull* 1994; 50 (3): 582-599.
 52. Ferreira CG, Talis C, Spain SW et al. Drug-induced apoptosis in lung cancer cells is not mediated by Fas/FasL (CD95/APO1) signaling pathway. *Clin C Research* 2000; 6: 203-212.
 53. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. Mutational inactivation of p53 gene in the human erithroid leukemic K562 cell line. *Leuk Research* 1993; 17 (12): 1045-1050.
 54. Cavalcanti Júnior GB. Relevância clínica e biológica das alterações do gene e da proteína p53 nas leucemias. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular 297p; Fundação Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro-RJ, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Geraldo Barroso Cavalcanti Jr.
Rua Praia do Alagamar, 2193
CEP. 59094-580 Natal - RN
E-mail: gbcjunior@hotmail.com



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas[®]

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

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

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

PRÊMIO CFF

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Conselho Federal de Farmácia - CFF é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC, com o patrocínio do Conselho Federal de Farmácia;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 5.000,00, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio Conselho Federal de Farmácia - CFF tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas de Farmacêuticos-bioquímicos na área de Citologia no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho de Farmacêutico-bioquímico sobre Citologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores Farmacêuticos-bioquímicos deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio CFF, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio CFF, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio do CFF é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio CFF, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio CFF

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • Rio de Janeiro • RJ • 20270-902

Bactérias Isoladas de Ponta de Cateter Venoso Central e Suscetibilidade Antimicrobiana em um Hospital Público de Belém-PA

Isolated Bacteria of Tip of Central Veined Catheter and Antimicrobial Susceptibility in a Public Hospital of Belém-PA

Mariniuza Alves Cardoso Melo¹; Rosana Cristiane da Silva Monteiro¹; Antonia Benedita Rodrigues Vieira²; Maria Angélica Bolini Brazão³ & José Maria dos Santos Vieira⁴

RESUMO - A presença do cateter venoso central (CVC) no organismo aumenta o risco de colonização de microrganismos podendo levar a disseminação microbiana principalmente em internados de Unidade de Terapia Intensiva. O objetivo do trabalho foi determinar os microrganismos mais freqüentes e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em ponta de CVC provenientes de pacientes do Hospital Pronto Socorro Municipal Dr. Humberto Maradei Pereira, Belém-PA, entre janeiro-2003 a dezembro-2004. Foram executadas 61 culturas e antibiogramas de pontas de CVC pelo método semiquantitativo de Maki. A identificação dos agentes e os testes de suscetibilidade seguiram metodologias convencionais e sistema automatizado ATB-Expression. Foram positivas 56(91,8%) culturas com prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* 26,8%, *Staphylococcus aureus* 21,4% e *Staphylococcus coagulase negativa*-SCN 16,1%. Os isolados de *P. aeruginosa* demonstraram maior sensibilidade para Colistina (100%), Fosfomicina (93,3%), Imipinem e Meropenem (80%) tendo resistência acima de 40% aos demais antimicrobianos testados. Foram encontradas cepas oxacilina-resistentes de 41,7% para *S. aureus* e 11,1% para *S. coagulase negativa* sendo todas sensíveis à Vancomicina. Isolados de *S. aureus* e SCN apresentaram sensibilidade acima de 70% à Nitrofurantoína, Vancomicina, Teicoplanina, Minociclina, Quinopristina-Dalfopristina e Ácido Fusídico tendo revelado elevada resistência para Clindamicina, Cotrimoxazol, Penicilina G, Eritromicina, Rifampicina, Norfloxacin e Tetraciclina.

PALAVRAS-CHAVE - cateter, suscetibilidade antimicrobiana, *P. aeruginosa*, ORSA.

SUMMARY - The presence of the central veined catheter in human organism increases the risk of colonization of microorganisms mainly in admitted patients the Intensive Care Unit. The objective of this assignment was to determine the most frequent microorganisms and the susceptibility profile to the antimicrobial in tip of veined catheter originating from patients who were admitted in "Hospital Pronto Socorro Municipal Dr. Humberto Maradei Pereira", Belém - PA, from January 2003 to December 2004. Sixty-one culture and antibiograms of catheter were analyzed to the semi quantitative method of Maki. The agent's identification and the susceptibility tests followed conventional methodologies and ATB - Expression authorized system. They were positive 56(91.8%) cultures with prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* 26.8%, *Staphylococcus aureus* 21.4% and *Staphylococcus coagulase negative*-SCN 16.1% The stumps of *P. aeruginosa* demonstrated a larger sensibility for Colistin (100%), Fosfomicin (93.3%), Imipenem (80%) and Meropenem (80%), there was a resistance of more than 40% in the other tested antimicrobial. Among the *Staphylococcus*, there were oxacilin-resistant stumps of 41.7% for *S. aureus* and 11.1% for *Staphylococcus negative coagulase*, but all of them were sensitive to vancomycin. The stumps of *S. aureus* and *Staphylococcus negative coagulase* presented sensibility above 70% to nitrofurantoin, vancomycin teicoplanin, minocyclin, quinopristin-dalfopristin and fusidic acid, which revealed high resistance (above 50%) to clindamicin, cotrimoxazol, penicillin G, erythromycin, rifampicin, norfloxacin and tetracyclin.

KEYWORDS - catheter, antimicrobial susceptibility, *P. aeruginosa*, ORSA.

INTRODUÇÃO

O uso do cateter vascular central (CVC) representou um grande avanço no diagnóstico e na terapêutica em medicina. Muitos procedimentos clínicos e cirúrgicos puderam ser realizados a partir do desenvolvimento desta tecnologia. Entretanto, com este advento, houve também uma grande e crescente preocupação com a infecção hospitalar, pois ao representar um acesso direto do meio exterior com o intravascular, funciona como corpo estranho, desencadeando muitas vezes um processo inflamatório no local de sua aplicação³.

O contato direto do CVC com a corrente sanguínea oferece um risco iminente de disseminação, principalmente de bactérias para o sangue, podendo desencadear posterior bacteremias ou até sepse. Quanto mais tempo o CVC permanecer no local de sua inserção, maiores são os riscos de contrair uma infecção¹⁵.

O CVC é um procedimento, embora invasivo, cada dia

mais freqüente e fundamental nos hospitais do mundo todo, pois muitos pacientes necessitam desse dispositivo para sua sobrevivência. Embora seja importante ressaltar que a maior parte das infecções da corrente sanguínea esteja associada a algum dispositivo intracelular, as principais causas das infecções decorrentes ao uso do CVC são a falta de orientação e de conscientização do pessoal de saúde sobre a identificação precoce dos fatores de risco²⁵.

Com o amplo uso de CVC, aumentou, proporcionalmente, a incidência de infecções nosocomiais, ocorrendo modificações na freqüência de microrganismos patogênicos. A microbiota contaminante tornou-se bastante variada, os microrganismos que antes eram raramente isolados, hoje são mais comuns nas infecções. Em estudos clínicos, se aceita como critério laboratorial para o diagnóstico de infecções relacionadas ao cateter, que uma contagem de bactérias igual ou superior a 15 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) é sugestiva de infecção e, inferior a este valor, seja colonização^{3,14}.

Recebido em 09/01/2006

Aprovado em 26/02/2007

¹Alunas do Curso de Especialização em Análises Clínicas/Depto. de Farmácia/CCS/UFGA; ²Departamento de Patologia/Centro de Ciências Biológicas/UFGA;

³Laboratório de Análises Clínicas Dra. Ruth Brazão-Belém-PA; ⁴Departamento de Farmácia/Centro de Ciências da Saúde/UFGA

Achados importantes ressaltam o isolamento de bactérias provenientes de sítios anatômicos do corpo humano, entre elas estão os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) que vem se destacando como o agente mais frequentemente encontrado^{9,15,25}.

O objetivo do trabalho foi determinar a microbiota bacteriana resultante de culturas positivas de ponta de cateter venoso central (CVC) no Hospital do Pronto Socorro Municipal Dr. Humberto Maradei Pereira (HPSMG), Belém-PA, durante o período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004 e traçar um perfil de suscetibilidade destas bactérias frente aos antimicrobianos de uso clínico.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo retrospectivo de 61 culturas de pontas de cateteres venosos centrais (CVC), obtidos por verificação de dados nos arquivos de registro de cultura do hospital e fichas de notificação da CCIH (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar), que integra o HPSMG, Belém-PA. Os arquivos apresentavam informações de culturas referentes aos pacientes hospitalizados nas unidades do HPSMG, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004, tais como: identificação do paciente, crescimento ou não de agente infeccioso, bactérias isoladas, resistência e sensibilidade antimicrobiana. As unidades do Hospital que tiveram ponta de CVC analisadas foram: Clínica Médica (MED), Clínica Cirúrgica (CIR), Clínica Pediátrica (PED), Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e Unidade de Recuperação (UR).

As pontas de CVC central foram enviadas ao Laboratório de Análises Clínicas Dra. Ruth Brazão para realização de cultura e antibiograma. Para o cultivo, foi utilizada a Técnica Semiquantitativa de Maki¹⁴ e após o período de incubação (24 a 48h/35°C), todas as placas foram avaliadas para o crescimento de microrganismos. Foram consideradas positivas as culturas que apresentaram contagem igual ou superior a 15 UFC. A identificação dos microrganismos isolados foi realizada através de provas bioquímicas convencionais e pelo sistema automatizado ATB Expression (Bio-Mérieux). Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela técnica de difusão em disco² e método de microdiluição automatizada ATB Expression (Bio-Mérieux). Foram testados os principais antimicrobianos padronizados e atualizados, sendo os resultados interpretados conforme os critérios recomendados pela *Clinical and laboratory Standards Institute*.

RESULTADOS

No período de janeiro-2003 a dezembro-2004, o HPSMG enviou 61 pontas de CVC ao Laboratório de Análises Clínicas Dra. Ruth Brazão para realização de cultura e antibiograma. Desse total, 56 (91,8%) apresentaram cultura positiva e 05 (8,2%) negativas (Fig. 1).

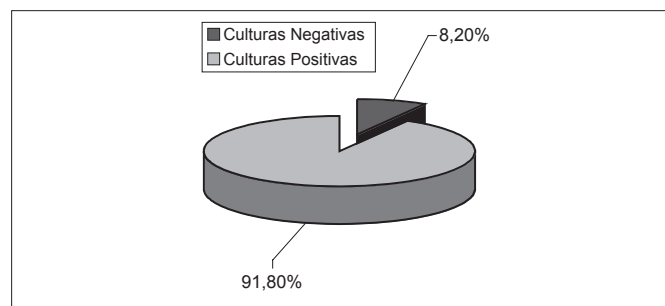


FIGURA 1 – Resultados das culturas de ponta de cateter venoso central de pacientes internados no HPSMG no período de janeiro-2003 a dezembro-2004.

As culturas positivas foram em maior ocorrência no sexo masculino (66,1%) (Fig. 2).

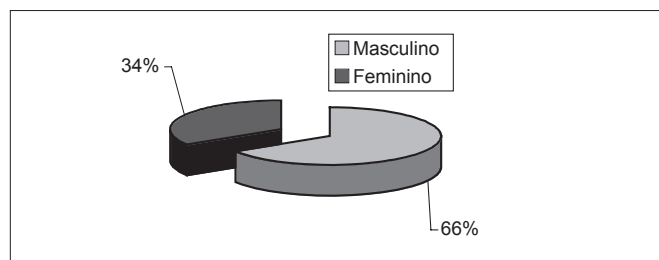


FIGURA 2 – Ocorrência de culturas positivas de ponta de cateter venoso central quanto ao sexo de pacientes internados no HPSMG no período de janeiro-2003 a dezembro-2004.

Em relação à procedência das amostras, foram obtidos 56 isolados sendo 36 (64,3%) provenientes da UTI, 15 (26,8%) da MED e 05 (8,9%) da CIR, não sendo observados culturas positivas nos sítios PED e UR (Fig. 3).

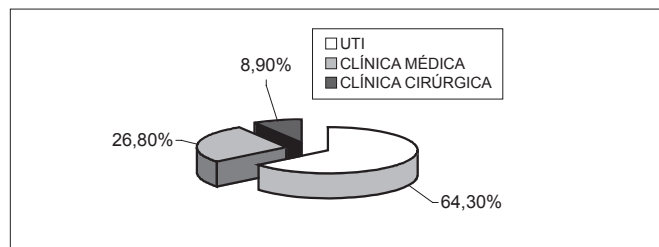


FIGURA 3 – Procedência de ponta de cateter venoso central com culturas positivas em sítios do HPSMG no período de janeiro-2003 a dezembro-2004.

De acordo com a Tabela 1, *Pseudomonas aeruginosa* (26,8%), seguidas de *Staphylococcus aureus* (21,4%) e *Staphylococcus* sp. coagulase negativa (16,0%), foram os microrganismos mais frequentemente observados.

Tabela 1

Microrganismos isolados de ponta de cateteres venosos centrais provenientes de pacientes internados no HPSMG no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004.

MICROORGANISMOS	ISOLADOS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15 (26,8%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 (21,4%)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativa	09 (16,0%)
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	06 (10,7%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	05 (8,9%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	02 (3,6%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	01 (1,8%)
<i>Enterobacter sakasaki</i>	01 (1,8%)
<i>Enterobacter freundii</i>	01 (1,8%)
<i>Candida albicans</i>	01 (1,8%)
<i>Alcaligenes</i> sp.	01 (1,8%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01 (1,8%)
<i>Proteus mirabilis</i>	01 (1,8%)
TOTAL	56 (100%)

Fonte: Arquivo de registro de culturas do hospital e fichas de notificação da CCIH (HPSMG, 2005).

A Tabela 2 mostra que as cepas de *P. aeruginosa* foram mais sensíveis para Colistina (100%), Fosfomicina (93,3%), Imipenem e Meropenem (80%) respectivamente. Frente a todos os demais antimicrobianos testados (Ticarcilina, Piperacilina+Tazobactam, Ampicilina+Sulbactam, Ticarcilina+Clavulanato, Ceftazidima, Cotrimoxazol, Piperacilina, Gentamicina e Netilmicina), estas cepas apresentaram resistência *in vitro* acima de 70%.

Tabela II
Perfil de suscetibilidade de 15 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de ponta de cateter central de pacientes internados no HPSMG no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004.

ANTIBIÓTICO	SENSIBILIDADE (%)	RESISTÊNCIA (%)
Colistina	100,0	0,0
Fosfomicina	93,3	6,7
Imipenem	80,0	20,0
Meropenem	80,0	20,0
Ciprofloxacina	40,0	60,0
Cefepima	26,7	73,3
Tobramicina	26,7	73,3
Amicacina	26,7	73,3
Cotrimoxazol	13,3	86,7
Piperacilina	13,3	86,7
Gentamicina	13,3	86,7
Netilmicina	13,3	86,7
Piperacilina+Tazo bactam	6,7	93,3
Ampicilina+Sulbactam	6,7	93,3
Ceftazidima	6,7	93,3
Ticarcilina+Clavulanato	6,7	93,3
Ticarcilina	0,0	100,0

Fonte: Arquivo de registro de culturas do hospital e fichas de notificação da CCIH (HPSMG, 2005).

Todos os isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* foram sensíveis à Vancomicina, Teicoplanina e Nitrofurantoína, sendo que houve uma taxa de 41,7% de cepas oxacilina-resistentes para *S. aureus* (ORSA) e 11,1% para *Staphylococcus coagulase negativa* (ORSCN). Para os antimicrobianos Penicilina G, Cotrimoxazol, Clindamicina, Eritromicina, Gentamicina, Rifampicina, Tetraciclina e Norfloxacina houve resistência acima de 50% (Tabela 3 e 4).

Tabela III
Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de ponta de cateter central de pacientes internados no HPSMG no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004.

ANTIBIÓTICO	SENSIBILIDADE (%)	RESISTÊNCIA (%)
Nitrofurantoína	100,0	0,0
Vancomicina	100,0	0,0
Teicoplanina	100,0	0,0
Minociclina	83,3	16,7
Quinopristina-Dalfopristina	75,0	25,0
Ácido Fusídico	75,0	25,0
Oxacilina	58,3	41,7
Rifampicina	41,7	58,3
Levofloxacina	33,3	66,7
Tetraciclina	25,0	75,0
Eritromicina	25,0	75,0
Clindamicina	25,0	75,0
Norfloxacina	16,7	83,3
Cotrimoxazol	16,7	83,3
Gentamicina	16,7	83,3
Penicilina G	8,3	91,7

Fonte: Arquivo de registro de culturas do hospital e fichas de notificação da CCIH (HPSMG, 2005).

Tabela IV
Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus coagulase negativa* isolados de ponta de cateter central de pacientes internados no HPSMG no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004.

ANTIBIÓTICO	SENSIBILIDADE (%)	RESISTÊNCIA (%)
Nitrofurantoína	100,0	0,00
Vancomicina	100,0	0,00
Teicoplanina	100,0	0,00
Oxacilina	88,9	11,1
Minociclina	77,8	22,2
Quinopristina-Dalfopristina	77,8	22,2
Ácido Fusídico	66,7	33,3
Norfloxacina	44,4	55,6
Tetraciclina	22,2	77,8
Rifampicina	22,2	77,8
Gentamicina	22,2	77,8
Penicilina G	11,1	88,9
Eritromicina	11,1	88,9
Cotrimoxazol	11,1	88,9
Clindamicina	11,1	88,9

Fonte: Arquivo de registro de culturas do hospital e fichas de notificação da CCIH (HPSMG, 2005).

DISCUSSÃO

Através da técnica semiquantitativa de Maki¹⁴, foi verificado que 91,8% das culturas de ponta de CVC foram positivas. Este valor foi mais alto do que os dados relatados na literatura consultada que mostraram valores entre 47 a 70%^{1,6,11,14,16,25}. No entanto, esta variabilidade nos valores pode ser atribuída às diferentes populações de pacientes estudados e às diversas indicações do uso de CVC²⁵.

Em relação ao sexo, foram registrados 66,1% de culturas positivas de ponta de CVC. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por alguns autores^{11,18,25}, embora sexo não esteja associado aos principais fatores de risco relacionados ao uso do CVC^{3,11,25,29}.

Considerando o sítio hospitalar, a UTI foi o ambiente onde mais ocorreram casos de culturas positivas de ponta de CVC (64,3%). Resultados semelhantes foram encontrados por alguns autores^{22,17}. A UTI é o ambiente hospitalar mais crítico, ocasionando presença de maior nível de resistência bacteriana, sendo responsável em boa parte pelas infecções nosocomiais devido a grande concentração de pacientes de alto risco, que dependendo de suas condições clínicas, favorecem o surgimento destas¹⁷.

P. aeruginosa foi a bactéria mais freqüente em pontas de CVC no HPSMG, sendo isolada em 26,8% das culturas que apresentaram crescimento bacteriano, seguida de *S. aureus* isolado em 21,4%. É importante ressaltar que a *P. aeruginosa* têm como habitat o trato gastrointestinal e, usualmente, colonizam instrumentos, recipientes e ambientes hospitalares úmidos. Além disso, são contaminantes de diversas soluções e infusões tornando-se importante patógeno de infecções nosocomiais^{1,3,6,13}.

Quanto a eficácia dos antimicrobianos, os isolados de *P. aeruginosa* mostraram que Colistina (100%), Fosfomicina (93,3%), Imipenem, Meropenem (80%), foram os mais eficazes. Resultados semelhantes foram reportados na literatura exceto em relação a Fosfomicina¹⁵. Entretanto é importante observar que microrganismos como a *P. aeruginosa* desenvolvem resistência a Fosfomicina rapidamente e, para retardar o surgimento da resistência, é indispensável utilizar este antimicrobiano em associação com outros antibióticos¹².

Em relação aos Carbapenems (Imipenem e Meropenem), *P. aeruginosa* apresentou taxas de resistência de 20%. Este microrganismo tem demonstrado resistência entre 15 a 35% à todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente no Brasil^{8,26}. Valores excedendo a 48% de resistência de *P. aeruginosa* à estes antimicrobianos já foram relatados no Brasil²⁵. Todos os isolados de *P. aeruginosa* desenvolveram resistência frente a Ticarcilina e acima de 60% em relação aos demais antimicrobianos. Estes dados podem estar condicionados ao uso extensivo destes antimicrobianos dentro do hospital e pelos fatores de risco relacionados ao uso do CVC^{19,25}. O *S. aureus* foi o segundo agente mais isolado. É importante destacar que este é um agente etiológico oriundo de infecções adquiridas tanto na comunidade quanto em hospitais, sendo considerado a espécie mais virulenta dos *Staphylococcus* sp., apresentando ampla gama de fatores que contribuem para essa virulência⁴.

Os resultados da Tabela 3 mostraram que 41,7% das cepas isoladas de *S. aureus* são resistentes à Oxacilina. A referida resistência, somada a outros fatores, vem favorecendo o aumento das infecções causadas por estes microrganismos, conhecidos como ORSA (*S. aureus* oxacilina-resistentes)⁴. Tais microrganismos são considerados como um dos principais agentes das infecções nosocomiais no Brasil, ocasionando morbidade, mortalidade e custos consideráveis, o que repre-

senta um sério problema para as instituições de saúde. Alta frequência de ORSA foi relatada também em outros trabalhos,^{7,11,25,27} mostrando que o controle da disseminação dessa bactéria nos hospitais exige a adoção de medidas específicas. Os antibióticos β -lactâmicos (ex: Oxacilina) devem ser de primeira escolha para o tratamento parenteral das infecções causadas por *S. aureus*, quando o mesmo é suscetível e, na ocorrência de cepas ORSA, a Vancomicina deverá ser a droga empregada. Porém, é importante observar se o *S. aureus* for suscetível aos β -lactâmicos, o uso indiscriminado do antibiótico Vancomicina selecionará cepas resistentes, apresentando maior índice de falha terapêutica do que a Oxacilina e menor poder para controlar a bacteremia em pacientes com endocardite¹⁰.

Vancomicina, Teicoplanina e Nitrofurantoína foram os antimicrobianos mais eficazes para *S. aureus* tendo ação sobre todos os isolados (Tabela 3). Os menos eficazes foram a Penicilina G, Cotrimoxazol, Nitrofurantoína e Gentamicina. Resultados semelhantes foram relatados no Brasil^{4,25}. *Staphylococcus sp. coagulase negativa* (SCN), embora sejam considerados contaminantes de diferentes materiais biológicos, obtidos de pacientes internados, apresentou neste estudo 16,1% de isolados, evidenciando que estes microrganismos apresentam importância crescente na etiologia das infecções relacionadas a cateter, como demonstrado por outros trabalhos que relataram, frequência de quase o dobro dos nossos resultados^{15,25}.

Vários pesquisadores observaram que os principais agentes Gram-positivos causadores de infecção relacionados a cateter são *S. aureus* e SCN e que estes são provenientes da pele do paciente, como microbiota da área de inserção do cateter, ou veiculados pela equipe de saúde^{6,3,21,22}. Porém, deve-se ressaltar que o método usualmente empregado para estudo requer a remoção da ponta do CVC para a realização de culturas e que somente 15 a 25% dos cateteres removidos por suspeita de infecção estão realmente infectados^{3,5,6}.

Quanto à ação dos antibióticos frente ao SCN isolados de CVC notou-se que todos os isolados foram sensíveis a Vancomicina, Teicoplanina e Nitrofurantoína e 88,9% à Oxacilina. Ocorreu alta resistência (88,9%) à Penicilina G, Eritromicina e Clindamicina. Dados semelhantes foram obtidos por outros autores no Brasil^{4,25}.

Frente a Norfloxacin, tanto os isolados de *S. aureus* quanto os de SCN apresentaram alta resistência (Tabela 3 e 4). A aquisição de resistência por parte desses microrganismos às quinolonas foi demonstrada por outros autores^{3,4,24}. Dentre os mecanismos que provoca esta resistência, o mais importante e mais frequente é decorrente da alteração do sítio de ação desses antimicrobianos (DNA girase) devido a mutação no gene *GyrA*²⁸.

A ocorrência de *S. aureus* foi maior que SCN, mas este último apresentou um superior perfil de sensibilidade à Oxacilina, revelando a importância da vigilância na sua suscetibilidade. Os SCN apesar de fazerem parte da microbiota normal da pele, vêm ganhando importância, estando relacionado ao aumento de morbidade em doentes internados em UTI e berçários de alto risco^{15,25}.

A alta frequência em culturas de ponta de CVC pode ser justificada por ser este patógeno um colonizante da pele, aderindo-se à superfície do cateter em aproximadamente 30 minutos e desenvolvendo microcolônias em 1 hora, com elevada colonização em 6 a 12 horas. Estas colônias vêm, eventualmente, cobertas por glicocálix — uma barreira aos antibióticos, neutrófilos fagócitos e macrófagos²³.

Os resultados do presente estudo revelam que a contaminação de CVC e a resistência bacteriana à antimicrobianos, continuam representando um sério problema de saúde pública, necessitando de medidas de vigilância eficazes para reduzir os índices de infecções nosocomiais no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Akan, O.A. Microorganisms isolated from eatheter tip cultures: Ibini Sina Hospital 2002. Am J Infect Control 25(3):113-118, 2003.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.N.N.; Sherris, G.Y.; Turk, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45:493-496, 1966.
- Beghetto, M.; Victorino, J.; Teixeira, L. Fatores de risco para infecção relacionada a cateter venoso central. Revista Brasileira de Terapia Intensiva 14 (3):107-113, 2002.
- Blatt, J.M.; Piazza, C.E. Perfil de sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* isolados em pacientes internados. Revista Brasileira de Análises Clínicas 36(2):129-131, 2004.
- Bone, R.B.; Grodzin, C.G.; Balk, R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of disease process. The cadriopulmonary and Critical Care Journale 112:1644-1655, 1992.
- Filippin, T.B.; Nunes F.B.; Castaman, T.A.; Santos, R.C.V.; Alves Filho, J.C.F.; Oliveira, J.R. Sepse relacionada ao uso de cateter intravascular. Revista Brasileira de Análises Clínicas 34(4):197-199, 2002.
- Frebourg, N.B.; Cauliez, B.; Lemeland, J.F. et al. Evidence for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococci* colonizing intravascular devices. J. Clin. Microbiol. 37:1182-1185, 1999.
- Gales, A.C.; Jones, R.N.; Turnidge, J.; Rennie, R.; Amphal, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global. SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin. Infect. Dis. 32 (Suppl. 2):S146-S155, 2001.
- Garret, D.; Jochimsen, E.; Murfitt, K. et al. The emergence of decreased susceptibility to Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. Infect. J. Méd. 20:167-170, 1999.
- Guia para tratamento de infecções relacionadas aos cateteres vasculares. [on line] [acesso em 18/03/2005] Disponível em http://www.ccih.med.br/guia_vascular.
- Hanberger, H.; Diekema, D.; Fluit, A. et al. Surveillance of antibiotic resistance in european ICUs. J. Hosp.Infect. 48:161-176, 2001.
- Korolkovas, A.; Albuquerque, F.F.; França, C. Dicionário Terapêutico Guanabara/ Colaborador Bruno Carlos de Almeida Cunha- Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2002.
- Mah, T.F. & O'Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 9(1):34-39, 2001.
- Maki, D.G.; Weise, C.P.E.; Sarafin, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter infection. N. Engl. J. Méd. 296(23):1305-1309, 1977.
- Menezes, E.A.; Favali, C.B.F.; Cunha, F.A.; Salviano, M.N.C.; Ângelo, M.R.F. Caracterização bacteriana em culturas de ponta de cateter no hospital geral de Fortaleza. Revista Brasileira de Análises Clínicas 34(3):151-154, 2002.
- Mermel, L.A. & ScM, A.M. Prevention of intravascular catheter-related infections. Ann. Intern. Med. 132(5):391-402, 2000.
- Moraes, A.A.P. & Santos, R.L.D. Infecções em UTI Geral de um Hospital Universitário. Revista Brasileira de Terapia Intensiva 15(4):135-141, 2003.
- Moro, M.I.; Viganò, E.F.; Cozzi, A. Central venous catheter-related infections study group. Risk factors for central venous catheter-related infections in surgical and intensive care units. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 15:253-264, 1994.
- Mutnick AH, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial usage and resistance trend relationships from the MYSTIC Programme in North America (1999-2001). Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53(2):290-296, 2004.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. document M2-A8. Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992- June 2001. Am. J. Infect. Control. 29: 404-421, 2001.
- O'Grady, N.P.; Alexander, M.; Dellinger, E.P.; Gerberding, J.L.; Heard, S.; Maki, D.G.; Masur, H.; McCormick, R.D.; Mermel, L.; Pearson, M.I.; Raad, I.I.; Randolph, A. Weinstein RA. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Controls and Prevention (CDC)- Related Infections. Centers for Disease Controls and Prevention (CDC)- Related Infections- Recommendations and Report. 51 (RR10): 1-26, 2002. Disponível em : <http://65.54.246.250/cgi-bin/>. Acesso em 29 mar. 2004.
- Peters, G.; Loui, R.; Pulverer, G. Adherence and growth of coagulase-negative *Staphylococci* on surface of intravenous catheters. J. Infect. Dis. 146:479, 1982.
- Peterson, L.R.; Quick, J.N.; Jensen, B. Emergence of ciprofloxacin resistance in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Arch. Intern. Med. 150(2):151-5, 1990.
- Quesada, R.M.B.; Carrara, F.E.; Ross, C.; Calixto, L.A.; Rogeri, L.M.S.; Pelayo, J.S. Culturas de ponta de cateteres venosos centrais e perfil de resistência aos antimicrobianos de uso clínico. Revista Brasileira de Análises Clínicas 37(1): 45-48, 2005.
- Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes, R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R.N. Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Braz. J. Infect. Dis. 5:200-214, 2001.
- Sadoyama, G.; Gontijo Filho, P.P. Colonizações do sítio de inserção e da ponta do cateter vascular central: Experiência de 96 pacientes no hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. NewsLab 54:160-168, 2002.
- Trucksis, M.; Wolfson, J.S.; Hooper, D.C. A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 173:5854-60, 1991.
- Urrea, M.; Iriando, M.; Thio, M.; Krauel, X.; Serra, M.; La Torre, C.; Jiménez, R. A prospective incidence study of nosocomial infection in a neonatal care unit. Am. J. Infect. Control. 31(8):505-507, 2003.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira
 Depto. de Farmácia-Universidade Federal do Pará
 Av. Augusto Corrêa, 1 – Campus do Guamá
 CEP. 66075-110 Belém - PA
 Fone: 3201-7201
 e-mail: jmvieira@ufpa.br

Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA

Antibiotic susceptibility antimicrobial of uropathogens isolated from culture of patients with urinary tract infections from the University Hospital Bettina Ferro de Souza, Belém-PA

José Maria dos Santos Vieira¹; Rosa Márcia Corrêa Saraiva¹; Lúcia Carla de Vasconcelos Mendonça¹; Viviane Oliveira Fernandes²; Milene Regina de Carvalho Pinto²; Antonia Benedita Rodrigues Vieira³

RESUMO - As infecções do trato urinário (ITU) são causadas na maioria das vezes por bactérias da microbiota intestinal e os agentes antimicrobianos apresentam um papel importante no tratamento e prevenção destas infecções. Visando conhecer o perfil de suscetibilidade de bactérias causadoras de ITU em pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS), foram analisados os resultados de 919 uroculturas. A identificação das bactérias foi realizada por métodos bioquímicos tradicionais e o antibiograma pelo método de disco-difusão. Foram positivas 208(22,6%) uroculturas. Houve maior frequência de ITU em mulheres (78,9%) e em adultos (47,6%). *Escherichia coli* (69,8%), *Enterobacter* sp (7,2%) e *Klebsiella* sp (5,8%) foram as bactérias Gram-negativas-GN mais isoladas. Entre as Gram-positivas-GP, *Staphylococcus coagulase negativa*-SCN (4,8%) e *S. saprophyticus* (2,9%) foram as mais prevalentes. As bactérias GN demonstraram elevada resistência aos antibióticos ampicilina (69%), amicacina (67,4%); sulfametaxazol-trimetropina (61,5%) e alta sensibilidade à cefotaxima (92,5%), ceftazidima (89,8%), ciprofloxacina (88,8%) e gentamicina (86,1%). Os cocos GP demonstraram boa sensibilidade apenas à oxacilina (90%) e ciprofloxacina (80%), apresentando resistência acima de 50% aos demais antibióticos testados. Os resultados reforçam a necessidade do conhecimento do perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias causadoras de ITU, para evitar o uso incorreto de antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE - Infecção do trato urinário; resistência bacteriana; antibiograma; antibióticos.

SUMMARY - The major cause of tract infections (UTIs) are bacteria from the intestinal microbiota, and the antibiotic therapy is the mainstay of treatment and prevention of these infections. To establish the profile of bacteria susceptibility in patients with UTI from the University Hospital Bettina Ferro de Souza (HUBFS), 919 urine samples were cultured and assessed their susceptibility, to common antibiotics. Uropathogens identification was done by traditional biochemical methods and antibiogram was determined by the disk-diffusion method. 208(22.6%) urine cultures were positive. There was higher UTI frequency in women (78.9%) and adults (47.6%). *Escherichia coli* (69.8%), *Enterobacter* sp (7.2%) and *Klebsiella* sp (5.8%) were the most frequently isolated Gram-negatives (GN) bacteria. Coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) (4.8%) and *S. saprophyticus* (2.9%) were the most prevalent among the Gram-positive (GP) bacteria. GN bacteria demonstrated high resistance to ampicillin (69%), ampicillin (67.4%); sulfamethoxazole-trimethoprim (61.5%) and high sensibility only for oxacillin (90%) and ciprofloxacin (80%), with resistance higher than the other tested antibiotics. The results sustain the need to establish a better knowledge of the antibiotic susceptibility profile of the bacteria that cause UTIs to avoid the abusive use of antibiotics.

KEYWORDS - urinary tract infection; uropathogens; resistance bacterian; antibiogram; antibiotics.

INTRODUÇÃO

Infecção do trato urinário (ITU) caracteriza-se pela presença de microrganismos que se multiplicam nas vias urinárias, constituídas pelos rins, ureteres, bexiga e uretra¹³. É um dos processos infecciosos mais comuns que acomete homens e mulheres, em qualquer idade, apresentando, entretanto, maior frequência no sexo feminino e em adultos⁴. Cerca de 10 a 20% das mulheres contraem ITU em alguma época da sua vida, sendo que dentre estas, 25 a 30% apresentam recidivas^{1,11}. Em crianças ao atingir os rins pode deixar seqüelas, denominada cicatriz renal⁹. A ITU representa o principal tipo de infecção hospitalar e é uma das mais freqüentes causas de consulta na prática médica, com cerca de 40% do total das infecções adquiridas em hospitais e, em custo, 14% do valor total despendido com as infecções nosocomiais¹⁶. A etiologia das ITU tem sido analisada e estabelecida de forma razoavelmente consistente. A grande maioria das ITU é causada por enterobactérias, mas também podem ser provocadas por outros microrganismos. *E. coli* permanece

o uropatógeno predominantemente isolado de infecções agudas comunitárias não complicadas. *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Proteus*, com menor frequência, causam cistite e pielonefrite sem complicações^{4,8}.

O objetivo do trabalho foi realizar um estudo da prevalência de bactérias isoladas de ITU em pacientes do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS), Belém-PA, e traçar o perfil de suscetibilidade destas bactérias frente aos antimicrobianos, visando auxiliar o controle desta infecção e minimizar o uso incorreto de antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados obtidos foram coletados, retrospectivamente, nos arquivos do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará (LAC/DEFAR/UFGA). Foram estudadas 919 uroculturas realizadas no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004 de pacientes atendidos e tratados no HUBFS.

As amostras de urina foram coletadas, em frascos esterilizados, após anti-sepsia do meato geniturinário e semeadas

Recebido em 29/01/2006
Aprovado em 25/02/2007

¹Departamento de Farmácia/Centro de Ciências da Saúde/UFGA Departamento de Farmácia/Centro de Ciências da Saúde/UFGA; ²Alunas do Curso de Especialização em Análises Clínicas do Depto. de Farmácia/CCS/UFGA Alunas do Curso de Especialização em Análises Clínicas do Depto. de Farmácia/CCS/UFGA; ³Departamento de Patologia/Centro de Ciências da Biológicas/UFGA

em meio Maconkey (MERCK) e CLED (MERCK) e incubados a 37°C por 24 horas. A identificação das bactérias GN foi realizada através de provas bioquímicas tradicionais e a dos cocos GP através da prova da coagulase e da sensibilidade ao disco de novobiocina¹⁴. Foram consideradas culturas positivas, aquelas apresentando contagem de colônias igual ou superior a 10⁵ UFC/mL no meio CLED, utilizando alça calibrada de 0,001 mL. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo método de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton segundo os critérios recomendados pelo CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.

Para as bactérias GN, foram testados os antibióticos: Amicacina; Ampicilina; Cefalotina; Cefotaxima; Cefoxitina; Ceftazidima; Ciprofloxacina; Gentamicina; Nitrofurantoína; Norfloxacin; Tobramicina e Sulfametoxazol-Trimetropina. Para as GP, foram utilizados: Ciprofloxacina; Cloranfenicol; Clindamicina; Eritromicina; Gentamicina; Nitrofurantoína; Penicilina; Rifampicina; Oxacilina; Tetraciclina e Sulfametoxazol-Trimetropina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004, foram realizadas no LAC/DEFAR/UFPA, 919 uroculturas de pacientes atendidos no HUBFS. Dentre estas, 711 (77,4%) foram negativas e apenas 208 (22,6%) foram positivas (Fig. 1), isto é, apresentaram contagem de colônias acima de 10⁵ UFC/mL de urina. Em virtude da alta frequência de uroculturas negativas normalmente relatadas na literatura, é recomendada a utilização do exame do sedimento urinário e da bacterioscopia pelo Gram como exames de triagem laboratorial visando a redução dos custos para o sistema de saúde, já que é elevada a solicitação de uroculturas¹⁸.

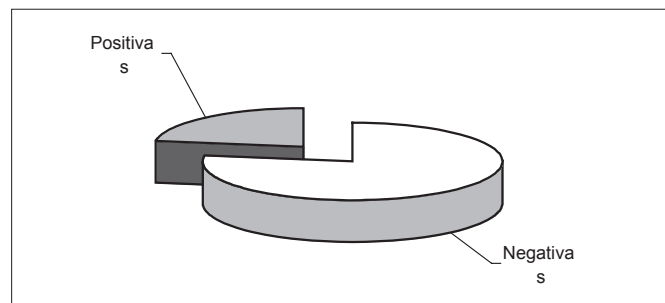


Figura 1 – Resultados de 919 uroculturas realizadas no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA, no período de janeiro 2002 a dezembro de 2004.

De acordo com a Tabela 1, dentre as 208 uroculturas positivas, a bactéria de maior prevalência, causando ITU nos pacientes, foi *E. coli* com 69,8% dos casos, seguida de *Enterobacter* sp 7,2% e *Klebsiella* sp 5,8%. De fato, as bactérias GN do trato normal do intestino são as que mais provocam ITU e entre estas a *E. coli* é citada como predominante em vários trabalhos que relataram tanto infecções com cepas da comunidade como do ambiente hospitalar^{2,8,20}. Entre as bactérias GP, *Staphylococcus* CN (4,8%) e *S. saprophyticus* (2,9%) foram as mais frequentes. O isolamento de SCN em material clínico deve ser avaliado, pois estas bactérias apesar de fazerem parte da microbiota normal da pele, vêm sendo relacionadas ao aumento de morbidade em doentes de alto risco internados em UTI e berçários^{17,7}.

A maioria dos pacientes com ITU foi do sexo feminino, representando 78,9% dos pacientes, enquanto que apenas 21,1% foram do sexo masculino (Tabela 1). As infecções urinárias são mais frequentes em mulheres pelo motivo destas apresentarem uma uretra curta e facilmente atingível pelas bactérias da região perianal, sendo, portanto, menos eficazes em deter a infecção⁵.

E. coli também foi a bactéria mais prevalente tanto no sexo feminino como no masculino. *E. coli*, *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp, SCN, *Proteus* sp, *Citrobacter* sp e *S. aureus* foram encontradas nos dois sexos. *Alcaligenes* sp foi isolada somente em mulheres, por outro lado, *Edwardsiella* sp e *P. aeruginosa* apenas em homens (Tabela 1). Estes dados sugerem que as infecções urinárias provocadas por bactérias GN, não obedecem a um mesmo padrão nos dois sexos.

Tabela I
Bactérias isoladas de urina de pacientes com ITU, de acordo com o sexo, no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA, no período de janeiro 2002 a dezembro de 2004.

BACTÉRIA	FEMININO	MASCULINO	TOTAL
<i>Escherichia coli</i>	126 (60,6%)	19 (9,2%)	145 (69,8%)
<i>Enterobacter</i> sp.	9 (4,3%)	6 (2,9%)	15 (7,2%)
<i>Klebsiella</i> sp.	9 (4,3%)	3 (1,5%)	12 (5,8%)
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	8 (3,8%)	2 (1,0%)	10 (4,8%)
<i>Proteus</i> sp.	3 (1,5%)	4 (1,9%)	7 (3,4%)
<i>S. saprophyticus</i>	2 (1,0%)	4 (1,9%)	6 (2,9%)
<i>Citrobacter</i> sp.	2 (1,0%)	3 (1,4%)	5 (2,4%)
<i>S. aureus</i>	3 (1,4%)	1 (0,5%)	4 (1,9%)
<i>Alcaligenes</i> sp.	2 (1,0%)	0 (0%)	2 (1,0%)
<i>Edwardsiella</i> sp.	0 (0%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (0%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)
TOTAL	164 (78,9%)	44 (21,1%)	208 (100%)

A Tabela 2 revela que os pacientes mais acometidos com ITU eram adultos (35,5%). Entre os idosos, apesar da frequência mais baixa (14,1%), foi encontrado um maior número de espécies bacterianas (*E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Alcaligenes*, *Edwardsiella*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* e outros SCN). Pacientes idosos podem apresentar uma etiologia bacteriana bastante variada, principalmente os hospitalizados^{8,13}. As crianças apresentaram 20,2% de uroculturas positivas. A ITU é frequente nesta faixa de idade, com a apresentação clínica variando de bacteriúria assintomática a pielonefrite aguda, o que representa potencial risco de bacteremia e instalações de lesões renais irreversíveis⁸.

Tabela II
Bactérias isoladas de urina de pacientes com ITU, de acordo com a idade, no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA, no período de janeiro 2002 a dezembro de 2004.

BACTÉRIA	CRIANÇA	ADULTO	IDOSO	TOTAL
<i>Escherichia coli</i>	42 (20,2%)	74 (35,5%)	29 (14,1%)	145 (69,8%)
<i>Enterobacter</i> sp.	2 (1%)	7 (3,4%)	6 (2,8%)	15 (7,2%)
<i>Klebsiella</i> sp.	7 (3,4%)	3 (1,4%)	2 (1,0%)	12 (5,8%)
<i>Staphylococcus</i> coag. Neg.	3 (1,4%)	5 (2,4%)	2 (1,0%)	10 (4,8%)
<i>Proteus</i> sp.	2 (1,0%)	4 (1,9%)	1 (0,5%)	7 (3,4%)
<i>S. saprophyticus</i>	0	2 (1,0%)	4 (1,9%)	6 (2,9%)
<i>Citrobacter</i> sp.	2 (1,0%)	0	3 (1,4%)	5 (2,4%)
<i>S. aureus</i>	0	2 (1,0%)	2 (0,9%)	4 (1,9%)
<i>Alcaligenes</i> sp.	0	0	2 (1,0%)	2 (1,0%)
<i>Edwardsiella</i> sp.	0	0	1 (0,4%)	1 (0,4%)
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	1 (0,4%)	1 (0,4%)
TOTAL	59 (28,5%)	99 (47,6%)	50 (23,9%)	208 (100%)

A Tabela 3 mostra que os isolados de enterobactérias apresentaram boa sensibilidade a vários antibióticos: Cefotaxima (92,5%), Ceftazidima (89,8%), Ciprofloxacina (88,8%), Gentamicina (86,1%), Norfloxacin (77%), Cefalotina (76,4%) e Nitrofurantoína (74,3%). Entretanto, houve elevada resistência frente a Ampicilina (69%), Amicacina (67,4%) e Sulfametaxazol-trimetropina (61,5%), antibióticos muito utilizados na terapia empírica de ITU não complicada. O sulfametaxazol-trimetropim é recomendado para o tratamento empírico de ITU apenas em regiões onde a resistência dos microrganismos frente a esta droga, não ultrapasse 10-20%¹⁹.

Tabela III
Suscetibilidade antimicrobiana de 187 amostras de Enterobactérias isoladas da urina de pacientes com ITU, no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA, no período de janeiro 2002 a dezembro de 2004.

ANTIBIÓTICO	SENSÍVEL	RESISTENTE
Cefotaxima	173 (92,5%)	14 (7,5%)
Ceftazidima	168 (89,8%)	19 (10,2%)
Ciprofloxacina	166 (88,8%)	21 (11,2%)
Gentamicina	161 (86,1%)	26 (13,9%)
Norfloxacin	144 (77,0%)	43 (23,0%)
Cefalotina	143 (76,4%)	44 (23,6%)
Nitrofurantoína	139 (74,3%)	48 (25,7%)
Tobramicina	128 (68,4%)	59 (31,6%)
Cefoxitina	127 (67,9%)	60 (32,1%)
Sulfametaxazol-Trimetropina	72 (38,5%)	115 (61,5%)
Amicacina	61 (32,6%)	126 (67,4%)
Ampicilina	58 (31,0%)	129 (69,0%)

De acordo com a tabela 4, os isolados de cocos gram-positivos demonstraram boa sensibilidade apenas para oxacilina (90%) e ciprofloxacina (80%) e uma elevada resistência (acima de 50%) para os demais antibióticos testados. Trabalhos têm demonstrado o desenvolvimento de resistência múltipla por isolados de *S. aureus* oxacilina resistente (ORSA) e *Staphylococcus coagulase negativa* oxacilina resistentes (ORSCN) frente a outros grupos de antimicrobianos como eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina e sulfametaxazol-trimetropina, o que dificulta o tratamento e o controle das ITU provocadas por estas bactérias^{3,15}. Estes resultados demonstraram ser recomendável rever os antibióticos que tenham eficácia em ITU, principalmente as causadas por cocos gram-positivos.

Tabela IV
Suscetibilidade antimicrobiana de 187 amostras de Enterobactérias isoladas da urina de pacientes com ITU, no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA, no período de janeiro 2002 a dezembro de 2004.

ANTIBIÓTICO	SENSÍVEL	RESISTENTE
Oxacilina	18 (90,0%)	2 (10,0%)
Ciprofloxacina	16 (80,0%)	4 (20,0%)
Rifampicina	9 (45,0%)	11 (55,0%)
Gentamicina	8 (40,0%)	12 (60,0%)
Tetraciclina	8 (40,0%)	12 (60,0%)
Sulfamet.-Trimetropim	7 (35,0%)	13 (65,0%)
Cloranfenicol	5 (25,5%)	15 (75%)
Eritromicina	4 (20,00%)	16 (80,0%)
Penicilina	4 (20,0%)	16 (80,0%)
Nitrofurantoína	3 (15,0%)	17 (75,0%)
Clindamicina	2 (10,0%)	18 (90,0%)

A resistência a vários antibióticos por bactérias isoladas de pacientes com ITU têm sido frequentemente descrita^{2,6,8,12,17,23}. Em vista disso, é de grande importância o conhecimento do perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias causadoras de ITU, para o correto tratamento da infecção. O uso incorreto de antibióticos no tratamento das ITU, principalmente de origem hospitalar, pode levar a uma piora da infecção e favorecer o aparecimento de cepas bacterianas resistentes. É necessário desestimular o uso indiscriminado e por automedicação de antibióticos nas ITU, procurando orientar a equipe médica e a população para os riscos deste ato.

REFERÊNCIAS

- Andriolo, A. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar: Medicina Laboratorial. 1a. Edição. São Paulo, Manole, 2005.
- Bezerra, M.I.; Fernandes, T.A.; Bezerra, C.M.; Ottaviani, G.P. Estudo da prevalência dos agentes bacterianos isolados em uroculturas realizadas no Laboratório do Esquadrão de Saúde da Base Aérea de Natal. RBAC (Suplemento), 36(2): 1B, 2004.
- Blatt, J.M. & Piazza, C.E. Perfil de sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* isolados em pacientes internados. RBAC, 36(2): 129-131, 2004.
- Chaves, J.M.; Menezes, E.A.; Moreira, A.A.; Cunha, F.A.; Carvalho, T.M.J.P. Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos utilizados em infecções urinárias de pacientes do Hospital de Referência São Lucas da Cidade de Crateús-Ceará. Infarma, v. 15, n.1-2, p. 9-10, 2003.
- Daza, R.; Gutierrez, J.; Piedrola, G. Antibiotic Susceptibility of Bacterial Strain Isolated from Patie with Community-Acquired Urinary Trac Infections. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?SUBMIT=Y. Acesso em 06 ago., 2005.
- Ferrugem, F.; Souza, F.V.; Menchen, A.E.; Oliveira, C.F.; Bender, E.A.; Schuster, A.P. et al. Prevalência de microrganismos e perfil de sensibilidade em amostras de uroculturas ambulatoriais na Região de Santa Cruz do Sul-Rio Grande do Sul. RBAC (Suplemento), 36(2):61B, 2004.
- Garret, D.O.; Jochimelson, E.; Murfitt, K. et al. The emergence of decreased susceptibility to vancomicina in *Staphylococcus epidermidis*. Infection Journal of Medicine, 20:167-170, 1999.
- Grude, N.; Tveten, Y.; Kristiansen, B.E. Urinary Tract Infections in Norway: Bacterial Etiology and Susceptibility. A Retrospective Study of Clinical Isolates. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?SUBMIT=Y. Acesso em 06 ago., 2005.
- Maragani, D.; Rappanini, C.; Meurer, B. Infecções do Trato Urinário. In: Schechter, M.; Maragani, D. (eds.). Doenças Infecciosas: Conduta Diagnóstica e Terapêutica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1998, p. 425-55.
- Menezes, E.A.; Silveira, L.A.; Cunha, F.A.; Cavalcante, M.S.; Teixeira, A.B.; Oliveira, I.R.N.; Salviano, M.N.C. Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Pseudomonas* isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. RBAC, vol. 35, n.4, p. 177-180, 2003.
- Mims, C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Wakelin, D.; Williams, R. Microbiologia Médica, 2ª edição, São Paulo, Manole, 2002, 584p.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. document M2-A8. Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- Nicolle, L.E. Urinary Tract Infection: Traditional Pharmacologic Therapies. Disponível em: www.medline.com.br. Acesso em 06 ago., 2005.
- Oplustil, C.P.; Zoccoli, C.M.; Tobouti, N.R.; Sinto, S.I. Microbiologia Clínica. 2a. Edição, São Paulo, Sarvier, 2004.
- Sader, H. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospital: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. BJID, 5(4):201-213, 2001.
- Sobel, J.D.; Kauffman, C.A.; McKinsey, D. et al. Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. Clin. Infect. Dis. 30: 19-24, 2000.
- Tenover, F.C.; Lancaster, M.V.; Hill, B. et al. Characterization of *Staphylococcus* with reduced susceptibilities to vancomicina and others glycopeptides. J. Clin. Microb. 36(4): 1020-1027, 1998.
- Treiting, A.; Costa, A. S.; Cataneo, D.H.; Dacol, F. A otimização dos procedimentos laboratoriais para o diagnóstico das infecções do trato urinário. RBAC (Suplemento), 36(2): 1B, 2004.
- Warren, J. W.; Abrutyn, E.; Hebel, J.R.; Johnson, J.R.; Schaetter, A.J.; Stamm, W.E. guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Clin. Infect. Dis. 29: 745-758, 1999.
- Zielbell, A. et al. Perfil da suscetibilidade dos antimicrobianos mais utilizados no tratamento das infecções urinárias de pacientes do Laboratório Exame de Barra do Garças-MT. RBAC, v.36, n.2, p.71B, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira
Departamento de Farmácia-UFPA
Av. Augusto Corrêa, 01 – Campus do Guamá
CEP. 66075-110 Belém - PA
E-mail: jmvieira@ufpa.br

PRÊMIO PNCQ

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio PNCQ é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio do Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O "Prêmio PNCQ" tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Controle de Qualidade no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho sobre controle de qualidade inscrito e apresentado na sessão de Temas Livres dos CBAC, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e keywords (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio PNCQ, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio PNCQ, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio PNCQ é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio PNCQ obrigatoriamente, deve ser apresentado em sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio PNCQ

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença

Cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis, treatment and disease prevention

Núbia Margani Wolschick¹, Marcia Edilaine Lopes Consolaro², Linda Emiko Suzuki² & Cinthia Gandolfi Boer²

RESUMO - O câncer do colo uterino é conhecido como uma das causas mais freqüentes de óbito na população feminina em todo o mundo: são estimados 500.000 novos casos da doença por ano. Estudos epidemiológicos têm mostrado forte associação entre a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), doença viral sexualmente transmissível mais comum, e o câncer de colo uterino. Tipos de HPV de baixo risco (exemplo, 6 e 11) são os agentes causadores das verrugas genitais, enquanto que os tipos de alto risco (exemplo, 16 e 18) estão diretamente ligados ao câncer. Recentes avanços têm levado a um melhor entendimento de como o HPV causa câncer a nível molecular e da resposta imunológica ao vírus. Nesta revisão, são discutidos aspectos da infecção com tipos oncogênicos de HPV, novas estratégias de rastreamento utilizando testes moleculares e outros métodos como adjuvantes à citologia, bem como o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas como uma alternativa na prevenção do carcinoma cervical e suas lesões precursoras.

PALAVRAS-CHAVE - Câncer do colo uterino; papilomavírus humano; diagnóstico molecular; terapias alternativas.

SUMMARY - Worldwide, the cervical cancer is known as one of the most frequent cause of death in female population: each year, an estimated 500,000 cases are newly diagnosed. Epidemiologic studies have shown strong association of human papillomavirus (HPV) infection, the most common sexually transmitted viral disease, with cervical cancer. Low-risk types of HPV (eg, 6 and 11) are the causative agents of genital warts, whereas high-risk types (eg, 16 and 18) have been connected with cervical cancer. Recent advances have led to a better understanding of how HPV causes cancer on a molecular level and of the immunologic response to HPV. This paper reviews important aspects of infection with oncogenic HPV types, new strategies incorporating molecular testing and other methods as adjunct to cytology, as well as the development of prophylactic and therapeutic vaccines as an alternative for preventing cervical cancer and precursor lesions.

KEYWORDS - Cervical cancer; human papillomavirus; molecular diagnosis; alternative therapy.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino ainda é um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, pois apresenta altas taxas de prevalência e mortalidade em mulheres de nível social e econômico baixo e em fase produtiva de suas vidas. Estas mulheres, uma vez doentes, ocupam leitos hospitalares, o que compromete seu papel no mercado de trabalho, privando-as do convívio familiar e acarretando um prejuízo social considerável⁷. São estimados 500.000 novos casos da doença por ano, dos quais 79% ocorrem nos países em desenvolvimento^{8, 16, 39}. No Brasil, a estimativa em 2006 foi de 19.260 novos casos. Sem considerar os tumores de pele não-melanomas, o câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte, o segundo tumor mais incidente nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste e o terceiro mais freqüente na região Sudeste²¹.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado a associação entre o papilomavírus humano (HPV) e o câncer de colo uterino. O HPV está implicado em 99,7% dos casos de carcinoma cervical no mundo todo⁸. Mais de 200 tipos de HPV foram identificados através da análise da sequência de DNA, e 85 genótipos do HPV foram bem caracterizados até agora. Estes diferentes tipos virais variam no seu tropismo tecidual, associações com diferentes lesões e potencial oncogênico²³. Cerca de 35 tipos diferentes de HPV infectam o trato genital, e pelo menos 20 destes estão associados ao câncer de colo do útero¹⁸. Os HPVs genitais podem infectar o epitélio escamoso e as membranas mucosas da cérvice, da vagina, da vulva, do pênis e da região perianal, podendo induzir ao aparecimento de verrugas anogenitais (condiloma acuminado), lesões intra-epiteliais

escamosas pré-cancerosas ou cânceres⁸.

O câncer de colo uterino desenvolve-se a partir de lesões precursoras denominadas lesões intra-epiteliais escamosas (SIL – *squamous intra-epithelial lesions*), classificadas como de alto ou baixo grau, dependendo do nível de ruptura da diferenciação epitelial. A produção viral ocorre nas lesões de baixo grau, estando restrita às células basais. Nos carcinomas, o DNA viral está integrado ao genoma da célula hospedeira, e nenhuma produção viral é observada³⁷. As lesões decorrentes da infecção pelo HPV geralmente provocam alterações morfológicas características, detectáveis pela citologia dos raspados cérvico-vaginais. O exame citopatológico de Papanicolaou tem sido recomendado como método de rastreamento de grandes populações, a fim de detectar lesões pré-malignas e malignas²². A nomenclatura para emissão de laudos citopatológicos aceita atualmente no mundo todo é o Sistema Bethesda 2001⁴². Este sistema classifica as anormalidades de células epiteliais escamosas em quatro categorias: (1) Células escamosas atípicas (ASC); (2) Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL); (3) Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL); e (4) Carcinoma de células escamosas. A categoria ASC contém duas subcategorias: ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado), que se refere às alterações sugestivas tanto de LSIL como de SIL de grau indeterminado, e ASC-H (células escamosas atípicas, não é possível excluir uma HSIL), cuja designação é reservada para a minoria dos casos de ASC onde as alterações citológicas são sugestivas de HSIL. As lesões de baixo grau (LSIL) abrangem as alterações celulares causadas pelo HPV (coilocitose) e uma displasia leve ou neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) 1. As lesões de alto grau (HSIL)

Recebido em 22/09/2006

Aprovado em 23/02/2007

¹Aluna do curso de Especialização em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá - PR.

²Docentes de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá - PR.

abrangem displasia moderada, displasia severa e carcinoma in situ ou NIC 2 e 3^{8, 22, 42}.

Embora o exame citopatológico seja reconhecido como a razão primária para a drástica redução do câncer cervical, ele apresenta limitações com relação a sensibilidade para a detecção das lesões pré-malignas^{20, 22}. Além disso, a grande maioria das infecções por HPV genital é assintomática e autolimitada. Somente 10 a 20% das mulheres HPV-positivas apresentam anormalidades citológicas¹⁵. Atualmente, existe grande preocupação com a melhoria do diagnóstico das infecções por HPV, visto que, em países em desenvolvimento, a triagem citológica vem falhando em promover a redução na incidência de câncer cervical⁴⁸. Considerando as evidências da associação da infecção por HPV com o desenvolvimento do câncer de colo uterino, este trabalho de revisão teve por objetivos avaliar a etiologia e a patogênese do câncer do colo do útero, os novos métodos de detecção do HPV, além de discutir alternativas terapêuticas para este tipo de câncer e suas lesões precursoras.

VIROLOGIA

Os papilomavírus humanos são pequenos vírus pertencentes à família *Papovaviridae*, constituídos por uma única molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular duplo, contendo aproximadamente 7900 pares de base. Recentes técnicas de biologia molecular utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) e sondas de DNA têm facilitado a tipagem e a caracterização do HPV. Por definição, cada tipo viral é determinado por conter menos de 90% de homologia nos pares de base de seu DNA com qualquer outro tipo de HPV já identificado⁴⁵. Genótipos específicos do HPV são conhecidos como os principais causadores de lesões intra-epiteliais escamosas e do câncer cervical. De acordo com seu potencial oncogênico, os diferentes tipos de HPV são classificados como vírus de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70)^{8, 19, 38}. Os tipos 16 e 18 causam aproximadamente 70% de todos os casos de câncer cervical em todo o mundo, enquanto que os tipos 6 e 11 causam a maioria das verrugas genitais tanto em homens quanto em mulheres⁴⁷.

PATOGÊNESE E PAPEL ONCOGÊNICO DO HPV

A organização genômica dos papilomavírus pode ser dividida em duas regiões codificantes, separadas por um segmento regulatório não codificante. A região precoce E (*early*) codifica os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, necessários para a replicação viral e a transformação celular. A região tardia L (*late*) contém os genes L1 e L2 que codificam as proteínas estruturais do capsídeo. A região não codificante está envolvida no controle da transcrição e da replicação do vírus^{8, 45}.

A infecção pelo HPV por si só não é suficiente para a carcinogênese. A progressão tumoral ocorre em uma pequena porcentagem de indivíduos infectados e está estimulada por mutágenos químicos, físicos ou infecciosos⁶. A entrada do vírus nas células basais do epitélio escamoso estratificado pode ser seguida por três eventos: (1) o DNA viral é mantido na forma episomal (circular e não-integrado), estabelecendo uma infecção latente; (2) conversão da infecção latente em produtiva, a qual está associada com a montagem de partículas virais completas; (3) o DNA viral integra-se ao genoma da célula hospedeira. É amplamente aceito que a integração do DNA do HPV ao genoma da

célula hospedeira e a subsequente expressão das oncoproteínas E6 e E7, representam dois mecanismos de ativação para a progressão das lesões pré-invasivas ao câncer cervical. As partículas maduras de HPV não podem ser detectadas nos carcinomas, mas o DNA viral persiste, integrado ao genoma da célula hospedeira, e os genes precoces são expressos. As proteínas virais E6 e E7 interagem com as proteínas celulares implicadas no controle do ciclo celular, como por exemplo as proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, iniciando a transformação e imortalização das células infectadas pelo HPV^{19, 29, 45}.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico morfológico das infecções por HPV é amplamente utilizado, tanto em esfregaços celulares quanto em cortes de tecidos. A presença inequívoca de coilocitos ou disqueratócitos sugere infecção produtiva por este vírus. Entretanto, com a introdução das técnicas de detecção dos genomas virais, ficou evidente a baixa sensibilidade do método citológico. Somente as técnicas de biologia molecular permitem a identificação do DNA do HPV, informando ao clínico da existência da infecção, mesmo na ausência de alterações morfológicas⁴⁰. Os testes moleculares para HPV têm sido propostos como método de triagem para identificar mulheres com risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de colo uterino².

1. Hibridizações moleculares

A identificação direta do DNA ou do RNA do HPV é atualmente o método de escolha para a detecção de HPV em esfregaços ou amostras de tecidos. Existem vários métodos de hibridização para detecção do DNA do HPV, possibilitando também a quantificação e a tipagem do vírus:

- *Southern blot*

Esta técnica de hibridização é utilizada para a detecção do DNA do HPV a partir do DNA de espécimes celulares, sendo considerada como o "padrão-ouro" para detecção do HPV²⁰. Após extração do DNA celular, este é submetido à digestão com uma endonuclease de restrição, formando fragmentos de tamanhos diferentes, que são então separados por eletroforese de acordo com a sua velocidade de migração. O padrão de fragmentação resultante da digestão do DNA do HPV, contido na massa de DNA celular, é específico para cada tipo de HPV. Após a hibridização com um DNA ou RNA de HPV clonado marcado, a revelação é feita por auto-radiografia ou uso de contra-corantes¹⁵. Este teste produz resultados qualitativos, sendo utilizado ocasionalmente em experimentos de pesquisa, mas não para indicações clínicas, por ser extremamente trabalhoso e requerer amostras frescas^{20, 45}.

- *Dot blot*

Método rápido e pouco dispendioso para analisar amostras de DNA ou RNA do HPV. Nesta técnica, o DNA é extraído e aplicado em gotas diretamente sobre o filtro de nitrocelulose. Após a auto-radiografia ou contra-coloração, sinais típicos de hibridização são visualizados. Este método tem sido comercialmente disponível, uma vez que possibilita o exame de um grande número de amostras em um único experimento¹⁵.

- *Hibridização in situ*

O DNA ou RNA do HPV pode ser demonstrado diretamente em cortes histológicos pela hibridização *in situ* com sondas marcadas com radioisótopos ou ligantes reativos quimicamente, que são detectados por auto-radiografia, fluorescência ou detecção de um produto colorido. Esta técnica po-

de localizar seqüências de ácido nucleico do HPV no interior de células individuais, enquanto preserva a morfologia tecidual e celular, permitindo a avaliação simultânea das alterações associadas com a lesão^{8, 45}. Para detecção do HPV, métodos enzimáticos são preferidos aos métodos fluorescentes pela facilidade de interpretação. As características do sinal (difuso ou pontual) podem revelar o estado físico do DNA do HPV. A forma epissomal leva a uma coloração difusa, enquanto que a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira gera sinais pontuais. Além disso, a intensidade do sinal pode expressar o número de cópias^{8, 34}.

- Captura híbrida

Método de amplificação de sinal, não-radioativo, no qual sondas de RNA marcadas são utilizadas para hibridização do DNA-alvo do HPV em solução⁴⁵. O ensaio de Captura Híbrida (Digene, Beltsville, MD, USA) é o único método para detecção de HPV em material cervical aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) até o momento. A segunda geração desta técnica, a versão Captura Híbrida II já está sendo amplamente utilizada nos laboratórios de diagnóstico, em complemento à citologia. Trata-se de um método de fácil realização, rápido e reprodutível, aplicado à análise de um grande número de amostras. Este método detecta o DNA viral presente em materiais cérvico-vaginais, utilizando uma micropilaca, através de sondas de RNA capazes de reconhecer seqüências de HPV de baixo e alto risco. A sensibilidade desta técnica é comparável à da PCR, em particular para detectar lesões de alto grau^{8, 33, 48}.

Inicialmente ocorre a desnaturação do DNA da amostra a ser analisada, o qual é então hibridizado com múltiplas sondas de RNA, em um tubo contendo solução tampão. As sondas mistas de RNA que detectam os tipos de HPV de baixo risco 6, 11, 42, 43 e 44 são testadas como sonda A, enquanto que a sonda RNA que reconhece os tipos de HPV de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 é testada como sonda B. As sondas A e B podem ser utilizadas em conjunto ou separadamente. O método não distingue entre os tipos de HPV dentro destes grupos. Os híbridos de RNA-DNA são imobilizados sobre a superfície de poços de uma micropilaca e cobertos com anticorpos específicos para híbridos de RNA-DNA. Os híbridos imobilizados são expostos então a um anticorpo conjugado à fosfatase alcalina, e revelados por quimioluminescência. A utilização das micropilacas permite que o ensaio seja automatizado^{8, 19, 48}. O ensaio pode ser adaptado para disponibilidade imediata em amostras clínicas como swabs cervicais e amostras de tecido cervical¹⁸.

A captura híbrida não se destina ao rastreamento primário; as indicações para sua utilização incluem (1) auxílio no diagnóstico das infecções por HPV, para distinção entre infecção com tipos de HPV de baixo risco e de alto risco, (2) triagem de pacientes com resultado citológico de ASC-US, a fim de determinar a necessidade de encaminhamento para colposcopia, e (3) como um adjuvante à citologia nos casos de pacientes com resultado de LSIL ou HSIL, auxiliando na avaliação do risco de desenvolvimento do câncer cervical^{2, 8, 32}.

- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Método poderoso para amplificação de quantidades diminutas de seqüências específicas de DNA-alvo em diversas milhões de vezes. Existe a necessidade de que a seqüência-alvo de nucleotídeos seja conhecida a fim de gerar iniciadores (*primers*) de oligonucleotídeos apropriados para o pareamento¹⁵. Este método permite escolher iniciadores específicos do tipo (regiões únicas para cada tipo, com base nas variações de seqüência presentes nos genes E6 e E7 dos subtipos de HPV), possibilitando a identificação do ge-

nótipo do HPV, ou então podem ser escolhidos iniciadores para regiões conservadas ou comuns do genoma do HPV, como a L1, permitindo assim detectar um painel de diferentes tipos de HPV em uma única reação⁸. Os produtos amplificados específicos do HPV podem ser identificados por Southern blot ou Dot blot. Esta técnica pode detectar de 10 a 100 moléculas de DNA em uma amostra, sendo o método mais sensível disponível atualmente. Entretanto, como outros métodos moleculares de detecção do HPV, ainda não é utilizada no meio clínico^{20, 45}.

Evidências têm mostrado que o DNA de HPV de alto risco pode ser encontrado no sangue de pacientes com câncer cervical, utilizando diferentes técnicas de PCR. Pelo fato do ciclo de vida do HPV ocorrer inteiramente no interior dos tecidos epiteliais, o vírus não é comumente encontrado na corrente sanguínea. Algumas hipóteses propostas incluem a lise das células malignas por necrose ou apoptose, ou a ocorrência de micrometástases. Assim, a detecção do DNA do HPV no sangue poderia ser utilizada na geração de testes diagnósticos não-invasivos, prognósticos clínicos e de seguimento para o câncer^{18, 27}.

2. Sorologia

A possibilidade de mensuração da resposta imune humoral contra diferentes tipos de HPV, por meio de testes sorológicos, tem despertado o interesse dos pesquisadores. Um estudo epidemiológico mostrou que a presença de anticorpos para o HPV tipo 16 no soro de pacientes confere um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de vulva e vagina⁴. Entretanto, anticorpos contra as oncoproteínas E6/E7 do HPV 16 têm sido encontrados predominantemente em pacientes com câncer cervical avançado, mas também podem estar presentes em pacientes controle, tornando problemática a utilização da sorologia no prognóstico do câncer¹¹. Anticorpos contra proteínas do capsídeo do HPV 16 têm sido detectados em aproximadamente 50% das pacientes com câncer cervical positivo para o DNA do HPV 16¹⁷. Assim, estas técnicas estão atualmente disponíveis somente em laboratórios de pesquisa, e são primariamente utilizadas para conduzir estudos epidemiológicos⁴⁵.

RECOMENDAÇÕES PARA MULHERES COM LESÕES INTRA-EPITELIAIS ESCAMOSAS

A conduta no caso das lesões pré-malignas cervicais começa com um resultado citológico atípico. Mulheres com lesões citológicas de alto grau deveriam ser encaminhadas imediatamente para investigação posterior, pelo conhecimento atual de que estas lesões são as verdadeiras precursoras do câncer invasivo, devendo sempre ser tratadas. Todavia, a condução das mulheres com lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau permanece controverso, uma vez que estas lesões podem ocasionalmente regredir espontaneamente. O encaminhamento para colposcopia e subsequente exame histológico resulta em custos substanciais para o sistema público de saúde e freqüentemente gera ansiedade e desconforto para a paciente^{2, 26}.

-Pacientes com ASC-US

Há 3 opções a serem consideradas após um resultado citológico de ASC-US:

(1) Testes para detecção do DNA do HPV são preferidos se citologia em meio líquido foi usada ou se amostras foram coletadas também para o teste molecular. Caso o resultado seja negativo para os tipos de HPV de alto risco, um exame citológico deve ser realizado após 12 meses. Para mulheres com teste positivo para HPV de alto risco, colposco-

pia é recomendada. Apresentando lesão, deve-se proceder à biópsia e recomendação específica a partir do laudo histopatológico. Caso a colposcopia não apresente lesão, deve-se repetir a citologia em seis meses, com encaminhamento para colposcopia caso o resultado seja de ASC-US ou lesão mais grave; alternativamente teste para detecção do DNA do HPV deve ser repetido após 12 meses, com encaminhamento para colposcopia se tipos de HPV de alto risco forem encontrados⁸;

(2) Acompanhar a paciente através de citologia de repetição. Citologia é realizada em intervalos de seis meses, até serem obtidos dois exames citopatológicos negativos. A paciente então retorna para a rotina de rastreamento citológico. Porém, caso o resultado de alguma citologia de repetição for sugestiva de lesão igual ou mais grave que ASC-US, a paciente deverá ser encaminhada para colposcopia imediata^{8, 21};

(3) Encaminhar a paciente para colposcopia imediata. Apresentando lesão, deve-se proceder à biópsia e recomendação específica a partir do laudo histopatológico. Caso a colposcopia não apresente lesão, deve-se repetir a citologia em 12 meses^{8, 26}.

Estudos têm mostrado o desaparecimento destas alterações em 70 a 90% das pacientes mantidas sob observação e tratamento das infecções pré-existentes. A colposcopia seria, portanto, um método desfavorável como a primeira escolha na condução das pacientes com ASC-US²¹.

Para mulheres pós-menopausadas com ASC-US associada à atrofia genital constatada pelo exame clínico e/ou citológico, a estrogenização é recomendada, caso não haja contra-indicação para o uso de estrógeno. Um exame citológico é realizado após uma semana. Caso o resultado seja negativo, o teste deve ser repetido em 6 meses; porém, se a repetição mostrar ASC-US ou lesão mais grave, a paciente deve ser encaminhada para colposcopia. Mulheres imunodeprimidas com resultado citológico de ASC-US devem ser encaminhadas para colposcopia imediata. Gestantes devem seguir a conduta recomendada para as pacientes não-grávidas^{8, 21, 26}.

-Pacientes com ASC-H

Embora o diagnóstico de ASC-H seja menos comum do que o de ASC-US, o risco de lesão de alto grau subjacente é grande (24 a 94%). Portanto, pacientes com ASC-H devem ser encaminhadas para colposcopia imediata. Apresentando lesão, uma biópsia deve ser realizada com recomendação específica a partir do laudo histopatológico²¹. Não se detectando lesão à colposcopia, deve-se proceder, sempre que possível, à revisão da lâmina. Se a revisão alterar o laudo, a conduta a ser tomada será baseada no novo laudo. Se não houver alteração do laudo, nova citologia e colposcopia devem ser realizadas em seis meses^{21, 26}.

-Pacientes com LSIL

As orientações de consenso da *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP) de 2001 aconselham a realização de uma colposcopia para o tratamento inicial de LSIL^{8, 26, 42}. Entretanto, a recomendação do Ministério da Saúde é a repetição do exame citopatológico em 6 meses. Após 2 repetições consecutivas negativas, a paciente retorna para a rotina de rastreamento citológico. Caso alguma citologia de repetição for positiva, com qualquer atipia celular, encaminhar a paciente para colposcopia²¹. Apresentando lesão, realizar biópsia e recomendação específica a partir do laudo histopatológico. Caso a colposcopia não mostre lesão, a repetição da citologia em seis meses se impõe, com encaminhamento para colposcopia caso o resultado seja de ASC-US ou lesão mais grave; alternati-

vamente, teste para DNA do HPV pode ser realizado após doze meses, com encaminhamento para colposcopia caso seja encontrado HPV de alto-risco^{8, 21, 26}.

-Pacientes com HSIL

Cerca de 70 a 75% das pacientes com laudo citológico de HSIL apresentam confirmação diagnóstica histopatológica, e 1 a 2% terão diagnóstico histopatológico de carcinoma invasor. Sendo assim, todas as pacientes que apresentarem citologia sugestiva de HSIL deverão ser encaminhadas imediatamente para colposcopia como conduta inicial. Quando a colposcopia for satisfatória e mostrar lesão totalmente visualizada e compatível com a citopatologia sugestiva de HSIL, a conduta recomendada é a excisão ampla da zona de transformação do colo do útero, por Cirurgia de Alta Frequência (CAF), procedimento "Ver e Tratar" que permite realizar o diagnóstico e o tratamento simultâneo. Esse método elimina a necessidade de uma biópsia prévia e de consultas adicionais – pré-tratamento, já que todo o procedimento é realizado em uma única consulta. As condições para a realização do "Ver e Tratar" são uma colposcopia satisfatória com lesão totalmente visualizada, não ultrapassando os limites colo do útero, sem sinal de carcinoma invasivo, e concordante com citopatologia sugestiva de HSIL^{21, 26, 31}. Caso a colposcopia seja satisfatória e não contemple o "Ver e Tratar" ou mostre lesão não concordante com a citopatologia, uma biópsia deve ser realizada, com recomendação específica a partir do laudo histopatológico²¹.

PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A maioria das alterações celulares cervicais induzidas por HPV são transitórias, e 90% sofrem regressão espontânea dentro de 12 a 36 meses. Somente uma pequena proporção das lesões cervicais leves e moderadas evoluem para câncer invasivo; entretanto o risco de progressão de uma anormalidade celular cervical severa até câncer invasivo é de pelo menos 12%. Fatores como idade da paciente, desejo de engravidar, saúde geral, condição imunológica, características do tumor, envolvimento de linfonodos, e preferência da paciente determinam o curso do tratamento⁸.

1. Métodos cirúrgicos

- Técnicas ablativas

Em geral, lesões intra-epiteliais não-invasivas identificadas apenas microscopicamente são tratadas com procedimentos ablativos superficiais como a crioterapia e a vaporização a laser de CO₂. Os seguintes princípios devem nortear os tratamentos ablativos: a área suspeita deve ser visível em sua totalidade; deve-se realizar colpocitologia, colposcopia e biópsia dirigida da área mais suspeita para maior certeza diagnóstica; e a curetagem endocervical deve ser negativa. Somente após afastada lesão invasora pode-se empregar algum destes métodos. A crioterapia apresenta um custo baixo e tem boa indicação nas pequenas lesões vulvares e cervicais³. A vaporização a laser permite o perfeito controle da profundidade da destruição tecidual e rápida cicatrização¹². É um procedimento simples, seguro e efetivo para tratamento das verrugas causadas pelo HPV, devendo ser encorajado em casos de condiloma acumulado não associado com malignidade³⁵. A principal desvantagem destas técnicas é a impossibilidade de obtenção de grandes amostras para análise histopatológica²⁶.

- Técnicas excisionais

A conização é a retirada de cone tecidual cuja base engloba a ectocérvice, incluindo o orifício externo do colo uterino, a junção escamocolumnar e a zona de transformação, e

cujo ápice estende-se pelo eixo do canal cervical até próximo ao orifício interno do colo uterino. Atualmente, a excisão da zona de transformação é considerada o tratamento padrão para HSIL. O material assim obtido permite a análise histopatológica de toda esta região com a profundidade da lesão intra-epitelial e suas margens. O procedimento pode ser realizado através de bisturi de lâmina fria, laser e, mais modernamente, pela cirurgia de alta frequência (CAF)^{3, 41}. Dentre as três formas excisionais, atualmente a opção tem sido a cirurgia de alta frequência em função da sua praticidade em termos técnicos e de seu custo mais acessível quando comparado ao laser. Além da possibilidade de obtenção de material adequado para análise, este método permite a retirada de toda a zona de transformação, procedimento conhecido como excisão ampliada da zona de transformação (LLETZ: *large loop excision of transformation zone* ou LEEP: *loop electrosurgical excisional procedure*)^{3, 5, 46}.

A histerectomia foi amplamente utilizada no passado para o tratamento do carcinoma in situ, mas o reconhecimento da história natural da doença e o aparecimento de métodos mais conservadores têm restringido seu emprego a poucas circunstâncias e, principalmente, quando existe patologia uterina associada, como mioma ou prolapso³. A histerectomia tem sido utilizada nos estágios iniciais do carcinoma invasivo. Na dependência do estágio e das características do tumor, pode-se empregar diversas técnicas ou ainda associá-las com radioterapia e/ou quimioterapia²⁵.

2. Radioterapia

Pacientes que se submetem à histerectomia radical e que apresentam linfonodos pélvicos positivos, margens cirúrgicas comprometidas, invasão profunda do estroma ou comprometimento linfático, independentemente do estadiamento clínico prévio, devem receber irradiação pós-operatória²⁵. Cânceres avançados são conduzidos com radioterapia para o tumor primário e potenciais sítios de disseminação regionais⁸.

3. Agentes antivirais

Cidofovir, um análogo de nucleotídeo que contém um grupo fosfato, apresenta atividade de amplo espectro contra vírus DNA, e está sendo avaliado para tratamento de lesões cervicais associadas ao HPV. Trabalhos recentes têm mostrado que a exposição de linhagens celulares de carcinoma humano contendo HPV 16 ou 18 ao cidofovir inibiu seletivamente a proliferação celular destas células⁸. Abdulkarim *et al.*¹ demonstraram que a atividade antiproliferativa deste agente antiviral está associada com a redução da expressão das oncoproteínas E6 e E7, e conseqüente reativação da expressão das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb.

4. Agentes imunomoduladores

- Interferons

Interferons (IFNs) têm sido utilizados para tratar doenças causadas pelo HPV, como condiloma acuminado e lesão intra-epitelial cervical, com resultados variáveis, de excelentes até a ausência de resposta, com aparecimento de novas lesões. O tipo de HPV responsável pela lesão, o tipo de IFN empregado no tratamento, e a presença de outras alterações únicas da célula infectada poderia explicar tal fato²⁴. Alguns autores salientam que lesões em mucosas são mais favoráveis a esta terapêutica do que aquelas localizadas em áreas queratinizadas. O tempo e o número de lesões também estão relacionados com a resposta. As lesões mais recentes e em menor número têm resposta melhor, comparativamente às lesões de longa duração e em grande quantidade³.

- Vacinas

Dois tipos principais de vacinas estão sendo desenvolvidas atualmente: vacinas profiláticas (ou preventivas), que protegem o hospedeiro de adquirir a infecção pelo HPV e conseqüentemente de desenvolver diversas doenças associadas a este vírus, e vacinas terapêuticas (curativas), que induziriam a regressão de lesões pré-malignas ou do câncer cervical avançado¹⁴. Estratégias profiláticas incluem a utilização de partículas tipo vírus (VLPs - *virus-like particles*), compostas pela proteína L1 do capsídeo viral, para induzir anticorpos de neutralização; abordagens terapêuticas visam a produção de células T específicas direcionadas contra os produtos oncogênicos virais E6 e/ou E7⁴⁴.

A proteína L1 do capsídeo viral do HPV, quando expressa em leveduras, forma partículas tipo vírus (VLPs) não infecciosas as quais apresentam semelhanças com virions nativos. Estas partículas são estruturas altamente imunogênicas, não-replicantes, que mimetizam o HPV em morfologia e imunogenicidade. Recentes estudos clínicos têm demonstrado que vacinas baseadas na proteína L1 do capsídeo do HPV são geralmente bem toleradas e induzem respostas neutralizantes contra o HPV^{10, 47}. O entendimento do genome do HPV tem permitido o desenvolvimento de duas vacinas profiláticas capazes de proteger as mulheres vacinadas contra a infecção persistente por HPV e a neoplasia intra-epitelial cervical, com 100% de eficácia. As vacinas produzidas pela Merck (Gardasil, aprovada pelo FDA em junho de 2006) e pela GlaxoSmithKline (Cervarix, submetida à aprovação pelo FDA no final de 2006) são direcionadas contra os tipos de HPV 16 e 18, responsáveis por cerca de 70% dos cânceres cervicais. A vacina Gardasil® também é direcionada aos tipos de HPV 6 e 11, responsáveis por mais de 80% dos casos de verrugas genitais. Estas vacinas são altamente imunogênicas e apresentam excelente perfil de segurança^{36, 43}. Estudos clínicos da vacina quadrivalente Gardasil® estão sendo realizados no mundo todo, com mais de 25.000 pacientes. Estes estudos irão fornecer uma avaliação definitiva do impacto da vacina na doença clínica relacionada ao HPV em adolescentes e mulheres adultas jovens⁴⁷.

Existe atualmente a necessidade do desenvolvimento de vacinas para tratar infecções já estabelecidas e condições pré-malignas. Esta vacinação terapêutica deve ser usada nos estágios precoces da doença, para erradicar doença residual após cirurgia ou para controlar lesão intra-epitelial escamosa. Embora VLPs baseadas na proteína L1 do capsídeo possam estimular anticorpos neutralizantes e agir como uma vacina profilática promissora, parece improvável que tenha um benefício terapêutico em indivíduos cronicamente infectados^{10, 30}.

DISCUSSÃO

A prevenção primária do câncer de colo uterino pode ser alcançada através da prevenção e do controle da infecção genital pelo HPV. Estratégias de promoção à saúde no sentido de mudar o comportamento sexual, com enfoque nas doenças sexualmente transmissíveis, podem ser efetivas na prevenção desta infecção viral^{14, 39}.

Apesar do diagnóstico precoce através dos esfregaços citológicos terem contribuído para a drástica diminuição dos casos de câncer cervical, a eficácia deste teste para detecção de lesão intra-epitelial escamosa tem sido contestada. Há uma tendência em supervalorizar as mudanças celulares indicativas de infecção pelo HPV, o que leva a intervenções excessivas. A combinação da citologia e dos

testes moleculares ajudaria a evitar stress desnecessário e acompanhamentos intensivos⁴⁸. As novas orientações de consenso sobre as condutas projetadas para a classificação do Sistema Bethesda 2001 recomendam acompanhamentos diferentes para as mulheres portadoras de ASC-US em relação àquelas com ASC-H. O teste para o DNA do HPV é a medida preferida no ASC-US quando puder ser realizado ao mesmo tempo que a citologia; a repetição do teste citológico e uma colposcopia imediata também são uma conduta aceitável. Em comparação, a conduta aconselhada para o ASC-H é a colposcopia^{42, 49}. A recomendação de diretrizes para a prática clínica não deve diminuir a capacidade global de decisão e a responsabilidade do médico. Cabe sempre a ele a decisão de adotar, com base na sua experiência profissional e nas melhores evidências científicas, tendo o compromisso com a boa prática clínica. Tendo em vista os contínuos avanços da ciência, tornam-se necessárias constantes revisões e atualizações dessas diretrizes²¹.

Métodos variados de detecção de HPV têm sido propostos, e diversas versões dos testes de hibridização são atualmente disponíveis comercialmente. Estes testes diferem em sensibilidade, especificidade, aplicação prática e custo. A detecção do DNA viral tem sido utilizada: (1) para triagem de mulheres com resultado citológico de ASC-US, (2) como um marcador de cura pós-tratamento, e (3) principalmente, como um adjunto à citologia nos programas de rastreamento do câncer de colo uterino²⁸. As técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) são utilizadas predominantemente para estudos epidemiológicos uma vez que permitem a detecção de um amplo leque de tipos de HPV, mesmo quando somente baixo número de cópias do DNA do vírus está presente, como é o caso das lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e dos cânceres. Em condições de carga viral supostamente elevada, como em indivíduos altamente expostos às doenças sexualmente transmissíveis, a técnica preferencial é a captura híbrida, com relação custo-benefício favorável. A hibridização *in situ* tem seu espaço garantido na correlação entre a presença de nucleotídeos virais e os padrões morfológicos. A sorologia não é muito útil para estudos de incidência ou prevalência de HPV, visto que, os anticorpos produzidos contra o vírus são detectados em apenas 50% das mulheres com câncer cervical invasivo e ainda porcentagens inferiores são encontradas em mulheres com infecções assintomáticas ou com lesões pré-malignas induzidas por HPV¹⁵. Entretanto, pela dificuldade em se adotar testes moleculares como rastreamento primário para lesões intra-epiteliais escamosas, a identificação dos fatores de risco associados com a infecção pelo HPV, a fim de selecionar as pacientes para um rastreamento secundário, poderia ser uma estratégia mais custo-efetiva e um aspecto interessante para pesquisas posteriores. Após detectada a anormalidade citológica, a definição do tipo de HPV infectante pode ser clinicamente útil para estabelecer prognóstico e terapia, uma vez que a doença poderá ser monitorada mais atentamente, proporcionando uma pronta intervenção^{13, 14}.

A vacinação contra o HPV tem grande valor principalmente nos países em desenvolvimento, onde ocorrem cerca de 80% dos casos de câncer cervical¹⁴. A possibilidade de produção de vacinas profiláticas e terapêuticas combinadas pode oferecer uma chance melhor de redução significativa na incidência do câncer de colo uterino em todo o mundo. O desenvolvimento de uma vacina abre, portanto, a perspectiva de uma prevenção contra a infecção pelo vírus e, confirmada sua eficácia, representará um importante avanço na medicina contra o câncer e, principalmente, na proteção da saúde da mulher.

REFERÊNCIAS

1. Abdulkarim, B.; Sabri, S.; Deutsch, E. et al. Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers. *Oncogene*, 21: 2334-2346, 2002.
2. Arbyn, M.; Buntinx, F.; Ranst, M.V. et al. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 96 (4): 280-293, 2004.
3. Bibbo, M.; Moraes Filho, A. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. *Rio de Janeiro: Revinter*, p. 29-140, 1998.
4. Bjorge, T.; Dillner, J.; Anttila, T. et al. Prospective seroepidemiological study of role of human papillomavirus in non-cervical anogenital cancers. *BMJ*, 315: 646-649, 1997.
5. Boardman, L.A.; Steinhoff, M.M.; Shackelton, R. et al. A randomized trial of the Fischer cone biopsy excisor and loop electrosurgical excision procedure. *Obstet Gynecol*, 104 (4): 745-750, 2004.
6. Bonfiglio, T.; Erozan, Y. S. *Gynecology cytopathology*. Philadelphia: Lippincott Raven, p.51-72, 1997.
7. Brenna, S. M. F.; Hardy, E.; Zeferino, L. C. et al. Conhecimento, atitude e prática do exame de Papanicolaou em mulheres com câncer de colo uterino. *Cad Saúde Pública*, 17 (4): 909-914, 2001.
8. Burd, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, 16 (1): 1-17, 2003.
9. Christensen, N. D. Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert Opin Emerg Drugs*, 10 (1): 5-19, 2005.
10. Da Silva, D. M.; Schiller, J. T.; Kast, W. M. Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particle vaccines. *Vaccine*, 21: 3219-3227, 2003.
11. Di Bonito, P.; Grasso, F.; Mochi, S. et al. Serum antibody response to human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV 16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer*, 1:6, 2006.
12. Fallani, M.G.; Penna, C.; Fambrini, M. et al. Laser CO2 vaporization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a long-term follow-up series. *Gynecol Oncol*, 91: 130-133, 2003.
13. Follen, M.; Richards-Kortum, R. Emerging technologies and cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 92 (5): 363-365, 2000.
14. Franco, E. L.; Duarte-Franco, E.; Ferenczy, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J*, 164 (7): 1017-1025, 2001.
15. Gross, G. E.; Barrasso, R. Infecção por Papilomavírus Humano. *Atlas clínico de HPV*. Porto Alegre: Artmed, p.1-287, 1999.
16. Hagensee, M. E. Infection with human papillomavirus: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Curr Infect Dis Rep*, 2 (1): 18-24, 2000.
17. Heim, K.; Widschwendter, A.; Pirschner, G. et al. Antibodies to human papillomavirus 16 L1 virus-like particles as an independent prognostic marker in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (4): 705-711, 2002.
18. Ho, C-M.; Yang, S-S.; Chien, T-Y. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 99: 615-621, 2005.
19. Hudelist, G.; Manavi, M.; Pischinger, K.I.D. et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*, 92: 873-880, 2004.
20. Hwang, T. S.; Jeong, J. K.; Park, M. et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol*, 90: 51-56, 2003.
21. Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas – recomendações para profissionais de saúde 2006. *Rev Bras Cancerol*, 52 (3): 213-236, 2006.
22. Janicek, M.F.; Averette, H.E. Cervical cancer: prevention, diagnosis and therapeutics. *CA Cancer J Clin*, 51: 92-114, 2001.
23. Jung, W. W.; Chun, T.; Sul, D. et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol*, 42 (4): 255-266, 2004.
24. Kim, K.Y.; Blatt, L.; Taylor, M.W. The effects of interferon on the expression

- of human papillomavirus oncogenes. *J Gen Virol*, 81: 695-700, 2000.
25. Lima, G. R.; Gebirim, L. H.; Oliveira, V. C. et al. *Ginecologia oncológica*. São Paulo: Atheneu, p. 294-325, 1999.
 26. Lindeque, B.G. Management of cervical premalignant lesions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 19 (4): 545-561, 2005.
 27. Liu, V. W. S.; Tsang, P.; Yip, A. et al. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 82: 269-272, 2001.
 28. Lorincz, A. T. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex*, 45: S376-387, 2003.
 29. Mandic, A.; Vujkov, T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Ann Onc*, 15: 197-200, 2004.
 30. Moingeon, P.; Almond, J.; Wilde, M. Therapeutic vaccines against infectious diseases. *Curr Opin Microbiol*, 6 (5): 462-471, 2003.
 31. Numnum, T.M.; Kirby, T.O.; Laeth, C.A. 3rd et al. A prospective evaluation of "see and treat" in women with HSIL Pap smear results: is this an appropriate strategy? *J Low Genit Tract Dis*, 9 (1): 2-6, 2005.
 32. Paraskevaides, E.; Malamou-Mitsi, V.; Koliopoulos, G. et al. Expanded cytological referral criteria for colposcopy in cervical screening: comparison with human papillomavirus testing. *Gynecol Oncol*, 82: 355-359, 2001.
 33. Riethmuller, D.; Schaal, J. P.; Mougin, C. Épidémiologie et histoire naturelle de l'infection génitale à papillomavirus humain. *Gynécob Obstét Fertil*, 30: 139-146, 2002.
 34. Samama, B.; Plas-Roser, S.; Schaeffer, C. et al. HPV DNA detection by in situ hybridization with catalysed signal amplification on thin-layer cervical smears. *J Histochem Cytochem*, 50 (10): 1417-1420, 2002.
 35. Savoca, S.; Nardo, L.G.; Rosano, T.F. et al. CO(2) laser vaporization as primary therapy for human papillomavirus lesions. A prospective observational study. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 80 (12): 1121-1124, 2001.
 36. Schmiedeskamp, M.R.; Kockler, D.R. Human papillomavirus vaccines. *Ann Pharmacother*, 40 (7-8): 1344-1352, 2006.
 37. Schoell, W. M.; Janicek, M. F.; Mirhashemi, R. Epidemiology and biology of cervical cancer. *Semin Surg Oncol*, 16 (3): 203-211, 1999.
 38. Settheetham-Ishida, W.; Kanjanavirojkul, N.; Kularbkaew, C. et al. Human papillomavirus genotypes and the p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer of Northeastern Thailand. *Microbiol Immunol*, 49 (5): 417-421, 2005.
 39. Shanta, V.; Krishnamurthi, S.; Gajalakshmi, C. K. et al. Epidemiology of cancer of the cervix: global and national perspective. *J Indian Med Assoc*, 98 (2): 49-52, 2000.
 40. Silva Filho, A. M.; Longatto Filho, A. Colo uterino e vagina: processos inflamatórios – aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Revinter, p. 193-200, 2000.
 41. Skinner, E.N.; Gehrig, P.A.; Le, L.V. High-grade squamous intraepithelial lesions: abbreviating posttreatment surveillance. *Obstet Gynecol*, 103 (3): 488-492, 2004.
 42. Solomon, D.; Nayar, R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal – Definições, Critérios e Notas Explicativas. 2ª ed., Rio de Janeiro: Revinter, p. 67-121, 2005.
 43. Speck, L.M.; Tying, S.K. Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. *Skin Therapy Lett*, 11(6): 1-3, 2006.
 44. Stern, P.L. Recent developments in human papillomavirus vaccines. *Expert Opin Investig Drugs*, 13 (8): 959-971, 2004.
 45. Tang, W. K. Oncogenic human papillomavirus infection: epidemiology in local high-risk women. *Hong Kong Dermatol Venereol Bulletin*, 10 (4): 160-163, 2002.
 46. Ueda, M.; Ueki, K.; Kanemura, M. et al. Diagnostic and therapeutic laser coagulation for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, 100(1): 143-146, 2006.
 47. Villa, L. L.; Ault, K.A.; Giuliano, A.R. et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine*, 24: 5571-5583, 2006.
 48. Vince, A.; Ivanisevic, M.; Harni, V. et al. Molecular detection of human papillomavirus in woman with minor grade cervical cytologic abnormalities. *J Clin Virol*, 20: 91-94, 2001.
 49. Wright, T.C. Jr; Cox, J.T.; Massad, L.S. et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA*, 287: 2120-2129, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Cynthia Gandolfi Boer

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá
Avenida Colombo, 5790 - Campus Universitário
CEP 87020-900 Maringá - Paraná.

Tel.: (44) 3261-4795

E-mail: cgboer@uem.br

34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas 7º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

10 a 14 de junho de 2007

Local:

Centro de Convenções - EXPOMINAS
Belo Horizonte - MG



Promoção e Realização
SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

PRÊMIO DOLES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, com o patrocínio da DOLES REAGENTES;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 3.000,00 (três mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica tem por objetivos;

- 11) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Bioquímica Clínica no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho de bioquímica clínica inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 11) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem word) e uma cópia em disquete (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio Doles de Bioquímica Clínica poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Doles de Bioquímica Clínica, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 11) O Prêmio Doles de Bioquímica Clínica é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio Doles, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Doles de Bioquímica Clínica

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Comportamento da reticulometria antes e após a suplementação dietética ferrosa, em crianças com anemia ferropriva, em Erechim-RS*

Reticulometry behavior before and after the dietetic ironing supplementation in iron deficiency anemic in Erechim-RS

Mezzomo, F.¹; Longo, K.¹; Aguiar, C.¹; Brandão, C.A.²; Brandão, N. M.²; Spinelli, R.³ & Canello, C.⁴

RESUMO - Na evolução eritropoética, os reticulócitos representam a hemácia mais imatura do sangue circulante. A diminuição de hemoglobina, contida nas hemácias, chama-se anemia e é causada principalmente pelo déficit de ferro. Objetivou-se fazer uma análise do comportamento dos valores de hemoglobina e da contagem de reticulócitos, antes e após a suplementação dietética. Trabalhou-se com crianças anêmicas, com idade entre 1 e 13 anos, num grupo inicial de 125 crianças, pertencentes às creches Mãezinha do Céu, Obra Santa Marta e do Centro de Atendimento à Família Erechinense (CAFE). O aporte férrico fornecido contém leite enriquecido com ferro aminoácido quelato, na quantidade 15mg/dia, adicionados a 500ml de leite, com duração de 2 meses, sem interrupções. O presente trabalho indicou, através do hemograma, um total de 53 crianças anêmicas. Destas, 43 fizeram ambas as coletas, caracterizando, portanto, o grupo de estudo (n). Ao final deste período, procedeu-se a novos hemogramas, com acompanhamento médico. Obteve-se após a intervenção, um incremento nos resultados dos parâmetros analisados. Percebeu-se que o metal utilizado, juntamente com o veículo empregado, foi efetivo para a melhora nos níveis de hemoglobina e hamatócrito. Observou-se, também, uma melhora nos valores reticulocitários analisados, tanto quanto da hemoglobina.

PALAVRAS-CHAVE - reticulócitos, anemia ferropriva, reticulometria.

SUMMARY - In the eritropoetic evolution the reticulocytes represent the most immature blood circulating red cell. The diminishing of the hemoglobin contained in the red cell is called anemia and is caused by the iron deficit. The experiment aimed to analyse the hemoglobin values and reticulocytes number before the dietetic supplementation. The subjects were 125 anemic children from 1 to 13 years old of the Mãezinha do Céu and Obra Santa Marta nurseries belonged to the Centro de Atendimento à Família Erechinense (CAFE). The iron quantity supplied contained enriched milk with quelato amino acid iron in an amount of mg a day added to ml of milk during two months with no interruption. The experiment results indicated, based on the hemograma, a total of 53 anemic children. 43 out of them, the study group, did the two blood harvesting. Later on this new hemograms were made supported by medical aid. Results showed that the iron used together with the enriched milk were effective in the anemia improvement levels. Improvement related to the analysed reticulocitary values as the hemoglobin, was notice.

KEYWORDS - reticulocytes, iron deficiency anemia, reticulometry.

INTRODUÇÃO

Na medula óssea, durante a sequência de maturação das células eritrocitárias, até o surgimento da hemácia, o reticulócito é o estágio celular que antecede à hemácia, sendo considerado uma hemácia imatura. Em condições normais, a grande maioria dos reticulócitos está na medula óssea para completar a sua transformação em hemácia, porém, sempre alguns reticulócitos são liberados para a circulação sanguínea, circulando entre 24 e 48 horas no sangue periférico, onde também acontece a transformação em corpúsculo maduro. Esta liberação de reticulócitos, para o sangue periférico, também tem uma faixa de normalidade. Por esse motivo, existem as situações denominadas reticulocitopenias, quando há diminuição do número de reticulócitos no sangue periférico (NASCIMENTO, 2004).

O número de reticulócitos no sangue periférico reflete a atividade eritropoética da medula óssea. O aumento da contagem de reticulócitos representa uma maior liberação de eritrócitos jovens pela medula óssea, em resposta a um determinado estímulo desencadeado principalmente pela eritropoetina. Sendo assim é um importante índice no diagnóstico e monitoramento de pacientes anêmicos ou com perda sanguínea. Para fins clínicos, a contagem de reticulócitos é registrada como porcentagem do número total de glóbulos vermelhos na amostra avaliada. O nível sanguíneo de reti-

culócitos é menor que o nível medular. A técnica de contagem manual, utilizando coloração supravital, ainda é considerado o procedimento padrão (MORESCO *et al.*, 2003).

A patologia do éritron, órgão difuso constituído pela massa eritróide circulante e pelo tecido eritroblástico da medula óssea que lhe dá origem, é essencialmente quantitativa e, assim, a insuficiência funcional deste é chamada de anemia, sendo definida como diminuição da hemoglobina sanguínea. O processo costuma acompanhar-se, mas não necessariamente, nem de modo paralelo, da baixa do número de eritrócitos (FALLACE, 2004).

As anemias representam uma das doenças hematológicas mais frequentes e entre as diversas formas de apresentação desta patologia, são classificadas morfológicamente como microcíticas e hipocrômicas e são as formas de anemia mais prevalentes (FLEURY *et al.*, 2003).

A anemia é definida como processo patológico quando a concentração de hemoglobina (Hb), contida nos glóbulos vermelhos, encontra-se anormalmente baixa, respeitando-se as variações segundo idade, sexo e altitude em relação ao nível do mar. Entretanto, não resta dúvida de que a deficiência de ferro é a responsável pela maior parte das anemias encontradas, sendo denominada de anemia ferropriva ou ferropênica (QUEIROZ e TORRES, 2000).

Na escolha dos alimentos a serem fortificados, deve ser lembrado que estes, devem ser de fácil acesso, de baixo

Recebido em 02/12/2005

Aprovado em 23/02/2007

*Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Campus de Erechim

¹Acadêmicos; ²Professores de Hematologia; ³Professora e Nutricionista; ⁴Médica Pediátrica.

custo sem ter seu paladar ou aspectos alterados, utilizando-se de compostos com boa biodisponibilidade. A utilização de alimentos fortificados é uma alternativa utilizada pelos países desenvolvidos há mais de cinquenta anos, com excelentes resultados (QUEIROZ; TORRES, 2000). Este trabalho tem como objetivo, a análise do comportamento dos valores de hemoglobina, relacionando-os com os da contagem dos reticulócitos, antes e após o aporte alimentar do suplemento dietético férrico, no grupo trabalhado.

MATERIAL E MÉTODO

Foram realizados Hemogramas Completos, contagem de reticulócitos e exames parasitológicos de fezes, em 125 crianças, de ambos os sexos, pertencentes a uma faixa etária de um a treze anos de idade. Estas crianças são oriundas da creche *Mãezinha do Céu*, *Obra Santa Marta* e do *Centro de Atendimento à Família Erechinense* (CAFE), localizadas no município de Erechim – RS, no período de setembro a dezembro de 2004. Os exames foram executados nos laboratórios de Hematologia Clínica e Parasitologia Clínica do Curso de Farmácia da URI – Campus de Erechim, segundo técnicas disponíveis.

O hemograma foi realizado em aparelho automatizado (ABX – 18 parâmetros), sendo que o sangue foi coletado com EDTA (etilenodiamino tetracético K₃) e o exame de reticulócitos foi procedido por técnica manual, com coloração supra-vital, usando azul de cresil brilhante e contra corada com corante hematológico May Grawnd – Giemsa. A visualização foi feita ao microscópio óptico, com aumento de 1000 vezes. Foi preconizado como valor de referência, percentuais de 0,5 a 1,5% e para a contagem corrigida de reticulócitos, foi utilizado como valor de referência cifras de 0,75% a 2,30% (FAILACE, 2004).

Para a caracterização da anemia, utilizou-se como parâmetro o valor de hemoglobina igual ou inferior a 11,5 g/dl e hematócrito igual ou inferior a 37%. As crianças que se apresentaram anêmicas foram alimentadas com leite enriquecido com ferro aminoácido quelato, diariamente, na dose de 15mg/dia incorporados em 500ml de leite *in natura*, por criança e por um período de dois meses, sem interrupções.

Os resultados obtidos, antes e depois da suplementação dietética com o leite enriquecido, foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste T Students para amostras pareadas; neste caso, reticulócitos, hemoglobina e hematócrito na primeira e segunda coleta. Para a realização do teste utilizou-se um nível de significância de 5% (JAQUES, 2004).

A colheita de sangue foi realizada por Farmacêutico-Bioquímico com experiência nesta atividade laboratorial, com cuidados de assepsia.

Foram executados, concomitantemente, exames parasitológicos de fezes (EPFs), para que fosse evitado o mascaramento dos resultados pela ação dos parasitas intestinais (NEVES *et al.*, 2000).

Para uma melhor configuração dos resultados e da viabilidade deste suplemento alimentar, tornou-se imperioso o acompanhamento clínico destas crianças, através do médico que participou deste trabalho e, ainda, o acompanhamento de um profissional nutricionista.

Após transcorridos os dois meses, fez-se uma nova coleta para evidenciar se houve melhora ou não nas crianças que eram anêmicas.

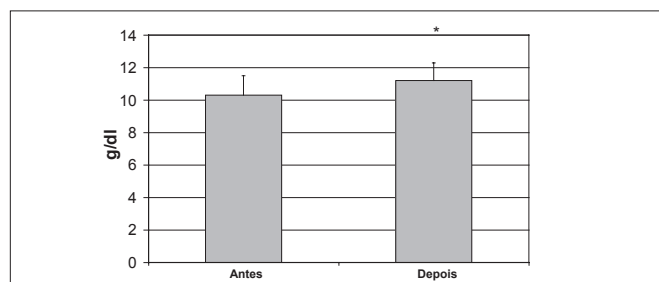
RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra os resultados obtidos com a suplementação férrica e as variações dos parâmetros analisados nas crianças anêmicas, antes e após 2 meses de tratamento, com leite enriquecido com ferro aminoácido quelato.

Tabela 1
Média, desvio padrão e valor de p, segundo as variáveis hemoglobina, hematócrito e reticulócitos (%) em crianças, antes e após a suplementação com leite enriquecido com ferro aminoácido quelato.

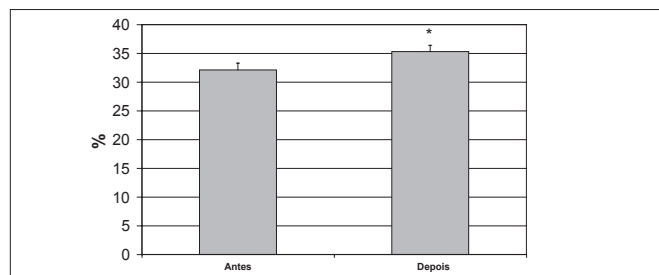
Variável	Média		Desvio Padrão		Valor de p
	Antes	Depois	Antes	Depois	
Hemoglobina (g/dl)	10,3	11,2	1,19	1,08	p<0,05
Hematócrito (%)	32,1	35,3	2,99	2,71	p<0,05
Reticulócito (%)	0,5	0,7	0,29	0,34	p<0,05
CRC %	0,3	0,5	0,22	0,26	p<0,05

Para uma melhor visualização, as Figuras 1, 2, e 3, expressas abaixo, demonstram os valores das médias encontradas no presente estudo, demonstrando os valores de hemoglobina, hematócrito e reticulócitos nas 43 crianças anêmicas, antes e após a suplementação férrica



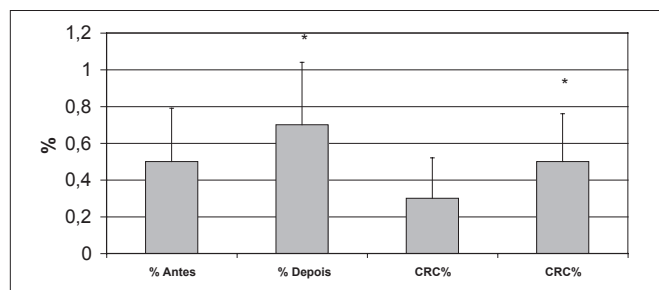
*p<0,05%

Figura 1: Valores médios de hemoglobina, na creche Mãezinha do Céu, Obra Santa Marta e Centro de Atendimento à Família Erechinense (CAFE).



*p<0,05%

Figura 2: Valores médios de hematócrito, na creche Mãezinha do Céu, Obra Santa Marta e Centro de Atendimento à Família Erechinense (CAFE).



*p<0,05%

Figura 3: Valores médios de reticulócitos, na creche Mãezinha do Céu, Obra Santa Marta e Centro de Atendimento à Família Erechinense (CAFE).

DISCUSSÃO

Das 125 crianças avaliadas, 53 tiveram diagnóstico confirmado de anemia ferropriva, através da análise de hemoglobina e hematócrito. Destas 53 crianças anêmicas, apenas 10 delas não fizeram o tratamento correto e as coletas anteriores e posteriores à suplementação férrica. Ao final do estudo, das 53 crianças, apenas 43 caracterizaram o grupo de estudos e 40 obtiveram melhora nos níveis de hemoglobina, hematócrito e reticulócitos. Nas outras 3, que fizeram parte do estudo, não se obteve melhora nos resultados.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que houve um aumento estatisticamente significativo na taxa de hemoglobina de 8,73%, hematócrito de 9,96% e de reticulócitos na ordem de 40%, após a suplementação dietética fornecida ao grupo de estudo, composto por 43 crianças avaliadas, num período de 2 meses de intervenção. Porém, das crianças que fizeram parte do estudo, em 3 delas, não se obteve incremento nos resultados. Pelo contrário, ocorreu uma diminuição dos valores de hemoglobina, hematócrito e reticulócitos. A baixa nestes resultados deveu-se a motivos como falta de adesão ao tratamento, reinfeção parasitária ou por sangramentos devido a causas desconhecidas que também debilitam a formação de hemoglobina, como também é relatado por QUEIROZ E TORRES (2000), cujo estudo realizado mostrou que as perdas diárias de ferro situam-se em torno de 1mg em decorrência, principalmente, da descamação celular. Além disso, pequenas quantidades são também perdidas pela urina, suor e fezes. Outras situações, como menstruação, lactação e parasitoses, também podem determinar perdas adicionais de ferro.

A Tabela 1 demonstra claramente que houve um aumento da hemoglobina (antes 10,3g/dl e após 11,2g/dl), após 2 meses de suplementação dietética, assim como os valores de hematócrito (antes 32,2% e após 35,9%), porcentagem de reticulócitos (antes 0,5% e após 0,7%) e contagem corrigida de reticulócitos (0,3% antes e 0,5% após), com valores estatisticamente significativos, em todos os parâmetros analisados ($p < 0,05$). Porém, como se objetivou fazer a coleta no final dos 2 meses de suplementação e não entre o 5º e 10º dias de tratamento, conforme preconizado nas terapias com ferro, em que ocorre o pico máximo de elevação reticulocitária, encontrou-se valores abaixo do normal para CRC%, com somente um leve aumento desses valores, entre as duas coletas, indicando que a medula óssea está em início de regeneração, como também evidenciado pelos valores de hemoglobina, demonstrando que as crianças ainda apresentam uma leve anemia. Com isso, pode-se dizer que os valores de CRC%, não estão indicando uma resposta natural do organismo, mas própria do mesmo.

Em consequência pela pequena elevação nos valores encontrados, percebeu-se que a medula óssea está apenas no início de regeneração, sendo o tempo de tratamento de 2 meses, insuficiente para que a medula óssea obtivesse uma resposta eritropoiética normal da produção eritróide. Segundo FAILACE (2004), o índice reticulocítico, transforma a porcentagem de reticulócitos, relacionando-os com o hematócrito, em coeficiente de aumento de eritropoese. Assim como NASCIMENTO (2003), que relata que a contagem corrigida de reticulócitos está indicada, principalmente, nos casos com anemia sendo as reticulocitopenias representando hipoatividade eritropoiética e as reticulocitoses a hiperatividade. Em vista disso, a contagem corrigida de reticulócitos (CRC%) faz a distinção entre as duas respostas medulares.

Nas Figuras 1 e 2, pode-se observar, com clareza, o aumento dos parâmetros de hemoglobina e hematócrito, demonstrando com isso a melhora das crianças anêmicas, através do aporte férrico administrado diariamente. Por sua vez, a Figura 3, demonstra uma melhora nos níveis percentuais de reticulócitos, estando estes dentro da normalidade. Em contra partida, com a determinação da CRC%, observa-se que a atividade eritropoiética ainda não alcançou cifras dentro da normalidade. Esse tipo de avaliação permite a correção da contagem reticulocitária, em função do grau da anemia como relatado por NASCIMENTO (2004), que trabalhou com crianças normocíticas e crianças reticulocitopênicas. Num total de 283 casos, encontrou resultados significativos ($p < 0,05$), entre o grupo de referência (CRC = 1,2%) e o grupo com reticulocitopenia (CRC = 0,6%), com valores diminuídos para o grupo reticulocitopênico, cujo valor máximo encontrado foi de 0.74.

A alimentação pobre, das famílias das crianças envolvidas no estudo, contribuiu de certa forma pelo pequeno aumento dos parâmetros analisados. Sendo a alimentação feita pelas crianças na creche, muitas vezes a única refeição do dia. Além de ser composta por alimentos pouco nutritivos, devido às condições socioeconômicas das famílias, cuja renda não comporta para a aquisição de alimentos mais nutritivos, como também é relatado por NEUMAN *et al* (2000), que estudou a prevalência e fatores de risco para a anemia no Sul do Brasil e concluiu que as famílias, com menor renda mensal, apresentam uma incidência maior de crianças anêmicas, por deficiência de ferro, sendo essa deficiência geralmente recebida pela mãe durante a gestação.

Um fator importante, que contribuiu para a realização do trabalho, foi a escolha adequada do alimento a ser fortificado, tendo o mesmo fácil aceitação, baixo custo e ser de consumo habitual pela população. Os estudos feitos por TORRES (1995, 1996), mostraram uma evolução na utilização de leite como veículo de fortificação para crianças menores de 4 anos, passando da utilização do sulfato ferroso para ferro aminoácido quelato, ressaltando que este último apresenta vantagens na sua utilização por apresentar alta biodisponibilidade e não alterar o alimento no qual foi adicionado.

Nos últimos anos houve, no Brasil, uma corrida na direção da fortificação de alimentos. Comercialmente, há muitos alimentos fortificados com o ferro, além do leite, existem cereais, iogurtes e certos tipos de queijos que, aparentemente, não são de acesso da população de baixa renda (SIGULEM; COLLI; QUEIROZ 1999).

BATISTA FILHO e FERREIRA (1996), em trabalho realizado sobre prevenção e tratamento da anemia nutricional ferropriva, apontou como limite para o uso de sulfato ferroso as intercorrências gastrointestinais decorrentes do uso do medicamento e a interferência direta da dieta na absorção deste tipo de sal de ferro, sendo especialmente prejudicada na grande utilização do leite como alimento, principal constituinte das dietas das crianças na faixa etária de risco.

A oferta diária de leite nas creches, supervisionada pelos funcionários e professores, teve um papel fundamental para garantir que a dieta fosse realmente consumida pelo grupo de estudo, ao invés de ser administrada pelos pais, em suas próprias residências. Este fato também foi relatado pelo estudo desenvolvido por FISBERG *et al* (2003), que fortificou alimentos vinculados à merenda escolar, verificando que a participação das auxiliares de desenvolvimento infantil e cozinheiras são importantes para garantir o preparo do produto. O estímulo adequado ao seu consumo e a oferta deste produto a todas as crianças presentes na

entidade trabalhada, são fatores de grande importância para o sucesso do programa.

Segundo NASCIMENTO (2004), em estudos experimentais, através da indução da deficiência de ferro, mostraram que os reticulócitos passam a ter baixo conteúdo de RNA. Isto significa que esses corpúsculos liberados da medula óssea para o sangue periférico, possuem menor quantidade de granulações, logo haverá diminuição dos reticulócitos imaturos. Em consequência, tem-se um aumento relativo dos mesmos com maior maturidade. Quando existe um número baixo, significa que a medula óssea pode estar lançando menor número de reticulócitos no sangue periférico, isto é o que se denomina de hipoatividade eritropoiética.

Em estudos realizados por QUEIROZ e TORRES (2000) e NASCIMENTO (2004), as perdas sangüíneas agudas ou crônicas espoliam as reservas de ferro do organismo e podem ser conseqüentes a patologias, intolerância a proteínas do leite de vaca e parasitoses intestinais como, *Ancylostoma duodenale* ou *Necator americanus* que sugam o sangue ou causam hemólise e também por *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia*, competindo pelo alimento. A diminuição numérica, no total de reticulócitos, também tem sido descrita na presença de infestações por helmintos, como encontrado nesse trabalho, em que a diminuição dos níveis reticulocitários, pode ter sido causada pela reinfestação parasitária, em decorrência das condições de moradia das famílias.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a suplementação férrica com ferro aminoácido quelato no leite *in natura*, pode ser efetiva, como também relatado pelos estudos realizados por outros autores, conforme descrito anteriormente. Tendo a dieta transcorrido apenas 2 meses e pelos resultados encontrados no presente estudo, a continuação do trabalho se faz necessária para um melhor incremento nos resultados e conseqüente diminuição no percentual de anêmicos e um aumento em relação a produção de reticulócitos.

Assim, o leite utilizado para a suplementação teve boa aceitação pelas crianças e se mostrou um bom veículo de transporte além de ser de baixo custo e fácil obtenção. Portanto, pôde-se observar que a criação e o incentivo de programas de suplementação de ferro, em doses profiláticas aos grupos de risco, sob supervisão e acompanhamento, é considerada atualmente a melhor medida preventiva a longo prazo.

A criação de programas de saneamento básico e assistência médica a todos, com o controle de parasitoses intestinais, mostrou ser um dos primeiros passos para a redução da incidência de anemias em países pouco desenvolvidos. Além disso, a interpretação laboratorial adequada dos exames, juntamente com dados clínicos do paciente, torna-se importante para o diagnóstico das anemias.

Os exames de reticulócitos são de fácil execução e interpretação, podendo ajudar a evidenciar níveis patológicos iniciais de alterações na atividade eritropoiética, além de servir como diagnóstico diferencial de alguns processos anêmicos.

AGRADECIMENTO

Agradecemos a colaboração as empresa Albitech Nutritivos de São Paulo-SP, pela doação do ferro aminoácido quelato e também a contribuição da nutricionista especia-

lista em nutrição clínica Jussara E. S. G. Rodrigues na execução desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1- BATISTA-FILHO, M.; FERREIRA, L. ° C. Prevenção e tratamento da anemia nutricional ferropriva: novos enfoques e perspectivas. Cad. Saúde Pública; RJ, 12 (3): 411-415,1996.
- 2- FAILACE, R. – Hemograma: Manual de Interpretação. Editora Artes Médicas, 2004.
- 3- FISBERG, M.; LIMA, ° M.; RHEIN, S. °; NAUFEL, C. RODRIGUES, C. e OLIVEIRA, S. – Feijão Enriquecido com Ferro na Prevenção de Anemia em Pré Escolares- Rev. Nutrição e Pediatria mar/abr, 10 – 18, 2003.
- 4- FLEURY, K. M.; GUSMÃO, P. N.; SILVA, C. M. T.; e VIEIRA, X. G.- Anemia e β- Talassemia Heterozigótica: Aspectos Laboratoriais e Diagnóstico Diferencial. RBAC, 35(2): 51-4, 2003.
- 5- JAQUES, C. M. A.- Bioestatística-Princípios e Aplicações. Editora Artmed – Porto Alegre 2004.
- 6- MORESCO, N. R; VALENTE, P. M.; VARGAS, C. L.; COLETTI, L. S.; MORARI, L.; DEFFERRARI, M. R. e BECKER, P. N. – Análise Comparativa das Técnicas Manual e Automatizada (ADVIATM 120) para Contagem de Reticulócitos. RBAC, vol. 35(1): 17-18, 2003.
- 7- NASCIMENTO, M. L. P. - Normocitose, Reticulocitopenia, Reticulócitos Imaturos e Eritrograma. NewsLab 63 –224: 178-188, 2004.
- 8- NASCIMENTO, M. L. P. – Novos Índices Reticulocitários : Volume Globular Médio Normal, reticulocitopenias e Reticulocitoses. Rev. Laes & Haes, 108-122, 2003.
- 9- NASCIMENTO, M. L. P. Histograma Eritrocitário, Contagem Corrigida de Reticulócitos e Volume Globular Médio por Faixa Etária – Rev. Laes & Haes 146 – 158 2004.
- 10- NEVES, P. D.; MELLO, L. A; GENARO, O; LINARDI, M. P.; - Parasitologia Humana 10ª edição. Editora Atheneu, São Paulo-SP, 2000.
- 11- NEUMAN, A. N.; TANAKA Y. O; SZARFARC, C. S.; GUIMARÃES & VICTORA, G. C.; - Prevalência e Fatores de Risco para Anemia no Sul do Brasil. Rev. Saúde Pública. 34 (1): 56-63, 2000.
- 12- QUEIROZ, S. S.; TORRES, A. A. M.- Anemia Ferropriva na Infância. J. Pediatr. 76(3): 298-304, 2000.
- 13- SIGULEM, D. M.; COLLI, C.; QUEIROZ, S. S.; Fortificando Alimentos do Brasil. Apud: De Angelis, R.C. Fome Oculta: Impacto para a população do Brasil. São Paulo, Ed. Atheneu; 1999. p.155.
- 14- TORRES, A.A. M.; LOBO, F. N.; QUEIROZ, S. S. S. K. – Fortificação do Leite Fluido na Prevenção e Tratamento da Anemia Carencial Ferropriva em Crianças Menores de 4 Anos. Ver. Saúde Pública. 30(4): 350-7, 1996.
- 15- TORRES, A. A. M.; SATO, K.; LOBO, F. N.; QUEIROZ, S. S. – Efeito do Uso do Leite Fortificado com Ferro e Vitamina C sobre os Níveis de Hemoglobina e Condição Nutricional de Crianças Menores de 2 Anos. Rev. Saúde Pública, 29(4) 301-7, 1995.
- 16- VALLADA, P. E.- Manual de técnicas Hematológicas. Editora Atheneu, São Paulo, 1997.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Carlos Alberto Brandão
Av. Sete de Setembro, 1621
CEP. 99700-000 Erechim - RS
URI - Curso de Farmácia

Comparação de testes não treponêmicos utilizados no diagnóstico da sífilis e interferência da inativação do soro

Comparison of non treponemic assays used in syphilis diagnosis and interference of serum inactivation

Michele Oto dos Santos, Vanessa Danielle Menjon Muller, Daniela Valcarengi, Juliana Bernardon Pretto Gonçalves & Ednéia Casagrande Bueno

RESUMO - A sífilis é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Treponema pallidum*, cujo diagnóstico incorreto propicia a transmissão da doença via sexual e placentária. O trabalho avaliou comparativamente os testes *Veneral Diseases Research Laboratory* (VDRL) e *Rapid Plasm Reagin* (RPR) na triagem sorológica e determinou a interferência da inativação do soro. Foram empregados reagentes comerciais na avaliação de amostras de soro de 110 indivíduos saudáveis e de 20 pacientes portadores de sífilis, antes e após a inativação a 56°C/30min. O procedimento técnico seguindo as instruções do fabricante mostrou sensibilidade de 100% para ambos os testes, embora 45% das amostras reativas tenham mostrado títulos superiores no VDRL. A especificidade foi de 100% no VDRL e 97,3% no RPR. A inativação do soro mostrou não interferir nos resultados do VDRL, enquanto que o RPR mostrou maior especificidade para amostras inativadas, embora sem diferença significativa ($p=0,248$).

PALAVRAS-CHAVE - inativação, sífilis, teste não treponêmico.

SUMMARY - Syphilis is a chronic infectious illness caused by the *Treponema pallidum*, which incorrect diagnosis propitiates the transmission mainly by sexual contact and from mother to child (trans-placental). The present work evaluated the *Veneral Diseases Research Laboratory* (VDRL) and the *Rapid Plasm Reagin* (RPR) assays and also determined the interference of the serum inactivation. Commercial reagents were used to evaluate sera samples from 110 healthful individuals and 20 patients with syphilis, before and after inactivation at 56°C/30min. In the technical procedure according the manufacturers' instructions, both assays had presented 100% of sensitivity, although 45% of the reactive samples have shown bigger values in VDRL. The specificity was 100% for VDRL and 97.3% for RPR. The serum inactivation showed no interference in VDRL results, while in RPR was observed a greater specificity with inactivated samples, although with no significant difference ($p=0,248$).

KEYWORDS - Inactivation, non treponemic assay, syphilis

INTRODUÇÃO

A sífilis é uma doença infecciosa crônica causada pelo Espiroqueta *Treponema pallidum*, caracterizada por períodos sintomáticos e de latência. A transmissão ocorre frequentemente por via sexual e placentária e o tratamento preconiza o uso de penicilina. Entretanto, mesmo com tratamento eficaz e de baixo custo, a doença tem se manifestado mundialmente em focos endêmicos e eventualmente epidêmicos (PEARCE, 1998).

O cancro duro é a primeira manifestação clínica da sífilis e surge no local da invasão cutânea. De quatro a oito semanas após o aparecimento do cancro duro surgem as manifestações da sífilis secundária com lesões na pele, mucosa, gânglios e meninges. A sífilis latente é o período de quiescência após o final do estágio secundário da doença, durante o qual não há manifestações clínicas. No último estágio da doença, a sífilis terciária, ocorrem desde lesões cutâneas de prognose benigna até lesões neurológicas, cardiovasculares e outras lesões viscerais (MORSE *et al.*, 2003). A sífilis congênita ocorre pela disseminação hematogênica do *T. pallidum* do hospedeiro materno para o feto. O recém-nascido acometido pela doença apresenta lesões típicas decorrentes da endovascularite proliferativa produzida pelo *T. pallidum*, com ceratite intersticial, dentes de Hutchinson, nariz em sela, periostite e uma variedade de anomalias do sistema nervoso central (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 2000).

Atualmente, a sífilis congênita representa uma falha grosseira no sistema de saúde e uma deficiência no processo educacional da população, provocados pela grande parcela da população brasileira que não possui acesso à assistência médica materno-infantil e educacional (GUINS-

BURG *et al.*, 1993; AMARAL *et al.*, 1996; BRASIL, 1997).

Os pacientes portadores de sífilis desenvolvem anticorpos capazes de imobilizar e destruir o *T. pallidum* móvel e livre (NELSON & MEYER, 1949), de interagir com o *T. pallidum* na imunofluorescência indireta (FTA-Abs) (HUNTER; DEACON; MEYER, 1964) e de aglutinar hemácias revestidas com antígeno solúvel de *T. pallidum* (TPHA) (RATHLEV, 1975).

O *T. pallidum* também induz o desenvolvimento de um anticorpo, a reagina, que provoca reação positiva em testes não treponêmicos pela interação com a cardiolipina extraída de tecidos de mamíferos normais (JENUN & OTT, 1991; CAMARGO, 2001). A pesquisa de reagina é utilizada na triagem sorológica da sífilis, enquanto que a identificação do anticorpo antitreponêmico é empregada no diagnóstico confirmatório da doença (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 2000), embora a realização do TPHA também seja recomendada na triagem sorológica (WHO, 1982; DERRICO *et al.*, 1996; CAMARGO, 2001).

Os testes de microfloculação *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) e *Rapid Plasm Reagin* RPR (RPR) são testes não treponêmicos frequentemente utilizados na pesquisa de reaginas. O RPR é uma modificação do VDRL que, além de cardiolipina, colesterol e lecitina contém cloreto de colina, para dispensar a necessidade de inativação da amostra (JENUN & OTT, 1991). Estes testes são empregados na triagem sorológica da sífilis e também na determinação do título de reatividade de anticorpos para acompanhamento do tratamento e avaliação da eficácia do tratamento, uma vez que resposta à terapêutica mostra queda dos níveis de anticorpos nestes testes (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 2000). Ainda, estes testes podem contribuir para o objetivo da Organização Mundial de Saúde

Recebido em 14/03/2006

Aprovado em 08/02/2007

Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí

no protocolo que pretende erradicar a sífilis congênita e do qual o Brasil participa (BRASIL, 1997; TELELAB, 1997). O VDRL e o RPR são testes de execução rápida e simples, mas resultados errôneos podem ser obtidos se não for seguida a padronização determinada para a execução da metodologia (TELELAB, 1997). Esta padronização não é observada em muitos laboratórios, gerando resultados diversos quando uma mesma amostra é testada em diferentes locais, ou quando são usados testes não treponêmicos de diferente procedência na mesma amostra (CAMARGO, 2001; NUNES, 1998). O presente estudo tem como objetivo comparar os testes não treponêmicos VDRL e RPR na triagem sorológica da sífilis e determinar a interferência da inativação do soro nestes testes.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho obteve parecer favorável da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí. Foram analisadas 20 amostras de soro de pacientes portadores de sífilis e outras 110 amostras de soro de indivíduos saudáveis. Os kits comerciais empregados foram VDRL Agglutination test for Syphilis Screening (BioSystems, Barcelona, Espanha) e RPR Pronto para Uso (Bioclin, Belo Horizonte-MG, Brasil). As amostras foram processadas de acordo com as recomendações dos fabricantes, utilizando soros controles positivo e negativo como controle interno da reação. Todas as amostras foram processadas simultaneamente nas concentrações 1/1 e 1/8, evitando assim o fenômeno de pré-zona. As amostras foram ensaiadas antes e após a inativação (56° C durante 30 minutos) para a avaliação da interferência da inativação do soro. As amostras que apresentaram resultado reagente foram submetidas ao teste treponêmico FTA-Abs (Biolab, Rio de Janeiro, Brasil) para a confirmação do resultado.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste de McNemar. Os testes também foram avaliados quanto à eficiência diagnóstica pelos índices de sensibilidade e especificidade (FERREIRA & ÁVILA, 2001).

RESULTADOS

O resultados dos testes com amostras de soro de indivíduos saudáveis e de pacientes com sífilis, executados de acordo com as instruções dos fabricantes, mostram 100% de sensibilidade para ambos os testes e especificidade de 100% e 97,3%, respectivamente para VDRL e RPR (Fig. 1).

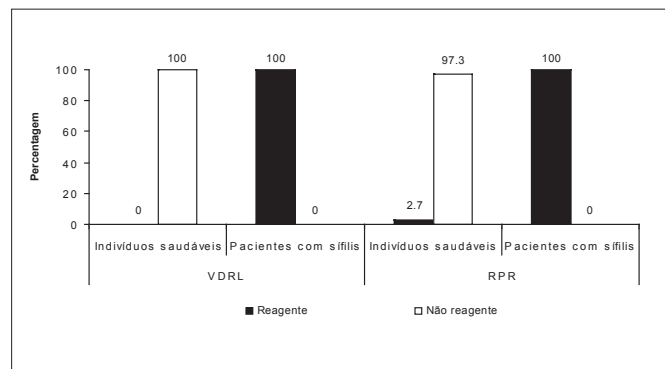


FIGURA 1. Resultados, em percentagem, obtidos nos testes Veneral Diseases Research Laboratory (VDRL) e Rapid Plasm Reagin (RPR) com amostras de soro de 110 indivíduos saudáveis e de 20 pacientes com sífilis, executados de acordo com as instruções dos fabricantes.

As amostras de soro de indivíduos saudáveis e de pacientes portadores de sífilis ensaiadas no VDRL mostraram os mesmos resultados quando testadas inativadas e não inativadas, mantendo os índices de sensibilidade e especificidade de 100% (Fig. 2A). A sensibilidade no RPR também permaneceu em 100% com amostras inativadas e não inativadas, enquanto que a especificidade foi de 100% com amostras inativadas e 97,3% com amostras não inativadas (Fig. 2B).

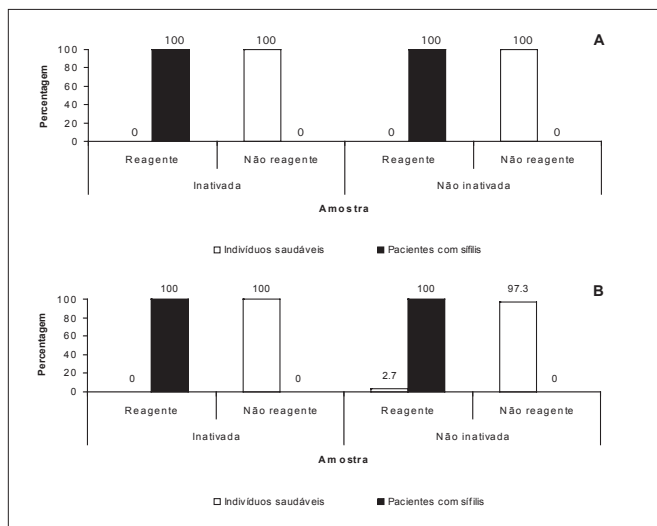


FIGURA 2. Resultados, em percentagem, obtidos nos testes Veneral Diseases Research Laboratory (VDRL) e Rapid Plasm Reagin (RPR) com amostras de soro de 110 indivíduos saudáveis e de 20 pacientes com sífilis, executados de acordo com as instruções dos fabricantes e utilizando amostras antes e após a inativação a 56°C por 30 minutos.

DISCUSSÃO

Embora o VDRL tenha apresentado maior especificidade que o RPR, a análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre os testes ($p = 0,248$). Outros autores também relataram não haver diferença significativa entre os resultados obtidos com estes testes (PHAOSAVASDI *et al.*, 1989; JENUN & OTT, 1991). A avaliação dos títulos dos resultados das amostras reativas revelou que 45% dos pacientes com sífilis apresentaram títulos maiores para o VDRL. O diagnóstico da sífilis recomenda a triagem sorológica com testes não treponêmicos e/ou TPHA, seguido da confirmação dos casos positivos com testes treponêmicos (WHO, 1982; DERRICO *et al.*, 1996; CAMARGO, 2001). Todas as amostras reagentes nos testes não treponêmicos deste estudo foram submetidas ao teste treponêmico FTA-Abs para a confirmação dos resultados. As 20 amostras de pacientes portadores de sífilis apresentaram resultado positivo também no FTA-Abs, enquanto que as 3 (2,7%) amostras de indivíduos saudáveis reativas no RPR foram não reagentes no FTA-Abs, indicando resultado falso-positivo naquele teste. Os resultados falso-positivos nos testes não treponêmicos são justificados pela produção de reaginas contra o material lipídico liberado por células lesadas do hospedeiro (MORSE *et al.*, 2003). As patologias frequentemente relacionadas aos resultados falso-positivos nos testes não treponêmicos incluem doenças autoimunes, malária, infecções virais, bacterianas e câncer (CAMARGO, 2001). No presente estudo não foi possível associar os 3 resultados falso-positivos encontrados à estas causas, assim como, não houve relação à idade avançada e período

gestacional. ROMPALO *et al.*, 1992, relataram incidência de 0,8% de falso-positivos no RPR. Estudos anteriores em nossa população demonstraram que os testes de cardioliipina aplicados em uma população considerada normal apresentam cerca de 1% de resultados falso-positivos (CAMARGO, 2001).

Os relatos na literatura quanto à interferência da inativação do soro nos testes não treponêmicos são escassos. Tem sido amplamente difundido que, para a execução do VDRL, as amostras de soro devem ser inativadas a 56°C durante 30 minutos eliminando assim os interferentes presentes na amostra. Ao contrário, para a execução do RPR as amostras não precisam desta inativação devido à variação dos constituintes da suspensão antigênica utilizada no teste (LARSEN; STEINER; RUDOLPH, 1995; RAVEL, 1995). Embora o procedimento técnico do VDRL recomende a utilização de soro inativado, a utilização de amostras não inativadas pelo aquecimento mostrou os mesmos resultados, mantendo os índices de sensibilidade e especificidade de 100% (Fig. 2A). A sensibilidade do RPR também mostrou não alterar com a inativação das amostras (100%), mas, contrariamente, a especificidade apresentou maior índice com amostras inativadas que não inativadas (100% e 97,3%, respectivamente) (Fig. 2B). Curiosamente, o procedimento técnico de execução do RPR recomenda a utilização de amostras não inativadas. Entretanto, esta variação de especificidade não interfere no diagnóstico, uma vez que todo resultado que for positivo deve ser confirmado por testes treponêmicos. A análise estatística confirmou não haver diferença significativa quanto à inativação da amostra ($p=0,248$).

O presente trabalho sugere que, desde que mantidas as condições ideais de trabalho e seguidas as recomendações do fabricante, os resultados obtidos na execução do VDRL e RPR são concordantes e não sofrem interferência quando à inativação da amostra, contribuindo na triagem sorológica da sífilis.

REFERÊNCIAS

1. AMARAL, E.M.; FAGUNDES, A.; GONÇALES, N.S.L.; PELLEGRINO JR., J.; SOUZA C.A.; SILVA, J.L.P.E. Prevalence of HIV and *Treponema pallidum* infections in pregnant women in Campinas and their association with socio-demographic factors. *São Paulo Medical Journal*, v. 114, p. 1108-1116, 1996.
2. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Análise de relatórios trimestrais de grupos de investigação de casos de sífilis congênita. 1997. Disponível em: <www.aids.gov.br/udtv/dst/anal_relata.htm>. Acesso em: 01 novembro 2005.
3. CAMARGO, M.E. Sífilis. In: FERREIRA A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 215-120.
4. D'ERRICO, M.M.; MARIOTTINI, M.; TOMBOLESI, P.; DI ROSA, S.; PROSPERO, E.; RAFFO, M.; CARLE, F. Syphilis and blood donors: comparison of two different diagnostic strategies. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 12, p. 77-80, 1996.

5. FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Sorologia: importância e parâmetros. In: FERREIRA A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 1-8.
6. GUINSBURG, R.; LEAL, D.; PACHECO, A.A.B.M.; OKIDA, K.; TRIGUEIRO, T.; ALMEIDA, M.F.B.; KOPELMAN, B.I. Sorologia positiva para sífilis no período neonatal: prevalência em maternidade de nível secundário. Associação com fatores de risco maternos e com sorologia positiva para HIV-1. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 39, p. 100-104, 1993.
7. HUNTER, E.F.; DEACON, W.E.; MEYER, P.E. An improved FTA test for syphilis, the absorption procedure (FTA-ABS). *Pub. Health Rep.*, v. 79, p. 410-412, 1964.
8. JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Microbiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 611p.
9. JENUN, P.A.; OTT, T. Comparison of two syphilis antibody assays based on cardioliipin antigen. *National Institute of Public Health Ann.*, v. 14, p. 3-9, 1991.
10. LARSEN, S.A.; STEINER, B.M.; RUDOLPH, A.H. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, p. 1-21, 1995.
11. MORSE, S.; BALLARD, R.; HOLMES, K.; MORELAND, A. Atlas of Sexually Transmitted Diseases and AIDS. St. Louis: Mosby, 2003, 416p.
12. NELSON, R.A.; MEYER, M.M. Immobilization *Treponema pallidum* in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *J. Exp. Med.*, v. 89, p. 369-393, 1949.
13. NUNES, J.P. Contribuição para garantia da qualidade na sorologia da sífilis. Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998, 87p.
14. PEARCE, J.M. A note on the origins of syphilis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v. 64, p. 542-547, 1998.
15. PHASAVASDI, S.; SNIDVONGS, W.; THASANAPRADIT, P.; UNGTHAVORN, P.; BHONGSVEJ, S.; JONGPIPUTVANICH, S.; VEJAJIVA, S.; UDOMSANTISUK, P.; CHITWARAKORN, A.; PANIKABUTRA, K. Rapid plasma reagin test (RPR) compared to venereal diseases research laboratory test (VDRL) for the diagnosis of syphilis in pregnancy. *J. Med. Assoc. Thai.*, v. 72, p. 202-206, 1989.
16. RATHLEV, T. Investigations on in vitro survival and virulence of *T. pallidum* under aerobiosis. *Br. J. Vener. Dis.*, v. 51, p. 296-300, 1975.
17. RAVEL, R. Laboratório Clínico - aplicações clínicas dos dados laboratoriais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, 616p.
18. ROMPALO, A.M.; CANNON, R.O.; QUINN, T.C.; HOOK 3rd, E.W. Association of biologic false-positive reactions for syphilis with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, v. 165, p. 1124-1126, 1992.
19. TELELAB. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS/MS. Diagnóstico sorológico as sífilis. Brasília: Ministério da Saúde, 1997, p. 80.
20. WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Treponemal infection: report of a WHO Scientific Group. Technical report. Series 674, Geneva: World Health Organization, 1982.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Ednéia Casagrande Bueno
Rua Uruguai, 458, bloco 17, Itajaí
CEP 88.302-202 SC - Brasil
Fone 55-47-341-7540, Fax 55-47-341-7501
E-mail: ecbueno@univali.br

IFCC WORLDLAB

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

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

PRÊMIO HOTSOFT INFORMÁTICA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O "Prêmio Hotsoft Informática" - é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o patrocínio da Hotsoft Informática Ltda;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 3.000,00, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC, nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas.

II - DOS OBJETIVOS

- O "Prêmio Hotsoft Informática" tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de soluções que atendam às necessidades dos Laboratórios de Análises Clínicas em qualquer de suas especialidades na área de informática; e
 - 2) Premiar o melhor Programa (Software) inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os Programas (Softwares) inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio Hotsoft Informática, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias do programa original completo em disquete ou CD, com o seu respectivo manual de utilização;
- 3) Os Programas concorrentes deverão ser originais no país e no estrangeiro, não publicados ou comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade, e nem tão pouco já comercializados;
- 4) O Programa premiado será obrigatoriamente divulgado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais Programas selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio, poderão ser divulgados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o programa e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será escolhida antecipadamente e publicada no programa oficial do Congresso;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores Programas apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Hotsoft Informática, e aos outros 02 (dois) será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A Comissão Julgadora anunciará a sua decisão final após avaliar todos os Programas apresentados;
- 5) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio é indivisível e será conferido a apenas um programa, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Programa concorrente ao prêmio, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores do Programa regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) A Hotsoft manterá seção permanente em seu site na internet para divulgar o resumo dos trabalhos inscritos e uma versão demonstrativa dos programas vencedores nas diversas edições do Prêmio;
- 5) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Hotsoft Informática

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue

Seroprevalence of Chagas' disease in blood donor candidates

Adroaldo Lunardelli^{1,2}; Fernanda Pires Borges^{1,3}; Karina Faccio Mello^{1,2} & Adriana Simone Alves Zeferino¹

RESUMO - A doença de Chagas é a infecção tecidual e hematológica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo importante causa de mortalidade de adultos jovens. O diagnóstico da doença de Chagas depende comumente do resultado de provas sorológicas, sendo utilizados testes usando antígenos *T. cruzi*: hemaglutinação passiva (HA), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoenso (ELISA). O objetivo deste estudo foi verificar a soroprevalência da doença de Chagas em 8228 doadores de sangue do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul de Porto Alegre (RS), bem como averiguar a qualidade técnica dos testes utilizados e sua concordância. A prevalência de amostras positivas para *T. cruzi* foi de 0,4% na comunidade analisada, sendo que o teste de ELISA apresenta sensibilidade de 100%, especificidade de 99,9%, eficiência de 99,9% e valor preditivo negativo de 100%. O coeficiente Kappa achado entre os testes de ELISA e HA foi de 99%, mostrando uma concordância quase perfeita. Neste estudo mostra-se a grande qualidade do teste de ELISA, que se apresenta como um ensaio muito adequado para a sorologia anti-*T. cruzi*, já que a correta identificação dos portadores da doença de Chagas é de importância ímpar no que tange à saúde pública e – sobretudo – à triagem de doadores em bancos de sangue.

PALAVRAS-CHAVE - Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, prevalência, banco de sangue.

SUMMARY - Chagas' disease is a tissue and hematological infection caused by flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, an important cause of mortality in young adults. The diagnosis of Chagas' disease depends of the results of serological tests, being utilized tests using antigens *T. cruzi*: indirect hemagglutination (HA), indirect immunofluorescence (IFI) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The aim of this study was verify the seroprevalence of Chagas' disease in 8228 blood donors of São Lucas Hospital of Pontifícia Universidade Católica of Rio Grande do Sul in Porto Alegre (RS), as well like ascertain the technical quality of the tests utilized and its agreement. The prevalence of positive samples for *T. cruzi* was of 0,4% in the community analyzed, being that the test of ELISA presents sensibility of 100%, specificity of 99,9%, efficiency of 99,9% and negative predictive value of 100%. The coefficient Kappa found between the tests of ELISA and HA was of 99%, showing a barely perfect agreement. In our study we show to big quality of the test of ELISA, which is presented like a very adequate assay for the serologic investigation anti-*T. cruzi*, since to correct identification of the porters of the Chagas' disease is of unequal importance in what plays the public health and to the selection of givers in banks of blood.

KEYWORDS - Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, prevalence, blood bank.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é a infecção tecidual e hematológica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) [1], tendo como vetores naturais um grupo de insetos da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* [2], sendo o *Triatoma infestans* vetor mais importante da doença [3]. A doença de Chagas é endêmica somente no continente Americano [4] e conta com 16-18 milhões de pessoas infectadas [5], com aproximadamente 300.000 novos casos por ano [6], sendo importante causa de mortalidade de adultos jovens [7], reduzindo em 13 anos a expectativa de vida [4].

O contato com as fezes ou urina contaminadas do vetor infectado é a causa mais comum de infecção [6], contudo, *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem por vias alternativas, como a contaminação laboratorial acidental, a via oral, o transplante de órgãos [8], a transmissão congênita [9], a transfusão sanguínea [10], a atividade sexual, o uso de drogas intravenosas e o leite materno [11]. Um grande desafio que o atual estágio de controle da doença de Chagas determina é, sem dúvida, a instituição de um sistema de vigilância operante que revele de forma rápida casos esporádicos de transmissão. Estes devem ser tratados de forma diferenciada, exigindo conhecimento técnico, destreza e rapidez, tanto no diagnóstico clínico e laboratorial quanto no

seu encaminhamento e acompanhamento pelo sistema de saúde local [12].

Na evolução natural da doença de Chagas se distinguem três fases. A fase aguda, qualquer que seja a via de contágio, se inicia no momento em que se adquire a infecção e dura de dois a quatro meses, com pouca manifestação clínica e elevada parasitemia. A fase intermediária é assintomática e pode perdurar por toda a vida [13]. A fase crônica da doença se desenvolve em 30-40% dos pacientes infectados e corresponde à lenta destruição das células infectadas pelo parasita [14]. Há importante cardiopatia [15], agravada pelo desenvolvimento de reações autoimunes e, em menor extensão, dano intestinal [14] e no sistema nervoso autônomo [7]. A fase crônica da doença é altamente incapacitante podendo induzir à falência cardíaca e à morte [14].

O envolvimento cardíaco é a maior causa de morbidade e mortalidade da doença pelos diferentes níveis de dano no sistema de condução e pela ocorrência de falência cardíaca nos casos mais severos [16]. O transplante cardíaco é considerado controverso pela interação dos imunossuppressores com a parasitemia [17].

O diagnóstico da doença de Chagas depende comumente do resultado de provas sorológicas, sobretudo na fase crônica da infecção parasitária. A disponibilidade de tais procedimentos não só possibilita o reconhecimento etiológico, como também permite, entre outras utilidades, realizar in-

Recebido em 22/06/2006
Aprovado em 08/02/2007

¹Bioquímicos do Setor de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

²Mestre em Biologia Celular e Molecular (PUCRS)

³Mestre em Bioquímica (UFRGS)

quérito epidemiológico, controle de tratamento específico e triagem de doadores de sangue [18]. Proeminentes na prática clínica, são utilizados testes sorológicos usando antígenos *T. cruzi*: hemaglutinação passiva (HA), imunofluorescência indireta (IFI) e enzimaímmunoensaio (ELISA) [19]. O intento deste desígnio é averiguar a soroprevalência da doença de Chagas em doadores de sangue de Porto Alegre (RS), bem como averiguar a qualidade técnica dos testes utilizados e sua concordância.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em doadores de sangue do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – RS) no período de maio de 2005 a abril de 2006. A inclusão de indivíduos na população de doadores depende de aprovação clínica e sorológica. Se aprovado clinicamente, a doação é realizada devendo uma amostra de sangue ser investigada nos testes de triagem sorológica [20].

Segundo a Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, o sangue total e seus componentes não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais não reagentes nos testes de detecção para hepatite B, hepatite C, HIV I/II, doença de Chagas, sífilis e HTLV I/II. Para este estudo foram utilizados três testes de distintas metodologias para detecção de *T. cruzi*: ELISA (Chagatek Biomérieux), HA (Hemacruzi Biomérieux) e IFI (Imunocruzi Biomérieux).

Foram analisadas todas as 8228 amostras doadas no período. Para análise dos ensaios foram considerados os parâmetros sorológicos de sensibilidade e especificidade, bem como o teste de coeficiente Kappa e a prevalência na população analisada. Foram considerados como reagentes para a doença Chagas aquelas amostras positivas no teste de IFI. O teste de imunofluorescência para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* tem sido considerado como teste de referência na sorologia da doença de Chagas [21].

RESULTADOS

As análises dos dados obtidos com o manejo das 8228 amostras testadas mostram que o teste de enzimaímmunoensaio apresenta sensibilidade de 100%, especificidade de 99,9% e uma eficiência de 99,9%, como elucida a tabela I. O teste HA apresenta sensibilidade de 74,2%, especificidade de 99,9% e uma eficiência de 99,9% (tabela II) nas amostras analisadas.

A prevalência de amostras positivas para *T. cruzi* foi de 0,4% na comunidade analisada. A prevalência sorológica do teste de ELISA foi de 0,5%.

O coeficiente Kappa foi utilizado para verificar a concordância entre dois testes diagnósticos. Esse índice leva em consideração a proporção total de concordâncias observadas e a proporção de concordâncias que seriam esperadas por pura casualidade [20]. O coeficiente Kappa achado entre os testes de ELISA e HA foi de 99%, mostrando uma concordância quase perfeita.

Tabela I
Análise sorológica pelo teste de ELISA na presença ou ausência da doença.

		Chagas positivo		Total
		Presente	Ausente	
ELISA	Reagente	31	6	37
	Não-reagente	0	8191	8191
	Total	31	8197	8228

Tabela II
Análise sorológica pelo teste de HA na presença ou ausência da doença.

		Chagas positivo		Total
		Presente	Ausente	
HA	Reagente	23	2	25
	Não-reagente	8	8195	8203
Total		31	8197	8228

DISCUSSÃO

A transfusão sanguínea é o segundo modo mais importante de transmissão da doença de Chagas na América Latina [22] depois da vetorial. O risco de infecção via transfusão de sangue contaminado é de 12-25%, sendo o desafio dos bancos de sangue a identificação e a exclusão de portadores assintomáticos e crônicos do parasita [23]. Deve se considerar que todos os produtos sanguíneos de um doador soropositivo para *T. cruzi* podem ser infectantes [24], com exceção dos derivados sanguíneos em cujo preparo são submetidos a processos físico-químicos de esterilização (tais como a albumina e a imunoglobulina humana normal ou gamaglobulina) [25].

Além da triagem clínica e epidemiológica, a triagem sorológica tem um papel de destaque na prevenção da doença transfusional [21]. A detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* na investigação sorológica é o método de escolha para o diagnóstico etiológico da doença de Chagas na fase crônica, considerando a especificidade e a sensibilidade dos testes usados na análise clínica de rotina [19]. Muito se tem discutido sobre os critérios de seleção quando são utilizados testes que pesquisam anticorpos IgG contra determinados patógenos. O enfoque da discussão é relevante, pois muitas vezes a presença desses anticorpos refere-se a infecções passadas e já tratadas, não implicando risco transfusional [21].

O teste ideal para diagnóstico deve ter alta sensibilidade e alta especificidade [23] e, devido à sua importância para fins diagnósticos, a sorologia da doença de Chagas deve se apoiar em testes de alta fidedignidade, uma vez que falsos resultados negativos podem produzir infecções por transfusão de sangue e os falsos resultados positivos podem ter sérias implicações pelos problemas pessoais e sociais não raramente acarretados aos portadores de resultados sorológicos positivos [26].

A prevalência de amostras soropositivas em bancos de sangue de países como a Argentina, o Brasil e o Chile, caíram de 5-25% na década de 80 para 1-5% nos anos 90 [14]; sendo que, já nos anos 2000, estudos mostram prevalência de 2,66% na Argentina [23], 1,6% no México [4] e 1,17% no Brasil [1]. Neste trabalho, a prevalência foi de 0,4%, mostrando que na comunidade analisada parece haver certa competência no controle da doença, já que a prevalência mostrou-se inferior aos demais casos. Dentre os 8228 doadores incluídos na pesquisa, não houve casos de resultados negativos para o teste de ELISA na presença da doença, repercutindo numa elevada sensibilidade diagnóstica e valor preditivo negativo (100%) para o ensaio imunoenzimático. Neste estudo mostra-se a grande qualidade do teste de ELISA, que se apresenta como um ensaio muito adequado para a sorologia anti-*T. cruzi*, uma vez que mostra sensibilidade de 100% e especificidade de 99,9% nas amostras analisadas, apontando a metodologia com eficiência de 99,9%. Além disso, encontramos concordância de 99% en-

tre os testes de ELISA e HA, mostrando uma aparente equivalência entre ambos. É importante ressaltar, contudo, que o teste de HA não apresenta desempenho igual ao enzimático, uma vez que sua sensibilidade foi de 74,2% em nosso estudo. Embora a especificidade do HA tenha sido de 99,9% neste trabalho, convém frisar que com frequência costuma ocorrer reação falsa-positiva relacionada com outras doenças como a leishmaniose, especialmente a visceral [18], e as formas cutâneo-mucosas da leishmaniose tegumentar. Esta reatividade cruzada é devida a antígenos comuns de *T. cruzi* e *Leishmania* sp.. Muitos estudos já reportaram resultados satisfatórios em sensibilidade e especificidade de diferentes testes comerciais de enzima-imunoenensaio e a baixa sensibilidade da hemaglutinação [23]. As drogas utilizadas na fase aguda têm baixa eficácia na capacidade de erradicar definitivamente o protozoário do paciente, sendo a orientação sobre saúde pública a via mais eficiente para o controle da doença [17]. As ações de controle da doença de Chagas estão entre as que apresentaram intervenções com alta efetividade. O controle triatomínico mostra-se de menor custo em relação aos gastos com a atenção ao paciente chagásico [12]. Pode-se evitar cerca de 73% dos casos da doença quando da eliminação ou controle do vetor [27]. Ao conseguir-se e manter-se a interrupção da transmissão vetorial, pode-se prever redução progressiva da transmissão transfusional, que tende a ser cada vez mais controlada na medida em que o sistema de saúde melhore a qualidade do sangue, particularmente por causa do temor da AIDS. Por outro lado, com a redução geral da incidência da doença de Chagas, torna-se cada vez menos frequente o ingresso de chagásicos no grupo etário de pessoas que doam sangue, em paralelo com a saída progressiva de infectados do rol de doadores – por idade ou por morbimortalidade devida à doença [25]. A transmissão da doença de Chagas declinou significativamente nos últimos trinta anos no Brasil e em grande parte da América Latina [12]. A correta identificação dos portadores desta enfermidade é de importância ímpar no que tange à saúde pública e – sobretudo – à triagem de doadores em bancos de sangue. Metodologias apropriadas para tal abundam no mercado, sendo o teste de ELISA uma grande opção se levado em consideração seu desempenho metodológico. Estudos de metodologia e epidemiologia, como este, garantem informações preciosas acerca da esperada regressiva de doentes na comunidade e do desempenho dos testes que comumente são utilizados.

REFERÊNCIAS

- [1] Silveira HJ, Mozart ON, Norberg AN, Pile EA. Trypanosoma cruzi prevalence and clinical forms in blood donor candidates in Brazil. Rev Saúde Pública 2003;37(6):807-9.
- [2] Antunes LJ, Matos KTF. Imunologia Médica. São Paulo: Atheneu; 1992.
- [3] Lorenzo MG, Lazzari CR. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by Triatoma infestans, vector of Chagas disease. Acta Tropica 1999;72:241-249.
- [4] Bracho CG. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. TRENDS in Parasitology 2001;17(8):372-376.
- [5] Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FHM, Castro SL. Treatment of Trypanosoma cruzi-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. Journal of Ethno-Pharmacology 2006;103:187-193.
- [6] Dutra WO, Rocha MOC, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. TRENDS in Parasitology 2005;21(12):581-587.
- [7] Miziara AN, Molina RJ, Ferreira BDC, Barbosa CJDG, Silva VJD, Prata A, Correia D. Cardiac autonomic modulation in hypertensive patients with Chagas' disease. Acta Tropica 2006;97:188-195.
- [8] Gomes YM, Pereira VRA, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MNDS, Ferreira AGP, Silva ED, Ogatta SFY, Krieger MA, Goldenberg S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96(4):497-501.
- [9] Nisida IVV, Amato Neto V, Braz LMA, Duarte MIS, Umezawa ES. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in São Paulo city, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1999;41(5):305-311.
- [10] Padilla VMM, Becerril NH, Bracho CG, Encina JLR, López PAR. American Trypanosomiasis (Chagas' disease) and blood banking in México City: seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. Archives of Medical Research 1999;30:393-398.
- [11] Wild D. The immunoassay handbook. 2ª edition. London: Nature Publishing Group; 2001.
- [12] Araújo SM, Gomes ML, Ortiz M, Costa AL, Membrive UA, Toledo MJO, Guilhaume ALF. Doença de Chagas em crianças no Estado do Paraná, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas 2004;36(3):151-153.
- [13] Arrieta R, Daquino B, Rosso N, Ferreras MG, Juárez N. Evaluación de una metodología de temizaje en la enfermedad de Chagas en San Luis, Argentina. Salud Pública de México 2004;46(5):430-437.
- [14] Dumonteil E. Update on Chagas' disease in Mexico. Salud Pública de México 1999;41(4):322-327.
- [15] Zulantay I, Arribada A, Honores P, Sánchez G, Solari A, Ortiz S, Osuna A, Rodríguez J, Apt W. La mejoría electrocardiográfica con el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, es independiente de la persistencia de Trypanosoma cruzi. Rev Méd Chile 2005;133:1153-1160.
- [16] Tostes Jr. S, Rodrigues DBR, Pereira GA, Rodrigues Jr. V. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. International Journal of Cardiology 2005;99:233-237.
- [17] Fiorelli AI, Stolf NAG, Honorato R, Bocchi E, Bacal F, Uip D, Strabelli T, Issa V, Amato VA, Fiorelli LR, Oliveira SA. Later evolution after cardiac transplantation in Chagas' disease. Transplantation Proceedings 2005;37:2793-2798.
- [18] Amato Neto V, De Marchi CR, Ferreira CS, Ferreira AW. Observações sobre o TESA blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2005;38(6):534-535.
- [19] Ferreira AAP, Colli W, Costa PI, Yamanaka H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. Biosensors and Bioelectronics 2005;21:175-181.
- [20] Carvalho PG, Andrade FB, Dias ATN, Heukelbach J, Carvalho FC, Queiroz JAN. Avaliação do emprego de teste combinado antígeno/anticorpo na identificação de infecção recente de HIV I/II em doadores de sangue. Revista da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas 2005;37(3):169-174.
- [21] Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- [22] Becerril NH, Mejía AM, Verdugo MAB, Murillo VG, Toquero EM, López R, Trevethan S, Cardenas M, Reyes PA, Hirayama K, Monteón VM. Blood transfusion and iatrogenic risks in Mexico city. Anti-Trypanosoma cruzi seroprevalence in 43048 blood donors, evaluation of parasitemia, and electrocardiogram findings in seropositive. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100(2):111-116.
- [23] Blejer JL, Saguier MC, Salamone HJ. Antibodies to Trypanosoma cruzi among blood donors in Buenos Aires, Argentina. Int J Infect Dis 2001;5:89-93.
- [24] Monteón VM, López PAR, Palacio AS, Tello GL, Murguía JM, Jurado FS. Distribución heterogénea de la prevalencia de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en donadores de sangre en Puebla, México. Salud Pública de México 2005;47(2):116-125.
- [25] Bonametti AM, Castelo Filho A, Ramos LR, Baldy JLS, Matsuo T. Infecção por Trypanosoma cruzi em candidatos a doador de sangue. Rev Saúde Pública 1998;32(6):566-71.
- [26] Camargo ME, Hoshino-Shimizu S, Macedo V, Peres BA, Castro C. Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo Trypanosoma cruzi. Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e flocculação, em 3624 soros. Rev Inst Med Trop São Paulo 1977;19(4):254-260.
- [27] Segura EL, Escobar-Mesa A. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el estado de Veracruz. Salud Pública de México 2005;47(3):201-208.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Adriana S. A. Zeferino
Laboratório de Patologia Clínica; Hospital São Lucas da PUCRS
Av Ipiranga 6690 - 3º andar - Bairro Jardim Botânico
CEP 90610000 Porto Alegre - RS
E-mail: adrianasalves@terra.com.br

PRÊMIO NEWPROV

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio NEWPROV é promovido pela **Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC**, com o patrocínio da NEWPROV PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 2.000,00 dois mil reais, na data da outorga, além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio NEWPROV tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Microbiologia no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho sobre Microbiologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio NEWPROV poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio NEWPROV, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio NEWPROV é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio NEWPROV obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio NEWPROV

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Teníase na população do bairro Nossa Senhora Aparecida, município de Correia Pinto - SC, em 2003 e 2004*

Taeniasis in the population of Nossa Senhora Aparecida district, county of Correia Pinto - SC, in 2003 and 2004

Aloisio Alberto Piroli Silva¹ & Marcos Vinícius da Silva²

RESUMO - O presente trabalho foi realizado entre dezembro de 2003 e janeiro de 2004. Teve como objetivo avaliar a ocorrência de teníase nessa população. Participaram do estudo 628 pessoas, dessas, 16 (2,5%) eram portadores de teníase. Praticamente a metade dos casos de teníase ocorreram em indivíduos na faixa etária entre os 30 a 49 anos (49,9%). Ocorreu associação entre existência de hortas e adubação, com os casos de teníase ($p < 0,001$). O consumo de carne de porco "mal passada", também apresentou significância estatística ($p = 0,003$). A presença de sintomas estava associada aos casos com teníase ($p = 0,004$). Constatou-se ainda, que as pessoas que apresentaram teníase tinham maior chance de possuir outras enteroparasitoses ($p = 0,038$). O maior problema do bairro é a falta de infra-estrutura sanitária, possibilitando a exposição das pessoas e dos animais, ao esgoto a céu aberto, favorecendo a manutenção do complexo teníase/cisticercose. Desta forma, para interromper essa cadeia de transmissão faz-se necessária a melhoria da infra-estrutura sanitária e intensificação das ações preventivas e educativas em saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE - Teníase, Complexo teníase/cisticercose, Enteroparasitoses, Estudo Epidemiológico.

SUMMARY - The present study was done from december, 2003 to january, 2004. The main objective of this research was to evaluate the occurrence of taeniasis among its population. 628 people took part in the study, being 16 (2,5%) of the participants carriers of taeniasis. Almost half of the cases of taeniasis were found among individuals around the age of 30 to 49 years (49.9%). A correlation between the existence of vegetable gardens and adubation and the cases of taeniasis was found ($p=0.001$). The consumption of raw pork meat was found to be statistically significant ($p=0.003$). The symptoms were associated with cases of taeniasis ($p = 0.004$). It was also found that those who had taeniasis had a higher chance of having other enteroparasites ($p=0.038$). The most important problem in the neighborhood is the lack of sanitary infrastructure, forcing people and animals to the open contact with landfills and sewage contamination, and therefore favouring the maintenance of the complex taeniasis/cysticercose. In order to end this transmission chain, it is necessary that a sanitary infra-structure is implemented and that preventive and educational actions in public health be intensified.

KEYWORDS - Taeniasis, complex taeniasis/cysticercose, enteroparasites, epidemiologic study.

INTRODUÇÃO

A teníase, doença humana causada pela fase adulta dos helmintos do gênero *Taenia*, é um problema de saúde pública, existente tanto em áreas urbanas como rurais principalmente onde as condições sanitárias são precárias, favorecendo, tanto a transmissão, como a manutenção do complexo teníase/cisticercose, pois permitem que a carne parasitada com o cisticerco esteja disponível ao consumo.¹⁶ Aliado a isso é comum encontrar-se pessoas que preferem consumir carne de porco com "pipoca" (cisticercos), bem como, crua ou mal cozida, em comunidades carentes e de baixo padrão socioeconômico. Desta forma, a transmissão da cisticercose (estágio da doença onde os cistos alojam-se nos músculos, vísceras e cérebro humano), é facilitada pela disponibilidade de ovos da *T. solium* na água e nos alimentos, que eventualmente possam ser consumidos tanto pelo homem, quanto pelo porco.¹³

A infecção nos porcos é facilitada pelo hábito da coprofagia inerente neste animal. No homem, além da infecção causada pela ingestão ocasional de alimentos e água contaminados, pode ocorrer a auto-infecção.¹⁴

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, sob registro nº 03.048.4.06.III.

As amostras de fezes somente foram obtidas, após a concordância dos participantes, com as especificações, contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da UNISUL.

A casuística foi estabelecida levando-se em consideração a população do bairro, segundo os dados do Programa da Saúde da Família - PSF e calculado o tamanho da amostra que fosse representativa^{1,5}. Os participantes foram selecionados, aleatoriamente, a partir da quinta casa do bairro. Por meio de sorteio, foram selecionados dois moradores de cada casa, totalizando 680 pessoas de 340 residências.

Foram realizadas visitas nas casas pré-selecionadas com a finalidade de realizar: 1) Cadastro dos indivíduos que se propuseram a participar do referido estudo e que preenchiam os requisitos pré-estabelecidos; 2) Preenchimento do questionário para avaliar condições de saneamento e socioeconômicas (critério Brasil); 3) Entrega de três recipientes para coleta das fezes em dias consecutivos, previamente identificados com etiquetas; 4) Esclarecimento quanto aos procedimentos de coleta e armazenamento do material biológico; 5) Agendamento da data para receber o material biológico.

Foram empregados para a coleta das amostras, potes plásticos de primeiro uso, sem contato manual prévio, identificados com etiqueta contendo o nome do paciente, código de identificação e data. Os potes plásticos foram fornecidos pelo pesquisador.

As amostras de fezes foram colhidas no volume total de sua

Recebido em 03/05/2006

Aprovado em 30/01/2007

TÍTULO ABREVIADO EM RODAPÉ: Teníase Humana, Correia Pinto/SC

*Artigo baseado em dissertação de mestrado em Saúde Coletiva da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, 2005.

¹Mestre em Saúde Coletiva da Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL; ²Professor Doutor, Orientador do Mestrado em Saúde Coletiva da Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL.

evacuação, em dias consecutivos, totalizando três dias. Das amostras coletadas, uma alíquota de 2 a 4 gramas, foi destinada para o exame de sedimentação espontânea¹⁰, outra alíquota de 8 a 10 gramas, para o exame de Baermann-Moraes¹¹ e o restante, para o exame de Tamisação¹¹. Estes exames foram processados no mesmo dia das coletas. Foram realizadas sempre duas leituras de cada preparação, uma sem coloração e outra corada com lugol. Os métodos laboratoriais utilizados são considerados eficazes para a detecção da maioria dos helmintos e protozoários.¹¹

RESULTADOS

Das 628 pessoas estudadas, em 16 (2,5%) foi diagnosticado teníase. Os casos de teníase encontrados foram em pessoas com idades abaixo dos 50 anos, concentrando-se na faixa etária entre os 30 a 50 anos (49,9%). A distribuição etária dos casos de teníase é apresentada na Tabela 1:

Tabela 1
Distribuição etária dos casos de teníase na população do Bairro Nossa Senhora Aparecida, Município de Correia Pinto/SC - dezembro de 2003 a janeiro de 2004.

Idade/anos	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
00-09	1	6,3
10-19	2	12,5
20-29	3	18,7
30-39	3	18,7
40-49	5	31,2
50-59	0	0,0
60-69	1	6,3
≥ 70	1	6,3
Total	16	100

$p = 0,014$

Embora o sexo feminino (60,2%) tenha predominado, não houve significância estatística, quanto ao sexo e a ocorrência de teníase, o que não diferiu substancialmente do descrito na literatura consultada.

Apenas nos estudos de Gomes *et al*⁸, investigando a teníase e cisticercose em área rural do nordeste brasileiro, constataram participação de 48,9% de mulheres, sendo que, 70,5% dos investigados eram habitantes da zona rural.

Sobre a participação étnica, embora entre os casos com teníase o percentual na raça negra tenha sido de 12,5%, e, se comparado com o censo demográfico de 2000, do IBGE, quase três vezes maior que a distribuição demográfica da raça negra no Município (4,5%), esses dados não foram estatisticamente significantes, ($p = 0,059$). Pode-se atribuir ao acaso este achado. Na literatura consultada não se encontrou citação sobre a distribuição étnica.

Foi observado dois casos de teníase numa mesma família, por isso considerou-se 15 residências com 16 casos. Em todas estas casas, constatou-se a existência de hortas e a prática freqüente da adubação ($p < 0,001$).

Sobre os hábitos alimentares concernentes às preferências por carne, todos os indivíduos com teníase eram consumidores re-

gulares desse alimento. Desses, 11 (68,7%), referiram preferência pela carne de porco, sendo que um deles, declarou ser apreciador da carne de porco com "pipoca". Dos 16 portadores de teníase, três (18,7%), declararam sua preferência pelo consumo de carne de porco "mal passada" ($p = 0,003$).

Entre as 15 residências, o esgoto era destinado à fossa, em 11 (73,4%) casas, despejado a céu aberto em duas (13,3%) e em patentes, nas duas (13,3%) restantes. A coleta pública do lixo era a mais utilizada em 13 (86,6%) das casas, sendo que nas restantes, em uma (6,7%), o lixo era queimado e na outra (6,7%), despejado a céu aberto.

Na estratificação social das famílias dos casos de teníase, 12 (80,0%), pertenciam à classe D e três (20,0%) à classe E.

Nos indivíduos com teníase a referência de sintomas clínicos foi mais freqüente quando comparado aos sem teníase ($p = 0,004$). A ocorrência de outras enteroparasitoses também foi mais freqüente nos indivíduos com teníase ($p = 0,038$).

DISCUSSÃO

A teníase foi mais freqüente entre os 30 a 49 anos, 49,9% ($p = 0,014$) (Tabela 1). Fato semelhante aos da maioria dos estudos consultados na literatura.^{2,6,7,8}

Comparando-se as faixas etárias, observamos que os casos de teníase no Bairro foram 4,7 vezes maiores, que o percentual de população, para a mesma faixa de idade, no município, (10,5%).

Observou-se que todos os casos com teníase ocorreram em integrantes de famílias carentes, 12 (80,0%), eram da classe D e três (20,0%) da classe E. Garcia *et al*⁶, afirmaram que a condição socioeconômica é um dos fatores críticos na perpetuação do ciclo teníase/cisticercose.

Antecedendo ao período de realização do estudo, foi instalado na região mais elevada do Bairro um conjunto habitacional popular com deficiente infra-estrutura sanitária. Os rejeitos gerados pelos moradores do referido conjunto acabavam por agravar os problemas de contaminação ambiental da região mais baixa que se localizava entre dois rios, portanto, sujeita a alagamentos.

Pela não existência de rede de esgoto no local, a população fazia uso de fossa (73,4%), patentes (13,3%) e despejo a céu aberto (13,3%), contaminando os córregos e mananciais de água da localidade.

Silva-Vergara *et al*¹⁷, mostraram que as condições sanitárias deficientes estavam associadas, estatisticamente, com história pregressa ou atual de teníase.

Segundo Vázquez-Flores *et al*¹⁹, infra-estrutura sanitária adequada, associada às campanhas de noções higiênico-sanitárias entre os socialmente menos favorecidos, mostrou-se fundamental para a erradicação das doenças enteroparasitárias.

O estudo mostrou que todos os casos com teníase ocorreram entre moradores de casas que mantinham pequenas hortas de fundo de quintal. Nessas, a utilização de adubo pelos moradores, apresentaram associação ($p < 0,001$) com a ocorrência de teníase.

É comum na localidade, terrenos com hortas ao lado de valas onde o esgoto corre a céu aberto. Em algumas situações, por desnível do terreno, as valas atravessam as áreas mais baixas, contaminando o ambiente. Considerando que a delimitação dos lotes e mesmo, das hortas era precário, o trânsito de animais, especialmente porcos, também era comum, favorecendo a perpetuação do complexo teníase/cisticercose.

Segundo Garcia *et al*⁶, existe associação direta entre a infecção humana e a suína, principalmente em locais onde os

mesmos co-existem. Os autores afirmaram que, eram fatores que contribuíam para a manutenção do ciclo da teníase/cisticercose, a criação de porcos em condições inadequadas, condições sanitárias precárias e desconhecimento do ciclo de vida da tênia.

A preferência pela carne de porco "mal passada" foi manifestada por 25% dos casos com teníase, o que pode implicar na maior possibilidade de adquirir teníase ($p = 0,003$). Almeida *et al*¹, afirmaram que o freqüente consumo de carne de porco, associado à falta de inspeção da carne comercializada, pode propiciar um ambiente favorável ao surgimento do complexo teníase-cisticercose.

Garcia *et al*⁷, associaram a criação, o abate, o manuseio e a comercialização de suínos, sem controle sanitário, com o risco de infecção por *T. solium*. Em diversos trabalhos, encontra-se associação entre soropositividade para teníase, história de eliminação de proglotes, freqüente consumo de carne de porco e precárias condições socioeconômicas e de higiene.^{14,15, 17}

Segundo Renúncio¹², a existência de cisticercose em bovinos e suínos, poderia ser considerado como indicativo fiel da ocorrência de teníase em humanos. De acordo com o autor, não obstante o desenvolvimento alcançado pela suinocultura catarinense nas últimas décadas; o Estado de Santa Catarina tem apresentado taxas expressivas de ocorrência de cisticercose em bovinos. Quando observados os dados regionais, a condenação das carcaças bovinas contaminadas, em Lages/SC, chegou a 8,22% entre os anos de 1987 e 1991, período em que, entre os suínos, houve decréscimo de 0,07% para 0,02%. Observou-se que os índices de infecção entre os suínos foi reduzindo sensivelmente e entre os bovinos ocorreu elevação considerável, colocando os bovinos no foco das preocupações sobre possível relação com a transmissão e manutenção do complexo teníase/cisticercose, em nosso meio. Esse autor afirma, ainda, que a transmissão da teníase por *T. solium* por meio dos bovinos é possível e cita, no seu estudo, que este fato já foi observado na Universidade do México, em 1994.

Estudo semelhante, realizado por Gusso *et al*⁹, em 2000, demonstrou 100% de infecção em gado bovino, com ovos de *T. solium* e obtenção de 40,9% de cisticercos vivos, após 160 a 570 dias, mostrando com isto a possibilidade de que o gado bovino sirva como substituto do suíno na transmissão para o homem da *T. solium*. Tal constatação poderia justificar a ocorrência do complexo teníase/cisticercose na região, uma vez que, diferentemente do oeste catarinense, onde a suinocultura é predominante, na serra catarinense, a pecuária é, ao lado da madeira e do papel, a principal atividade econômica.

Outra variável investigada foi à sintomatologia, uma vez que existiam informações de casos de epilepsia, teníase e neurocisticercose no Bairro, informadas pelos agentes comunitários, integrantes do Programa de Saúde da Família – PSF. Notou-se que os sintomas estavam diretamente associados à teníase ($p = 0,004$). Almeida *et al*¹, destacaram, em seu levantamento, que 47,3% dos entrevistados citaram dor de cabeça freqüente, em pelo menos um indivíduo da família, 2,8% relataram ataque epilético, 6,6% desmaios e 14,9% teníase. Silva-Vergara *et al*¹⁷, em 1998, mostraram, em seu estudo, correlação entre teníase e convulsões ($p < 0,0001$), sendo que o risco relativo de convulsões foi de 2,3 vezes maior entre os moradores entrevistados no domicílio e 1,7 entre os indivíduos que compareceram para exame clínico.

A exemplo do estudo realizado na Indonésia¹⁸, onde encontrou-se 0,72% de ocorrência de teníase, em sua maioria, nos trabalhos semelhantes a esse, desenvolvidos na Índia, África

e Américas, a ocorrência de teníase, variou entre 0,13 a 2,0%, portanto, abaixo dos valores aqui encontrados, de 2,5%.

Se compararmos o relatório apresentado por Apt³, no do X Congresso Peruano de Gastroenterologia e V Congresso Peruano de Endoscopia Digestiva, em 1986, onde o autor afirmou que a teníase apresenta taxa média de 0,6%, na América Latina, observa-se que o Bairro Nossa Senhora Aparecida apresenta quatro vezes mais casos (2,5%), que a média Latina.

Desta forma, conclui-se que falta aos habitantes do Bairro Nossa Senhora Aparecida, melhoria na infra-estrutura sanitária e incremento nas políticas assistenciais à saúde e educação, bem como incrementar os programas governamentais de desenvolvimento econômico da região, fatores necessários para eliminar a ocorrência e perpetuação de enteroparasitoses, principalmente em populações excluídas socialmente.

Com relação às pessoas cujas amostras fecais apresentaram enteroparasitas, as mesmas foram encaminhadas ao posto de saúde local, onde, por termo de cooperação de atendimento médico, firmado entre o pesquisador e o Secretário da Saúde do Município, foram atendidas pela equipe de saúde, recebendo atendimento médico, farmacêutico e sanitário adequado.

REFERÊNCIAS

1. Agresti A. Categorical Data Analysis. New York.: Wiley. 558p.; 1990.
2. Almeida LP, Franceschini SCC, Priore SE, Ribeiro SMR, Castro LCV. Fatores predisponentes à ocorrência do complexo teníase-cisticercose, em município do sudeste do Brasil. Rev Hig Alim 2001; 80/81: 34-8.
3. Apt W. Helminthiasis intestinales humanas em America Latina. Prevalência actual y sus factores contribuyentes. In: X Congreso Peruano de Gastroenterologia y V Congreso Peruano de Endoscopia Digestiva 1986; Lima, Peru: 1987;155-66.
4. Campos L, Terra RM. Teníase/Cisticercose no Estado de Roraima. Rev Hig Alim 2000; 72 (11): 17-26.
5. EPI-INFO 6.04. Word Processing And Statical Program for Public Health. The division of Surveillance and Epidemiology. CDC. Atlanta: USA, 1996.
6. Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Pacheco R, Verastegui M, Tsang VCW. Human and porcine Taenia solium infection in a village in the higlands of Cusco, Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru. Acta Tropica 1995; 73(1):31-6.
7. Garcia HH, Araoz R, Gilman RH, Valdez J, Gonzalez AE, Gavidia C, et al. Increased prevalence of cysticercosis and taeniasis among Professional fried pork vendors and the general population of a village in the peruvian highlands. The cysticercosis working group in Peru. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(6): 902-5.
8. Gomes I, Veiga M, Embiruçu EK, Rabelo R, Mota B, Meza-Lucas A, et al. Taeniasis and Cysticercosis prevalence in a smal village from northeastern Brazil. Arq Neuro-Psiquiatr São Paulo 2002; 60(2A): 219-23.
9. Gusso RLF, Minozzo JC, Thomaz-Soccol V, Camargo NJ, Lopes CM. Experimental Infection of Cattle with Eggs of Taenia Solium. Arc Vet Scien 2000; 5:23-7.
10. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in Schistosomiasis mansonii. Puerto Rico J of Pub Health Trop Med 1933; 22: 282-91.
11. Neto VA, Corrêa LL. Exame Parasitológico das Fezes. São Paulo: Sarvier; 1991.
12. Renúncio A. Complexo Teníase Cisticercose em Santa Catarina. Rev Bras Parasit Vet 1997; 6 (2 supl.1): 447-51.
13. Sánchez AL, Medina MT, Lungström I. Prevalence of taeniasis and cysticercosis in a population of urban residence in Honduras. Acta Trop 1998; 69(2): 141-9.
14. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, et al. Prevalence and risk factors for Taenia solium taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. Am J Trop Med Hyg 1992; 46(6): 677-85.
15. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez OI, Aguilera J, et al. Epidemiological investigation of Taenia solium taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, México. Trans Royal Trop Med Hyg 1994; 88: 49-52.
16. Sarti E. La teniosis y cisticercosis por Taenia solium. Sal Púb Mex 1997; 39: 225-31.
17. Silva-Vergara ML, Prata A, Silveira Netto HV, Vieira CO, Castro JH. Risk factors associated with taeniasis-cysticercosis in Lagamar, Minas Gerais State, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 1998; 31 (1): 65-71.
18. Sutisna IP, Fraser A, Kapti N, Rodriguez-Canul R, Widjana DP, Craig OS, Alan JC. Community prevalence study of taeniasis and cysticercosis in Bali, Indonesia. Trop Med Int Health 1999; 4 (4): 288-94.
19. Vázquez-Flores S, Balesteros-Rodea G, Flisser A, Schantz PM. Hygiene and restraint of pigs is associated with absence of Taenia solium cysticercosis in a rural community of México. Sal Púb Mex 2001; 43: 574-6.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Aloisio Alberto Piroli Silva
Rua Baependi, 112 – Centro
CEP: 88502-140 Lages – Santa Catarina
Telephone: 49 3222 2700 Fax: 49 3243 1004
E-mail: aloisiopiroli@vlnet.com.br

PRÊMIO HERMES PARDINI DE HORMONOLOGIA

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, com o patrocínio do Instituto Hermes Pardini;
- 2) O Prêmio será no valor de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

- O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia tem por objetivos;
- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Hormônios no País; e
 - 2) Premiar o melhor trabalho de hormonologia inscrito e apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados na sessão de Temas Livres dos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem word) e uma cópia em disquete (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado na íntegra, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 à 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia, obrigatoriamente, deve ser apresentado na sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos do prêmio, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2006.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio Hermes Pardini de Hormonologia
Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • 20270-902 • Rio de Janeiro • RJ

Staphylococcus aureus oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital*

Resistant oxacilin *Staphylococcus aureus* (MRSA): incidence of cepas acquired in the community (CA-MRSA) and importance of research and descolonization in hospital

Fabiola Rossi Menegotto & Simone Ulrich Picoli

RESUMO - *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) é um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecções nosocomiais. Porém, as infecções por MRSA não se limitam ao ambiente hospitalar, pois *S. aureus* resistente à oxacilina, comunidade adquirido, (CA-MRSA) está emergindo e pode atingir pessoas sem fatores de risco, como hospitalizações prévias. Para estimar a extensão de CA-MRSA determinou-se a prevalência da colonização nasal por *S. aureus* em 100 amostras obtidas de uma população sem fatores de risco. As amostras foram semeadas em Agar Sangue e identificadas com provas compatíveis. Nos isolados de *S. aureus* aplicou-se o teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão (Kirby-Bauer). Encontrou-se uma frequência de 40% dessa bactéria, sendo 7,5% CA-MRSA. Quanto ao perfil de sensibilidade, *S. aureus* apresentou tendência à resistência aos β -lactâmicos e macrolídeos e sensibilidade diminuída à tetraciclina, lincosaminas, aminoglicosídeos e cloranfenicol, sendo totalmente sensível aos glicopeptídeos. Os isolados de CA-MRSA apresentaram resistência apenas aos β -lactâmicos e macrolídeos. A prevalência da colonização por MRSA em pessoas saudáveis na comunidade potencializa a necessidade de uma maior vigilância do controle de infecção hospitalar, já que esta população que carrega CA-MRSA pode tornar-se reservatório bacteriano no ambiente hospitalar.

PALAVRAS-CHAVE - *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA); *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina comunidade adquirido (CA-MRSA).

SUMMARY - Resistant oxacilin *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the biggest clinical and epidemiologic problems in nosocomial infections. However, the infections by MRSA are not limited to hospital environment; because community acquired resistant oxacilin *S. aureus* (CA-MRSA) is emerging and can reach people without risk factors, as previous hospitalizations. To estimate the extension of CA-MRSA prevalence nasal settling for *S. aureus* was determined in 100 samples of a population without risk factors. The samples were sown in Agar Blood and identified with compatible tests. In isolated of *S. aureus* the test of sensitivity to antimicrobials for record-diffusion was applied (Kirby-Bauer). A frequency of 40% of these bacteria, being 7.5% CA-MRSA was found. As the sensitivity profile, *S. aureus* presented trend to resistance to β -lactamics and Macrolides and sensitivity diminished to tetracycline, lincosamines, aminoglycosides and chloramphenicol, being total sensible to the glycopeptides. The isolated of CA-MRSA presented resistance only to the β -lactamics and macrolides. The prevalence of the settling for MRSA in healthful people in the community increases the need of a bigger control of hospital infection, once this population that carries CA-MRSA may become bacterial reservoir in hospital environment.

KEYWORDS - Resistant Oxacilin *Staphylococcus aureus* (MRSA); Community Acquired Resistant Oxacilin *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA).

INTRODUÇÃO

Um agente etiológico importante associado à infecções adquiridas, tanto na comunidade como em hospitais, e que se tornou um paradigma das infecções bacterianas é o *Staphylococcus aureus*. Considerado um dos principais patógenos humanos, destaca-se por sua frequência elevada e sua patogenicidade que o capacita a produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em hígidos e por sua fácil disseminação intra-hospitalar associada à resistência aos antibióticos¹³.

No indivíduo sadio, *S. aureus* é usualmente um comensal das fossas nasais, pele e até do intestino. Por isso, as infecções frequentemente resultam da introdução dessas cepas em locais previamente estéreis após um trauma, abrasões de pele e mucosas ou durante procedimentos cirúrgicos^{4,11}.

Este microrganismo foi capaz de desenvolver rapidamente resistência aos antibióticos. Já na década de 60, tornou-se resistente à oxacilina (MRSA) devido à presença do gene *mecA*, sendo renomeado *Staphylococcal Cassette Chromosomal – SCC mec*. MRSA caracterizava a resistência aos antibióticos β -lactâmicos em geral^{13, 15}.

O alvo de atuação dos antibióticos β -lactâmicos são as chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBP's): proteínas de membrana diretamente envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana. Os β -lactâmicos, que interagem com as PBP's, impedem a formação completa da camada de peptidoglicano da parede celular, desencadeando a morte bacteriana. Porém, na presença do gene *mecA*, ocorrem alterações das proteínas de ligação através da codificação de uma nova proteína alvo, denominada PBP2a que apresenta baixa afinidade aos β -lactâmicos. Portanto, no mutante resistente à oxacilina (MRSA) não ocorrerá inibição da síntese da parede bacteriana, uma vez que a PBP2a funciona como uma PBP substituta^{2, 10}.

Até então, estritamente nosocomial, MRSA tornou-se um dos patógenos mais importantes em infecções hospitalares; porém, nos últimos 10 anos, infecções por esta bactéria resistente começaram a aparecer também na comunidade. MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA) é um patógeno potencialmente emergente que vem apresentando frequência crescente de isolados^{6, 16}.

Embora as infecções por CA-MRSA sejam geralmente cutâneas, doenças invasivas como bacteremias, endocardites, osteomielites e pneumonias já foram descritas. Surto de in-

Recebido em 18/07/2006

Aprovado em 09/02/2007

*Laboratório de Biomedicina, Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale – RS
Responsável: Simone U. Picoli, Professor Adjunto, Curso de Biomedicina, Centro Universitário Feevale (RS).

fecções hospitalares por cepas comunitárias também já foram relatados^{1,5}.

A origem de CA-MRSA ainda é indefinida. Há hipóteses de aquisição do DNA do *mec* pelas cepas previamente suscetíveis que circularam na comunidade. Os elementos *mecA* estão incluídos em pelo menos cinco tipos, designados de I a V, sendo o elemento *mecIV* associado com o CA-MRSA. Essa cepa é geralmente sensível a vários antibióticos, especialmente clindamicina. Pode ser verificada a produção de até 18 toxinas não encontradas no MRSA hospitalar, incluindo *Panton-Valentine Leucocidina* (PVL), enterotoxina H e múltiplos superantígenos. Técnicas de tipagem molecular como sequência mutilócus, *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e detecção de *SSCmec* são úteis na identificação de cepas correlacionadas⁷.

Considerando a emergência de CA-MRSA como um patógeno relevante, o presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente na comunidade (CA-MRSA).

MATERIAS E MÉTODOS

Foram analisadas 100 amostras de swab nasal de indivíduos não hospitalizados, obtidas aleatoriamente. Hospitalizações recentes, de no mínimo seis meses prévios à coleta, foram consideradas critério de exclusão de amostra. Os swabs foram processados no Laboratório de Bacteriologia do Centro Universitário Feevale, no período de março a outubro de 2005.

As amostras clínicas coletadas com swab estéril foram semeadas em meio de Agar Sangue e identificadas através de coloração de Gram (cocos Gram positivos em cachos), prova da catalase (+), prova da coagulase (+) e crescimento em Agar Sal Manitol (colônias amarelas).

Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, o método utilizado foi o disco-difusão (Kirby-Bauer), sendo as amostras consideradas CA-MRSA quando apresentaram perfil de resistência a oxacilina.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a frequência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) nas 100 amostras de swab nasal analisadas, sendo a ocorrência de colonização por SCN superior ao *S. aureus*.

Tabela I
Frequência de colonização por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) em amostras de swab nasal.

	Nº amostras	Porcentagem(%)
<i>S. aureus</i>	40	40
SCN	60	60
Total	100	100

Entre as 40 amostras de *S. aureus* isoladas de amostras comunitárias, três mostraram-se resistentes a oxacilina, representando o CA-MRSA (7,5%). A maioria das amostras de *S. aureus* apresentou sensibilidade ao antibiótico oxacilina, porém verificou-se sensibilidade intermediária em 10% dos isolados bacterianos (Tabela 2).

Tabela II
Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à oxacilina.

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Oxacilina	33	82,5	4	10	3	7,5

O perfil de sensibilidade dos 40 isolados de *S. aureus* frente aos grupos de antibióticos utilizados como β -lactâmicos (oxacilina, penicilina), aminoglicosídeos (gentamicina), macrolídeos (eritromicina), tetraciclina, sulfonamidas, glicopeptídeos (vancomicina), lincosaminas (clindamicina) e outros, pode ser observada na Tabela 3. Nesta, pode-se constatar uma maior tendência à resistência aos β -lactâmicos como penicilina (72,5%) e aos macrolídeos (45%) e uma menor proporção à tetraciclina (17,5%), lincosaminas (15%), aminoglicosídeos (5%) e cloranfenicol (5%). Verificou-se, também, a sensibilidade de 100% aos glicopeptídeos (Tabela 3).

Tabela III
Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antibióticos testados.

Antibióticos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Clindamicina	34	85	0	0	6	15
Cloranfenicol	38	95	0	0	2	5
Eritromicina	21	52,5	1	2,5	18	45
Gentamicina	38	95	0	0	2	5
Oxacilina	33	82,5	4	10	3	7,5
Penicilina	11	27,5	0	0	29	72,5
Rifampicina	40	100	0	0	0	0
Sulfa/trimetropin	40	100	0	0	0	0
Tetraciclina	32	80	1	2,5	7	17,5
Vancomicina	40	100	0	0	0	0

A resistência aos antibióticos associada às três amostras de CA-MRSA foi evidente frente aos β -lactâmicos (100%) seguida pelo macrolídeo eritromicina (66,6%). Contudo, diante das demais classes de antibióticos CA-MRSA não se mostrou resistente (Tabela 4).

Tabela IV
Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* adquirido na comunidade resistente à oxacilina (CA-MRSA) e aos outros antibióticos testados.

Antibióticos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Clindamicina	3	100	0	0	0	0
Cloranfenicol	3	100	0	0	0	0
Eritromicina	1	33,4	0	0	2	66,6
Gentamicina	3	100	0	0	0	0
Penicilina	0	0	0	0	3	100
Rifampicina	3	100	0	0	0	0
Sulfa/trimetropin	3	100	0	0	0	0
Tetraciclina	2	66,6	1	33,4	0	0
Vancomicina	3	100	0	0	0	0

DISCUSSÃO

S. aureus resistente à oxacilina (MRSA) é conhecido, mundialmente, como causa importante de infecções nosocomiais, tendo adquirido papel de destaque pela sua multiresistência aos antimicrobianos usualmente utilizados na terapêutica e por sua fácil disseminação intra-hospitalar¹³. O método mais comum de introdução de MRSA em uma instituição é através da admissão de um paciente colonizado ou infectado e, uma vez que esta bactéria tenha sido detectada em um determinado hospital, tende a persistir aumentando progressivamente a sua prevalência⁴. Apesar de não serem bactérias mais virulentas que os isolados sensíveis, as infecções causadas por estes patógenos implicam em terapêutica com drogas comumente de uso parenteral exclusivo, de toxicidade e custo elevados³. Estudos recentes sugerem que a epidemiologia de MRSA pode mudar porque o isolamento destas cepas não está mais limitado ao ambiente hospitalar. Apesar da prevalência de colonização por esta bactéria em pessoas não hospitalizadas e sem fatores predisponentes ainda ser baixa, MRSA comunitário (CA-MRSA) é um patógeno potencialmente emergente, com relatos em diversos países, incluindo descrição de surtos hospitalares⁹. Como evidenciado no presente estudo, desenvolvido com 100 amostras de swab nasal de uma população sem qualquer relato de infecção ou colonização, nem de admissão em hospitais, cirurgias, diálise ou cateteres, a ocorrência de colonização por *S. aureus* foi de 40% (Tabela 1). Apesar do índice de isolados de SCN ter sido superior ao de *S. aureus*, vindo de encontro com achados da literatura, entre estes últimos microrganismos 7,5% mostraram-se resistentes à oxacilina, representando CA-MRSA. A maioria das amostras apresentou sensibilidade ao antibiótico oxacilina (32,5%), porém a sensibilidade intermediária (10%) e, principalmente, a frequência de 7,5% de resistência a esta droga representa um valor significativo em amostras comunitárias (Tabela 2).

No Rio Grande do Sul, apenas três casos isolados de pacientes ambulatoriais de Porto Alegre, foram definidos como a representação das infecções por CA-MRSA. Estes foram os primeiros casos reportados no Brasil, em 2004. Essas cepas de CA-MRSA, que apresentavam o gene *MecA* tipo IV isoladas no estudo realizado por Ribeiro e colaboradores, apresentavam-se sensíveis à clindamicina, eritromicina, gentamicina, sulfa/trimetropin e à vancomicina¹⁴, correlacionando-se ao perfil de sensibilidade observado nesse estudo (Tabela 4).

Tendo em vista a escassez de novas publicações indicando os índices de colonização por CA-MRSA no Brasil, a significância da frequência de colonização por esta bactéria neste estudo baseia-se na recente emergência destas cepas comunitárias, até então, estritamente nosocomiais.

O padrão de resistência dos microrganismos isolados na comunidade reflete a frequência com que os antibióticos são utilizados por esta população. Cepas sensíveis à penicilina atualmente são bastante raras, como pode ser observado na Tabela 3 onde verifica-se a alta frequência de cepas de *S. aureus* comunitárias resistentes a essas drogas. A oxacilina, introduzida em 1961, é o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* resistente à penicilina e ampicilina. Hoje em dia, cepas de *S. aureus* hospitalares e comunitárias apresentam o mesmo percentual de resistência à penicilina, variando de 80% a 100%. Aparentemente, fatos semelhantes começaram a ocorrer desde a primeira descoberta de MRSA: tornou-se um dos patógenos mais prevalentes em infecções nosocomiais e a partir dos anos 90, infecções por esta bactéria resistente começaram a aparecer também na comunidade⁶.

Com este achado de MRSA comunitário potencializa-se a importância da pesquisa e descolonização em ambiente hospitalar, prioritariamente em unidades de terapia intensiva, já que estes pacientes tornam-se, também, reservatórios de bactérias no ambiente hospitalar¹⁷.

Embora as cepas de *S. aureus* e CA-MRSA isoladas neste estudo tenham apresentado pouca resistência às classes de antibióticos de escolha para infecções estafilocócicas (Tabelas 3 e 4), verificou-se através da literatura que as cepas de MRSA hospitalar mostram-se resistentes a diversas classes antimicrobianas, desencadeando falha na terapêutica do paciente. Frente a isso, infecções por MRSA vêm sendo tratadas indiscriminadamente com glicopeptídeos como a vancomicina, tornando a problemática de infecção por MRSA ainda mais severa, com a emergência recente de cepas apresentando sensibilidade diminuída e até mesmo resistência ao antibiótico citado^{4, 12}.

Tem-se procurado relacionar uma maior gravidade de infecções com o fenômeno de multiresistência, porém, alguns estudos conseguiram apenas estabelecer um aumento da morbi-mortalidade, que parece ser mais atribuída à falta de opção terapêutica do que à virulência destas cepas. Assim, enquanto não há o desenvolvimento de novas drogas com atividade anti-estafilocócica, intervenções efetuadas na perspectiva da introdução de medidas de controle de infecção hospitalar mostram-se alternativas mais propícias para a diminuição de número de casos de futuras infecções pela cepa multiresistente em pacientes colonizados⁸.

A pesquisa e descolonização na tentativa de erradicar MRSA dos pacientes colonizados empregando banho de clorexidina e mupirocin nasal mostra-se conveniente para as instituições de saúde e, principalmente, para os pacientes, uma vez que o conhecimento da colonização permite que medidas de isolamento do mesmo dentro do ambiente

hospitalar sejam tomadas, evitando a transmissão horizontal, direta, por auto-infecção, cruzada ou através da via indireta. Junto a isso, a descolonização busca evitar o uso indiscriminado de antibióticos de alta toxicidade e elevado custo, evitando novos casos de resistência aos antibióticos de última escolha^{17, 18}.

De acordo com os resultados observados, conclui-se que a resistência à oxacilina já é evidente em amostras de *S. aureus* comunitárias e merece atenção na admissão hospitalar de pacientes, uma vez que estes poderão se tornar reservatório da bactéria no ambiente nosocomial. Porém, a realização de testes moleculares para a confirmação destas cepas resistentes é necessária, bem como para identificar o clone presente em cada região.

O laboratório de microbiologia deve desempenhar um trabalho dinâmico e contínuo na monitorização microbiológica e antimicrobiana. O desenvolvimento de novas medidas de controle de infecção no ambiente hospitalar, particularmente contra microrganismos considerados "problemas" em uma instituição, como o MRSA hospitalar e, recentemente, o comunitário, poderá causar um grande impacto na prevenção e erradicação da cepa precocemente.

REFERÊNCIAS

1. Bartlett, J. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Other Drug-Resistant Pathogens CME. Infectious Diseases Society of América. Anual Meeting 2004.
2. Boyle-Vavra, S.; Yin, S.; Challapalli, M.; Daum R. Transcriptional Induction of the Penicillin-Binding Protein 2 Gene in *Staphylococcus aureus* by Cell Wall-Active Antibiotics Oxacillin and Vancomycin. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, v. 47, p. 1028-1036. 2003 27
3. Chavez-Bueno, S.; Bozdogan, B.; Katz, K.; Bowlware, K.; Nancy Cushion, N.; Cavuoti, D.; Ahmad, N.; McCracken, G.; Appelbaum, P. Inducible Clindamycin Resistance and Molecular Epidemiologic Trends of Pediatric Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. *Antimicrobial Agent. Chemother.*, v. 49, p. 2283-2288. 2005
4. Cuevas, O.; Cercenado, E.; Vindel, A.; Guinea, J.; Sanchez-Conde, M.; Sanchez-Somolinos, M.; E. Bouza, E. Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002. *Antimicrobial Agent. Chemother.*, v. 48, n. 11, p. 4240-4245. 2004 12
5. Domingues, J. T. It's Not a Spider Bite, It's Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of the American Board of Family Practice.*, v. 17, p.220-226. 2004 49
6. Faria, N. A.; Oliveira, D. C.; Westh, H.; Monnet, D. L.; Larsen, A. R.; Skov, R.; Lencastre, H. Epidemiology of Emerging Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a Nationwide Study in a Country with Low Prevalence of MRSA Infection. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 1836-1842. 2005 45
7. Fey, P. D.; Said-Salim, B.; Rupp, M. E.; Hinrichs, S. H.; Boxrud, D. J.; Davis, C. C.; Kreiswirth, B. N.; Schlievert, P. M. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agent. Chemother.*, v. 47, p. 196-203. 2003 48
8. Gomes, A. R.; Vinga, S.; Zavolan, M.; De Lencastre, H. Analysis of the Genetic Variability of Virulence-Related Loci in Epidemic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, p. 366-379. 2005 38
9. Herold, B.C.; Immergluck, L.C.; Maranan, M.C.; Lauderdale, D.S.; Gaskin, R. E.; Boyle-Vavra, S.; Leitch, C. D.; Daum, R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *J. Microbiol Immunol Infect.*, v. 37, p 93-94. 2004.
10. Katayama, Y., Zhang, Z.; Chambers, F. PBP 2a Mutations Producing Very-High-Level Resistance to Beta-Lactams. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, v. 48, p. 453-459. 2004 26
11. Lee, Y. L.; Cesario, T.; Gupta, G.; Flionis, L.; Tran, C.; Decker, M.; Thrupp, L. Surveillance of Colonization and Infection with *Staphylococcus aureus* Susceptible or Resistant to Methicillin in a Community Skilled-Nursing Facility. *Am. J. Infect. Control*, v. 25, p. 312-321. 1997 14
12. Liu, C.; Chambers, H. *Staphylococcus aureus* with Heterogeneous Resistance to Vancomycin: Epidemiology, Clinical Significance, and Critical Assessment of Diagnostic Methods. *Antimicrobial Agent. Chemother.*, v. 47, p. 3040-3045. 2003.
13. Mark C. Enright, M., Robinson, A.; Randle, G.; Feil, E.; Grundmann, H.; Spratt, B. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*, v. 99, p. 7687-7698. 2002. (4)
14. Ribeiro, A.; Dias, C.; Silva-Carvalho, M. C.; Berquo, L.; Ferreira, F. A.; Santos R. N.; Ferreira-Carvalho, B. T.; Figueiredo, A. M. First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p. 1985-1988. 2005 43
15. Rohrer, S.; Maki, H.; Berger-Bächi, B. What makes resistance to methicillin heterogeneous? *J. Clin. Microbiol.*, v. 52, p. 605 – 607. 2003. 5
16. Schulman, G., Dassey, D., Mascola, L. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA.*, v.280 p. 421-422. 2004. 40
17. Vivoni, A. M.; Santos K. R.; de-Oliveira M. P.; Marval, M.; Ferreira, A. L.; Riley, L. W.; Moreira, B. M. Mupirocin for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: lessons from a decade of use at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, v. 26, p. 662-667. 2005
18. Wertheim, H.; Verveer, J.; Boelens, H.; Belkum, A.; Verbrugh, H.; Vos, M. Effect of Mupirocin Treatment on Nasal, Pharyngeal, and Perineal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Healthy Adults. *Antimicrobial Agent. Chemother.*, v. 49, p. 1465-1467. 2005

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dra. Simone Ulrich Picoli
Lab. Biomedicina - Campus II
CEP: 63525-000 Novo Hamburgo - RS
E-mail: simonepi@tena.com.br

IFCC WORLDLAB

Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial

35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

O papiloma vírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG

Papiloma human virus (HPV) in women taken care of for the SUS, the city of Patos de Minas - MG

Alda Maria Alves Queiroz¹, Maria Aparecida Tedeschi Cano² & José Eduardo Zaia³

RESUMO - No presente trabalho, estudou-se a incidência de achados citológicos associados ao Papiloma Vírus Humano (HPV) pelo exame de Papanicolaou, além da representabilidade dessas amostras segundo o Sistema Bethesda, nas populações de adolescentes (idade <20 anos) e adulta (>21 anos) atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas –MG no ano de 2000. Verificou-se que a incidência destes achados vem aumentando na população adolescente em 3,08% e nas mulheres adultas a ocorrência foi de 1%. Portanto, 4,0% das amostras que apresentaram alterações celulares associadas à infecção pelo HPV são de mulheres jovens, com atividade sexual em idade reprodutiva. A análise mostrou, também, que um alto índice de amostras (12,0%) não apresentavam células da JEC (Junção escamo-colunar), na população com a faixa etária até 40 anos de idade e que aumentou significativamente nas faixas etárias acima dos 40 anos de idade, comprometendo a qualidade do exame microscópico. Estudos mostram que o vírus Papiloma Humano (HPV) tem papel importante no desenvolvimento da displasia das células cervicais e na sua transformação em células cancerosas. Uma vez que a progressão das lesões para o câncer cervical se dá ao longo dos anos, é de grande importância que a população mais jovem, sexualmente ativa, também seja monitorada pelos Programas de Prevenção de Câncer de Colo Uterino.

PALAVRAS-CHAVE - HPV, Papanicolaou, JEC, Câncer de Colo Uterino, Mulheres Jovens.

SUMMARY - In this study, we searched the incidence of citologic disorders associated to Human Papiloma Virus (HPV), through Papanicolaou test, according to the Bethesda System, in adolescents (age <20 years) and adults (age >21 years) using the Brazilian Public Health System (SUS – Serviço Único de Saúde) in the town of Patos de Minas –MG in 2000. We verified that the incidence of these findings is increasing in the adolescent population (3,08%). In adult women the incidence was 1%. Thus, the incidence of cellular disorders associated to infection by HPV in young women, with sexual activity and in reproductive age, was 4%. The analysis also showed that a high number of samples (12%) did not present squamous-columnar junction cells (JEC) in <40 years old population and enhanced in the population over 40 years old, bringing to discussion the laboratory microscopic test.

Other studies showed that HPV has an important role in the development of displasia of cervix cells and its changing in neoplastic cells. We know that the progressive lesions to cervix cancer occur through the years, and so it is very important that the sexually active young population be advised and analyzed by the program of Cervix Cancer Prevention.

KEYWORDS - HPV, Papanicolaou, JEC, cervix cancer, young women.

INTRODUÇÃO

O PAPILOMA VÍRUS HUMANO

O papilomavírus é um vírus DNA que pertence à família Papovaviridae e possui forma icosaédrica não envelopada, com 72 capsômeros; seu genoma é circular, composto por dupla fita de DNA, com comprimento de 7.900 kilobases e massa molecular de 5×10^6 daltons (31).

O HPV é classificado primeiramente pela espécie de hospedeiro natural (humano, bovino, vírus de Shope) e sub classificado, em tipos, de acordo com a organização das seqüências de nucleotídeos do DNA. Recentemente, esforços têm sido feitos para a descrição de variantes de tipos de HPV. Enquanto um novo sub tipo de HPV é definido como tendo carga viral com 90 a 98% de similaridade dos nucleotídeos, o HPV variante possui mais de 98%. Até o momento, mais de 120 tipos de papilomavírus humano (HPV) foram descritos (31).

Os papilomas vírus são encontrados em vários vertebrados, incluindo anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Em geral, cada tipo de papiloma vírus é específico para cada espécie, tipo de epitélio e localização anatômica (37).

ESTÁGIOS DE INTERAÇÃO CÉLULA-VÍRUS

Através de microtraumatismos (38) o vírus penetra no hospedeiro. Seu genoma é transportado para o núcleo das células basais onde irão ocorrer a tradução e a transcrição.

Esta é a fase da inoculação (fase 0).

O período de incubação (fase I), varia de 2 - 3 semanas a 8 meses e está relacionada com o estado imunológico de cada indivíduo. A progressão dessa fase para a expressão ativa depende de três fatores: do estado imunológico do hospedeiro, do tipo de vírus e da permissividade celular.

Na fase precoce (fase II), três meses após o surgimento das primeiras lesões, inicia-se uma resposta imune que pode conter a infecção, onde ocorre a regressão ou então essa resposta ser insuficiente para eliminá-la ocorre, então, a fase de expressão ativa.

Aproximadamente nove meses depois do aparecimento das primeiras lesões, ocorre a fase tardia (fase III), onde dois tipos de situações podem se apresentar:

- 1) A continuidade da remissão (potencialmente infectantes);
- 2) A recidiva, expressando doença ativa.

TRANSMISSÃO

As vias de transmissão do HPV podem ser sexual, não sexual (familiar ou nosocomial por fômites) ou materno – fetal, podendo ser gestacional, intra e periparto (31).

Entre elas, a via sexual representa a grande maioria dos casos. Com relação à via não - sexual, é provável que o HPV, assim como as verrugas cutâneas, possa ser transmitido por “fômites” (toalhas, roupas íntimas etc.) e, também, pelo instrumental ginecológico, quando não esterilizado adequadamente (31).

Recebido em 05/05/2006

Aprovado em 12/01/2007

¹Farmacêutica-bioquímica, Mestre em Promoção de Saúde e Professora Assistente das Disciplinas de Citologia Clínica, Epidemiologia e Saúde Ambiental, Políticas de Saúde e Epidemiologia I do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM); ²Enfermeira, Doutora em Saúde da Criança e Adolescente, Professora e Orientadora do curso de Mestrado em Promoção de Saúde da Universidade de Franca – UNIFRAN; ³Biólogo, Bacharel em Ecologia, Doutor em Ciências Biológicas, Docente do Curso de Ciências Biológicas na Universidade de Franca, Docente e Orientador do Curso de Mestrado em Promoção de Saúde na Universidade de Franca – UNIFRAN.

Embora não se saiba por quanto tempo o vírus resista fora do organismo, considera-se que a transmissão por "fômites" seja viável por um curto período de tempo. Mulheres e crianças sem atividade sexual comprovada também poderão desenvolver a infecção (27).

FORMAS DE INFECÇÃO

A transmissão do HPV ocorre geralmente através do contato sexual ou por meio de fragmentos de tecido infectado que penetram através de soluções de continuidade (5).

É necessário trauma no epitélio para indução da infecção pelo HPV. Os sítios mais comuns para o desenvolvimento da infecção são nas áreas sujeitas à abrasão durante o ato sexual, como por exemplo, o intróito posterior, nas mulheres, e o prepúcio, nos homens (39).

A infecção pelo HPV no trato genital inferior é dividida em três tipos (5).

a) **Infecção clínica:** É a forma que pode ser evidenciada a olhos nus, nas regiões perianal e genitália externa. Aparece o condiloma acuminado ou condiloma exofítico. O aspecto macroscópico da lesão é o de pequenas formações múltiplas, em forma de crista, coberta de epitélio hiper e paraceratótico. Localizam-se em áreas úmidas, especialmente nas expostas ao atrito sexual. As lesões aumentam com o decorrer do tempo e são freqüentemente confluentes, com crescimento em forma de couve flor.

a) **Infecção sub clínica:** É vista ao colposcópico após aplicação de ácido acético a 5%, no canal vaginal e colo uterino. Caracteriza-se pela presença do condiloma plano. Essa lesão pode se manifestar em associação com displasia, sendo mais freqüente a displasia leve. É a forma mais freqüente no colo uterino.

b) **Infecção latente:** É a forma evidenciada apenas através de técnicas de biologia molecular. Não há forma de lesões. Somente o DNA do vírus pode ser detectado.

A infecção pelo HPV depois de instalada pode estacionar, regredir ou progredir e transformar - se, dando origem às displasias e/ou carcinomas (5).

FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DE INFECÇÃO POR HPV

Idade: A maior incidência ocorre entre os 20 e 40 anos de idade, que coincide com o pico da atividade sexual (5).

Atividade sexual: Existe associação entre idade do início de atividade sexual, número de parceiros e maior prevalência de infecção pelo HPV. A circuncisão masculina reduz o risco de infecção por HPV no homem em 63% e câncer cervical em suas parceiras em 68% (31).

Tabagismo: O tabagismo diminui significativamente a quantidade e função das células de Langherans, células apresentadoras de antígenos e que são responsáveis pela ativação de imunidade celular local contra o HPV (31).

Imunossupressão: Fatores que levam à supressão ou abolição da imunidade celular, como o uso de drogas citotóxicas em transplantados, imunodeficiência inatas ou adquiridas como HIV aumentam a capacidade do vírus de persistir no indivíduo. Neste grupo de paciente pode-se observar quadros de condilomatose genital floridos e persistente de difícil controle e tratamento (31).

Anticoncepcional oral (ACO): Dados da literatura mostram que o anticoncepcional oral é um fator de risco para a infecção por HPV (25).

Este aumento é explicado por alterações hormonais que levam à imunomodulação (20).

Infecções genitais transmitidas sexualmente ou não: Nas mulheres com infecções genitais, transmitidas sexualmente

ou não, parece haver maior incidência de infecção por HPV provavelmente, pelo aumento da secreção no meio vaginal, que predisporia ao aparecimento de condilomas (28).

Gardnerella Vaginalis: Estudos demonstram a associação entre a *Gardnerella vaginalis* e a infecção por HPV. Se os microorganismos favorecem um ao outro, isto ainda está por ser estabelecido (25).

Outros fatores de risco: Doenças sexualmente transmissíveis prévias como herpes e clamídia e baixa ingestão de vitaminas A, C e E, diminuem a imunidade celular (31).

HPV E GRAVIDEZ

A prevalência de infecção em mulher grávida (34) é clinicamente relevante, mas similar àquela encontrada em mulher não - gestante. As manifestações clínicas (e subclínicas) são mais evidentes nas gestantes, sendo que grande parte delas regride no puerpério.

Apesar da freqüência da infecção genital do HPV durante a gravidez não ser bem conhecida, parece ser maior que a população em geral (31).

Há relatos que essa alta prevalência e incidência (6) ocorrem porque, na gravidez, há uma diminuição da imunocompetência. As atividades T help e T supressor estão diminuídas e há diminuição das IgG e IgA no muco cervical. Afora esses fatores, verifica-se que, em virtude das altas taxas de esteróides na mulher grávida, há aumento na proliferação do HPV, pois ele possui em receptor hormonal esteróidico.

Foi demonstrado (6) que durante a gestação, as células parabasais possuem receptor para estrógeno-negativo e progesterona-positivo, sendo que essas células estão em intensa atividade proliferativa. Conseqüentemente, com altas taxas de DNA que é substrato essencial para a proliferação celular.

A conjunção de todos esses fatores acarreta o aumento das lesões HPV induzidas durante a gestação.

A freqüência de transmissão vertical perinatal do HPV é baixa (2,8%). Estudos sugerem que nem a cesariana nem o tratamento das lesões do HPV antes do parto protegerão sempre contra a aquisição do HPV pelo recém-nascido (4).

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV

Os métodos diagnósticos das lesões induzidas pelo HPV são morfológicos e incluem a citologia oncológica, exame clínico, colposcopia e histologia. Já a identificação da infecção por HPV, propriamente dita, inclui os métodos biológicos, tais como as hibridizações moleculares de ácidos nucleicos, tipo Souther Blot, Captura de Híbridos, Hibridização "in situ" e Reação em Cadeia de Polimerase (8).

EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo HPV é considerada uma doença sexualmente transmissível. A maior incidência ocorre entre os 20 e 40 anos de idade, que coincide com o pico de atividade sexual (5).

Fatores como múltiplos parceiros e início precoce da atividade sexual aumentam a probabilidade de infecção (39).

No entanto, a maioria das mulheres infectadas apresentam a forma latente ou sub-clínica da doença (19), o que dificulta o diagnóstico e conseqüentemente favorece a transmissão. Estima-se que cerca de 75% da população sexualmente ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida. No entanto, a grande maioria destas infecções é eliminada pelo sistema imune e não desenvolve sintomas no hospedeiro (31).

DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL

A maior prevalência de HPV de alto risco oncogênico tipos 16, 18, 31, 35, 45, 51, 52, 58, 59, se encontra na África e América Latina. HPV 16 é o mais freqüente no mundo, exceto na Indonésia e Argélia, onde o HPV 18 é o mais comum, HPV 45 apresenta alta freqüência na África Ocidental. Os tipos 33, 39 e 59 se concentram na América Central e América do Sul (33).

HPV NO HOMEM

O diagnóstico das lesões subclínicas na mulher impôs o estudo dessa infecção no homem. Sua epidemiologia, assim como o comportamento clínico, é pouco conhecida. Como na mulher, o início precoce da atividade sexual, número elevado de parceiras e relações sexuais casuais, parecem ser os parâmetros epidemiológicos mais importantes (26).

A infecção pelo HPV pode ser clínica, subclínica e latente. Segundo Peres *et al.*, qualquer lesão anogenital, papular, pigmentada, eritematosa ou macular, pode ser causada pelo HPV. As lesões clínicas são habitualmente multifocais e multicêntricas, manifestando-se como vegetações papilomatosas, pedunculadas ou sésseis. Podem ser ainda papulares e coalescer, formando placas que ocupam grandes áreas (32).

HPV E CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

Estudos recentes mostram que o vírus do papiloma humano (HPV) e o Herpesvírus Tipo II (HSV) têm papel importante no desenvolvimento da displasia das células cervicais e na sua transformação em células cancerosas. O vírus do papiloma humano (HPV) está presente em 99% dos casos de câncer do colo do útero (13).

A estimativa do Ministério da Saúde, elaborada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 1999, foi de 104.200 óbitos e 261.900 casos novos (incidência) de câncer. Dentre eles, o câncer de mama ocupa o segundo lugar em incidência e o terceiro em mortalidade e o câncer de colo do útero o terceiro lugar em incidência e o quarto em mortalidade (13).

Está bem estabelecido o papel do Papiloma Vírus Humano como o fator promotor da neoplasia cervical. A relação do HPV com a carcinogênese depende fundamentalmente do tipo e da carga viral e de sua persistência e integração com a célula hospedeira (41).

Além da infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV), outros co-fatores contribuem para desenvolver o câncer de colo do útero, tais como idade prematura de início da vida sexual, multiplicidade de parceiros, co-infecção pelo HIV e o tabagismo (13).

PREVENÇÃO

Apesar do conhecimento cada vez maior nesta área, a abordagem mais efetiva para o controle do câncer do colo do útero continua sendo o rastreamento através do exame preventivo. É fundamental que os serviços de saúde orientem sobre o que é e a importância do exame preventivo, pois a sua realização periódica permite reduzir em 70% a mortalidade por câncer do colo do útero na população de risco. O Instituto Nacional de Câncer tem realizado diversas campanhas educativas para incentivar o exame preventivo tanto voltadas para a população quanto para os profissionais de saúde (13). Embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países no mundo a introduzir a citologia de Papanicolaou para a detecção precoce do câncer de colo uterino, esta doença continua a ser um sério problema de saúde pública (13).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Patos de Minas – MG, a cidade possui aproximadamente uma população de 123.700 habitantes.

O Laboratório Municipal de Citologia atende atualmente, além da cidade, 19 municípios vizinhos, realizando um total de aproximadamente 28.300 exames citológicos/ano.

Uma das UBS é a unidade de referência para a saúde da mulher. Quando um resultado de exame citológico se apresenta alterado, a paciente é encaminhada para essa UBS para dar prosseguimento ao tratamento.

Realizou-se um estudo retrospectivo de exames citológicos cérvico - vaginais examinados em um laboratório municipal da cidade de Patos de Minas -MG. Foram colhidas lâminas de 2.837 mulheres com idades de 14 a 75 anos de idade, moradoras da cidade de Patos de Minas, usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS). As lâminas foram coradas pelo método Papanicolaou. Foram revisados os laudos de citologia cérvico - vaginais do período de Março a Novembro de 2000. A amostra foi estratificada de acordo com a faixa etária em cinco classes: 14 a 20 anos, 21 a 30 anos, 31 a 40 anos, 40 a 50 anos e acima de 50 anos de idade.

CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS UTILIZADOS

Os critérios morfológicos utilizados para identificação do HPV foram os critérios clássicos, como a seguir:

- **Coilocitose:** alteração em células escamosas intermediárias maduras contendo um, dois ou mais núcleos discarióticos. Ocorre uma grande cavidade ou área clara que circunda o núcleo proeminente, com bordas bem definidas e a zona periférica amíde apresenta-se em borrão.
- **Disqueratose:** células espalhadas ou em grupos tridimensionais que demonstram pleomorfismo celular (forma caudadas ou alongadas) e/ou aumento de tamanho e atipia nuclear (18).

As atipias consideradas para seleção foram:

- Atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS);
- Atipias de células glandulares de significado indeterminado (AGUS);
- Neoplasia Intraepitelial Cervical graus 1, 2, e 3;
- Carcinoma (Ca).

Os critérios cito-morfológicos para os diagnósticos acima citados foram aqueles descritos pela Sociedade Brasileira de Citopatologia (1993).

Seguiu-se um Protocolo para Serviço de Prevenção e Controle do Câncer de colo Uterino preconizado pelo Ministério da Saúde (1999), que abrange desde a chegada da paciente à Unidade de Saúde, até as condutas clínicas.

A requisição do exame citopatológico bem como o resultado do exame citopatológico fornecidos pelo Ministério da Saúde.

Análise estatística foi realizada após a obtenção dos dados, os resultados são apresentados e descritos em forma de gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um total de 2.837 lâminas examinadas, 194 encontram-se entre 14 e 20 anos de idade, 801 entre 21 a 30 anos, 759 entre 31 a 40 anos, 596 entre 41 a 50 anos e 487 acima de 50 anos de idade.

A **figura 1** demonstra que a colheita das amostras foram

maiores nas faixas etárias superiores a 20 anos de idade, isso ocorreu porque os serviços na época priorizaram a colheita cérvico vaginal de 35 a 49 anos de idade, as outras faixas etárias eram atendidas através de demanda espontânea.

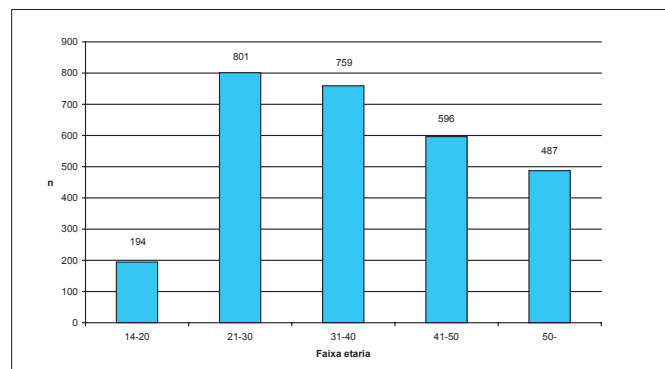


Figura 1 - Distribuição do número de mulheres usuárias do SUS na cidade de Patos de Minas - MG no ano de 2000 examinadas, estratificadas por faixa etária.

Em 1988, O Ministério da Saúde, por meio do Instituto Nacional do Câncer, realizou uma reunião de consenso, com a participação de diversos especialistas internacionais, representantes das sociedades científicas e das diversas instâncias ministeriais e definiu que, no Brasil, o exame colpocitopatológico deveria ser realizado em mulheres de 25 a 60 anos de idade, ou que já tivessem tido atividade sexual mesmo antes desta faixa de idade, uma vez por ano e, após 2 anos anuais consecutivos negativos, a cada 3 anos (13). Atualmente as estratégias principais para o controle desta doença, no Brasil, baseiam-se na disponibilização do exame preventivo (Papanicolaou) para mulheres entre 25 a 59 anos de idade, no tratamento adequado da doença e de suas lesões precursoras em 100% dos casos e no monitoramento da qualidade do atendimento à mulher, nas suas diferentes etapas (13).

A ocorrência do câncer do colo do útero se concentra principalmente em mulheres acima dos 35 anos de idade (13). O estudo sobre a população de mulheres adolescentes foi realizado através da demanda espontânea, tendo uma amostragem inferior às outras faixas etárias estudadas, conforme se observa na figura 1.

Provavelmente, se essa amostragem fosse maior, os achados de alterações celulares (associadas ou não ao HPV) nos exames da população de mulheres adolescentes seriam mais frequentes, uma vez que o início da atividade sexual precoce é um dos fatores de risco para o aparecimento de lesões precursoras do câncer de colo uterino.

Das 2.837 lâminas examinadas, 69 apresentaram alterações celulares, ou 2,43% das amostras, sendo que foram encontradas 22 lâminas com alterações celulares em pacientes de 14 a 20 anos, ou seja, 11,34%, 16 lâminas com alterações celulares em pacientes de 21 a 30 anos (2%) e menos de 2% nas outras faixas etárias. As alterações celulares são (NIC I, II, III), ASCUS, AGUS e Carcinoma invasor.

Observando-se os resultados apresentados na figura 2, observa-se que a incidência de alterações celulares em mulheres com idade de até 20 anos é maior (11,34%) que em outras faixas etárias que apresentam incidência em torno de 2%.

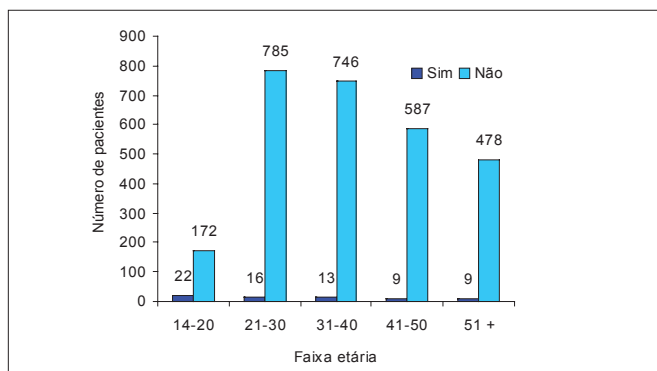


Figura 2: Alterações celulares relacionadas à faixa etária em mulheres usuárias do SUS, na cidade de Patos de Minas - MG, no ano de 2000.

O presente estudo comparou grupos com diferentes faixas etárias relacionando-as com atipias celulares. Não foram relacionados estado marital, número de parceiros, primeira relação sexual em idade precoce e tabagismo com o aparecimento da lesão, embora Parkin *et al.*, (2001) relatam que essas associações sejam consistentes.

O câncer cervical tem uma incidência mundial de cerca de 500.000 casos por ano, constitui-se uma dos mais graves problemas de Saúde Pública, especialmente em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil, onde se estima que cerca de 40.000 casos novos surjam anualmente (1). As lesões precursoras do câncer do colo uterino progridem mais rapidamente em mulheres muito jovens (12).

Esses dados amostrais apoiam a afirmação de que o diagnóstico citológico tem-se mostrado prático para a triagem do câncer do colo do útero de grandes populações devido a sua simplicidade, reprodutibilidade, precisão e baixo custo. Desde a sua implantação em Saúde Pública como método de triagem e detecção precoce de neoplasias cérvico uterinas, estas foram reduzidas significativamente, como pode ser comprovado em países desenvolvidos (11).

Vários são os fatores de risco identificados para o câncer de colo do útero e seus precursores. Os fatores sociais, ambientais e os hábitos de vida, tais como baixas condições socioeconômicas, **atividade sexual antes dos 18 anos de idade**, pluralidade de parceiros sexuais, vício de fumar (diretamente relacionado à quantidade de cigarros fumados), poucos hábitos de higiene e uso prolongado de contraceptivos orais são os principais (13).

Conforme a figura 3, verifica-se um significativo percentual de atipias celulares em mulheres jovens, das 69 lâminas alteradas 22 apresentavam alterações celulares (31,88%) em pacientes de 14 a 20 anos e 16 lâminas alteradas (23,19%) em pacientes de 21 a 30 anos.

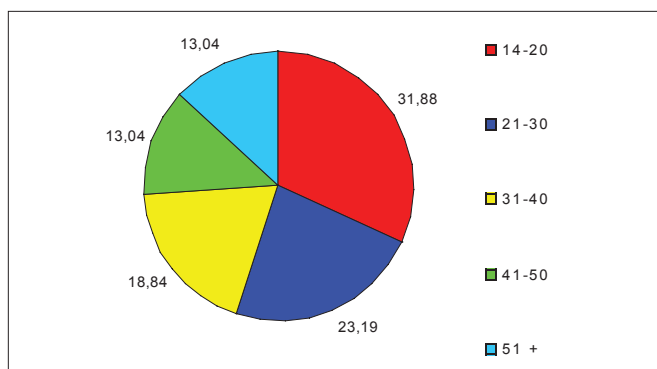


Figura 3: Incidência (%) de alterações celulares de acordo com a faixa etária em mulheres usuárias do SUS na cidade de Patos de Minas - MG, no ano de 2000.

A maior frequência de lesões precursoras do câncer do colo uterino na população de adolescentes, provavelmente seja, dentre outros fatores, devido às doenças sexualmente transmissíveis. Segundo os Centros para o Controle e Prevenção de Doenças, ligados ao governo dos Estados Unidos, houve 18,9 milhões de novos casos de Doenças Sexualmente Transmissíveis em 2000. Desses, 9,1 milhões, ou 48% atingiram pessoas entre 15 a 24 anos. Isso significa que um terço de todos os jovens sexualmente ativos contraiu uma Doença Sexualmente Transmissível no ano de 2000 (22).

O principal agente promotor da neoplasia cervical é o Papilomavírus Humano (HPV) que é, atualmente, a doença sexualmente transmissível mais frequente (40). A maioria das doenças infecciosas ou transmissíveis associa-se à pobreza e às desigualdades sociais (2).

Embora as atipias citológicas de baixo grau sejam mais frequentemente em adolescentes, existe o risco de progressão das mesmas para lesão de alto grau e carcinoma se não tratadas, especialmente se envolvem infecção por sub-tipos de HPV de alto risco (42).

Os fatores acima apontados mostram a importância de prevenção de toda a população sexualmente ativa, uma vez que o risco de infecção por HPV é iminente.

Das 2.837 lâminas examinadas, 22 ou 0,8% das amostras apresentavam alterações celulares associadas à infecção pelo HPV. Destas 6 lâminas pertenciam a pacientes jovens, mulheres na faixa etária dos 14 aos 20 anos, 8 lâminas em pacientes com faixa etária de 21 a 30 anos, 4 lâminas apresentaram alterações na faixa de 31 a 40 anos e também de 41 a 50 anos, não foi observadas essas alterações em lâminas de mulheres com idade superior a 50 anos.

Portanto, a maioria das amostras são de mulheres jovens, com vida sexual ativa e em fase reprodutiva.

Conforme a **figura 4**, observamos que a incidência de infecção por HPV em mulheres com até 20 anos de idade (3,08%) é também maior em relação às mulheres adultas (< de 1%). Estes dados corroboram com a literatura nacional, discordando da literatura mundial.

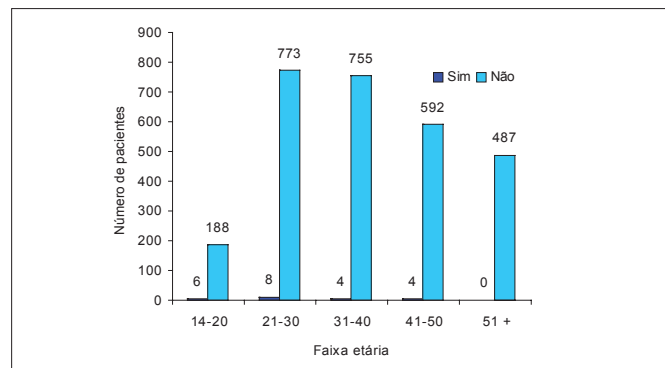


Figura 4: Alterações celulares associadas à infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) em relação à faixa etária, em mulheres usuárias do SUS na cidade de Patos de Minas - MG, no ano de 2000.

As dificuldades diagnósticas e o fato de uma parte das infecções por HPV serem assintomáticas e passarem despercebidas pelas pacientes, tornam difíceis as estimativas de prevalência. Acredita-se, no entanto, que aproximadamente um terço das mulheres sexualmente ativas abriguem alguma forma clínica de infecção por HPV (21).

A incidência de infecção por HPV é mais elevada após os primeiros anos da atividade sexual, entre jovens de 18 a 28 anos de idade (31).

Na literatura mundial, relata-se que a maior incidência por infecção por HPV ocorre entre 20 e 40 anos de idade, que coincide com o pico de atividade sexual (5).

Provavelmente, essa discordância implica fatores sócio-econômico-culturais diferentes entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, ocorrem no Brasil cerca de 12 milhões de casos de Doenças Sexualmente Transmissíveis ao ano (23).

Nos países subdesenvolvidos e nos países em desenvolvimento, a etiologia das doenças infecciosas está fortemente vinculada à pobreza. A "causalidade social" das doenças infecciosas constitui aspecto de maior relevância para a epidemiologia, visto que revela importantes limitações do modelo biomédico da doença (35).

Conforme **figura 5**, observamos que a incidência de infecção por HPV é alta em adolescentes, prevalecendo mesmo assim em mulheres adultas.

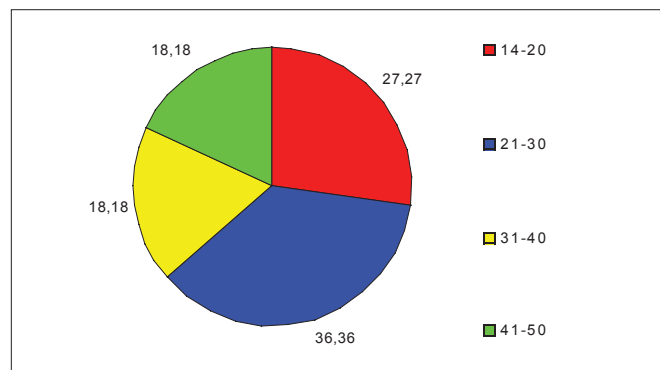


Figura 5- Alterações celulares (%) associadas à infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) em relação à faixa etária, em mulheres usuárias do SUS na cidade de Patos de Minas - MG, no ano 2000.

A frequência de detecção do HPV através do esfregaço citológico tem sido relatada em torno de 2% (36, 17).

Em nosso estudo, a frequência foi menor (0,8%), provavelmente devido à alta prevalência de amostras sem células representativas da JEC (Junção escamo-colunar).

A zona de transformação da cérvix (JEC), na qual as células colunares podem sofrer metaplasia escamosa, está mais exposta durante a adolescência do que na vida adulta. Esta área é mais susceptível à infecção pelo HPV, sendo que, a partir dela, originam-se a maior parte de lesões precursoras e carcinomas cervicais. Respostas imunes incompletas podem também favorecer estas infecções (15).

A maior incidência de infecção por HPV ocorre entre os 20 e 40 anos de idade, que coincide com o pico da atividade sexual, sendo concordante com os nossos achados, quando comparamos a proporcionalidade das alterações em relação à faixa etária (5).

Recentes estudos têm demonstrado uma maior prevalência de infecção pelo HPV associada a alterações citológicas pelo exame de Papanicolaou em populações de adolescentes, comparadas às mulheres adultas (7). O início precoce da atividade sexual aumenta a probabilidade de infecção por HPV.

Em nosso estudo dois fatores, provavelmente, foram limitantes para que não houvesse concordância com estes relatos: a amostragem de pacientes jovens foi bem menor em relação às outras faixas etárias estudadas e a representabilidade das amostras comprometendo a qualidade dos exames.

Embora a detecção da infecção por HPV possa ser feita a olho nu com a observação de verrugas genitais ou também através da colposcopia, essa informação não estava contida nos dados clínicos recebidos com as amostras. Provavelmente muitas mulheres poderiam apresentar algum tipo de sintoma ou lesão durante a coleta do material, mas infelizmente na época, os profissionais envolvidos na coleta do material não observaram esse dado clínico, o que iria contribuir muito para um tratamento mais rápido, maior controle da doença e prevenção.

A sensibilidade do diagnóstico histológico da infecção por HPV é bem maior do que na citologia.

Comparando a acurácia dos exames histopatológicos, colposcópico e citológico (3), encontraram concordância dos diagnósticos em 65,6% dos casos, mostrando que o emprego das três metodologias (colposcopia + citologia + histologia) em conjunto, seria o ideal, aumentando acentuadamente o número de casos diagnosticados.

Mas, infelizmente, esta ainda não é a realidade dos nossos serviços, pois a colposcopia e a histologia são considerados exames caros para a maioria da população brasileira. O exame preventivo é incentivado pelo Instituto Nacional do Câncer através de campanhas educativas, sendo gratuito a toda população feminina, o que facilita que essas mulheres tenham a realização do exame periódico de citologia.

Na faixa etária de 14 a 20 anos de idade, 12,88% das amostras examinadas estavam limitadas por ausência de células da JEC, mantendo-se essa percentagem até a faixa etária de 40 anos e aumentando significativamente nas faixas etárias acima dos 40 anos de idade.

A **figura 6** demonstra o alto índice de amostras que não apresentaram células da JEC (Junção escamo – colunar) o que compromete a acuidade do exame de Papanicolaou.

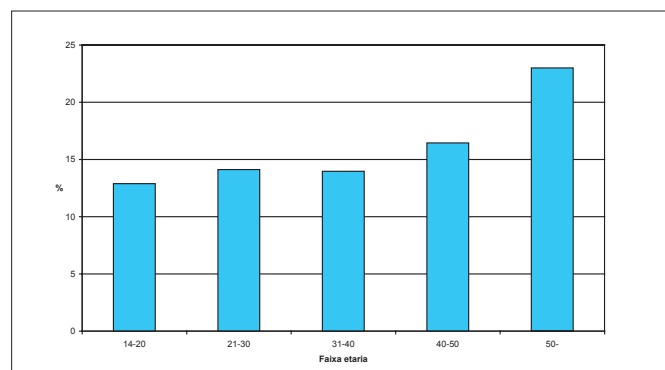


Figura 6: Ausência de células da JEC (Junção escamo-colunar) relacionada à faixa etária em mulheres usuárias do SUS na cidade de Patos de Minas –MG, no ano de 2000.

Vários autores citam que um grande número de esfregaços falso - negativos está relacionado com a amostra inadequada, ou seja, amostra que não contém componentes da JEC (10, 29, 14).

Com a introdução do Sistema de Bethesda em 1998, a adequação das amostras para o exame citológico passou a ser um ponto de extrema importância a ser avaliado durante o exame dos esfregaços cervicais.

A noção de uma coleta correta implica na obtenção de uma quantidade suficiente do local adequado, evitando introduzir hemácias ou células do estroma devido a uma abrasão excessivamente vigorosa. Eles consideram ainda, que um esfregaço é interpretável e representativo do conjunto da mucosa cervical quando contém pelo menos dois

dos três elementos a seguir: células endocervicais, células malpighianas metaplásicas e muco cervical (11).

A presença de células endocervicais e/ou metaplásicas caracteriza a amostra como satisfatória (16).

Provavelmente, a falta das células representativas da Junção escamo-colunar em mulheres jovens sejam por procedimentos técnicos inadequados.

O estudo mostrou que a prevalência das amostras que não apresentavam componentes da JEC (Junção Escamo-Colunar) elevou-se significativamente com o aumento da idade (acima dos 40 anos) ou seja, em mulheres menopausadas. Na coleta citológica de mulheres mais velhas, (18) relatam que uma ótima amostra, de uma mulher em pós-menopausa, pode não apresentar células endocervicais por causa das alterações fisiológicas normais, e não por uma técnica inadequada.

Os médicos ultimamente determinam o que é uma "amostra adequada" para uma determinada paciente, baseados em informações integrantes da história clínica, inspeção visual da cérvix e relato da citopatologia (18).

Seguimos as definições e critérios do Sistema Bethesda para a interpretação da adequabilidade das amostras:

"...Quatro elementos constituem a adequação da amostra para a detecção de anormalidades do cérvix uterino: (a) identificação da amostra e da paciente, (b) informação clínica aplicável, (c) interpretação técnica e, (d) composição celular e amostra da zona de transformação" (18).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a incidência de infecção por HPV foi maior em populações de adolescentes em comparação às outras faixas etárias.

Há uma estreita relação entre a infecção por HPV e aos hábitos de vida.

Fator de risco para a aquisição de infecção por HPV envolve, principalmente à falta de informação em relação à sua prevenção.

Conclui-se, que a falta de uma educação sexual e uma visão liberal da sexualidade acarreta consequências em Saúde Pública, portanto, a importância de prevenção de câncer de colo uterino não é só importante para a população de mulheres adultas, mas também nas adolescentes sexualmente ativas.

Com relação à representabilidade das amostras, o Sistema Bethesda aponta critérios de interpretação e de avaliação de serviços.

A amostra do canal cervical melhora o desempenho do exame citológico para o diagnóstico da lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau e, portanto, é mandatória no rastreamento do câncer de colo uterino e seus precursores. Observou-se um alto índice de lâminas sem a representação das células da Junção Escamo-Colunar (JEC), o que provavelmente comprometeu o diagnóstico do efeito citopático pelo Papiloma Vírus Humano (HPV).

REFERÊNCIAS

1. ALEIXO, N. A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. Revista de Saúde Pública. n. 25:326-333, 1991.
2. BARRETO, M. L. Emergência e "Permanência" das doenças infecciosas: implicações para a saúde pública e para a pesquisa. HC – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, l(3): 18-25, 1998.
3. CAVALCANTI, S. M.; ZARDO, L. G.; OLIVEIRA, L. H. S. Human Papillomavirus Infection: Correlation of colposcopy, cytology. Hystopathology and in si-

- tu hibridization. J. Bras. Patol. v. 33, 1997, p. 62-69.
4. COLEMAN, N.; BIELEY, H. D.; RENTON A. M. et al. Immunological events in regressig genital warts. Am. J. Clin. Pathol. 2002.
5. DE PALO, G.; STEFANON, B.; OTTI, S. Infecção pelo Papiloma Virus. In: DE PALO, G. Colposcopia e patologia do trato genital inferior. Trad. Maria Inês M. Fabricio e Rachele M. Santoro. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1993, cap. 9, p. 133-188 (original italiano).
6. DÔRES, G. B.; RIBEIRO, M. C. M.; COSTA, R. L. R. et al. Subtipo de HPV em lesões intra-epiteliais e invasoras do colo uterino. Importância e implicações terapêuticas. II Jornada Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, Anais. 1994, p. 73.
7. EDELMAN M.; FOX, A. S.; ALDERMAN A. M. et al. Cervical Papanicolaou smears adnormalities in inner city Bronx adolescents: prevalence, progression and immune modifiers. Cancer. 1999, 87:184-189.
8. FOCCHI, J.; BOVO, A. C.; SILVA, I. D. C. G. Papiloma Vírus Humano (HPV), 2000. Disponível em: <http://www.sogesp.com.br>. Acesso em: 15 jun. 2000.
9. FORMENTI, L. Governo quer controlar doenças sexualmente transmissíveis. 2002. Disponível em: <http://www.sogesp.com.br>. Acesso em: 10 ago. 2003.
10. GAY, J. D.; DONALDSON, L. D.; GOELLNER, J. R. False negative results in cervical cytologic studies. Acta Cytol. v. 29, 1984, p. 1043-1046.
11. GOMPEL, C. & KOSS, L. G. Citologia ginecológica e suas bases anatomo-clínicas. 1. ed. São Paulo: Manole Ltda, 1997.
12. HEIN, K.; SCHREIBER K.; COHEN M. et al. CERVICAL cytology: the need for routine screening in the sexually active adolescent. J Pediatric. 1989, 91:123-126.
13. INCA, Instituto Nacional do Câncer. Câncer do colo do útero. 2003. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/utero/>. Acesso em: jul. 2003.
14. JOSTE, N. E.; CRUM, C.; CIBAS, E. S. Cytologic/histologic correlation for quality control in cervicovaginal: Experience with 1582 paired cases. Am. J. Clin. Pathol. v. 32, 1995, p. 32-34.
15. KAHN, J. An update on human papillomavirus infection and Papanicolaou smears in adolescents. Current Pediatr. 2001, 13:303-309.
16. KRAEMER, B. B. The Bethesda System for reporting cervical vaginal smears: A contemporary approach to quality improvement. Adv. Pathol. Lab. Med. v. 5, 1992, p. 13-33.
17. KREBS, H. B. Genital Human Papillomavirus infection. Clin. Obst. Gynecol. v. 32, 1989, p. 105-110.
18. KURMAN, R. J.; SOLOMON D. O Sistema Bethesda para o Relato de Diagnóstico Citológico Cervico vaginal. Rio de Janeiro: Revinter, 1997.
19. LEVI, J. E. HPV: Porque e quando diagnosticar. Newslab. 1995, p. 66-72.
20. LEY, C.; BAUER H. M.; REIGOLD A. et al. Determinantes of genital human papillomavirus infection in young women. J Natl Cancer Inst. 1991; 83:997-1003.
21. LÖRINZC, A. T. & REID, R. Clínicas obstétricas e ginecológicas da América do Norte, Papilomavírus humanos. v. 3 e 4, 1996, Rio de Janeiro: Interlivros, p. 565-74;759-86.
22. MAGGIE, F. DST. Disponível em: www.mns.com.br/noticias. Acesso em: 06 abr. 2004.
23. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Laboratório Cito – Histopatológico. Brasília/DF, 1987.
24. MORAES, M. C.; BASSANI, D. P. S. Aspectos Psicológicos do Infectado pelo HPV. I Consenso Brasileiro de Papiloma Vírus Humano (HPV). 1. ed. São Paulo, 2000.
25. MURTA, E. F. C.; SOUZA, M. A. H.; ADAD, S. J. et al. Persistência da infecção por papilomavírus humano: análise da idade, sexarca, cor, hábito de fumar e método contraceptivo. J Bras Ginecol. 1998, 108:117-20.
26. NICOLAU, S. M. HPV no Homem. In: DÔRES, G. B. HPV na Genitália Feminina. São Paulo, 1994.
27. OKADA, M. M. K.; GONÇALVES, M. A. G.; GIRALDO, P. C. Epidemiologia e Patogênese do Papilomavírus humano (HPV). I Consenso Brasileiro de HPV. São Paulo, 2000.
28. ORIEL, J. D. The natural history of genital warts. Br J Vener Dis. 1971, 47:1-13.
29. PAIRWUTI, S. False negative Papanicolaou smears from women with cancerous and precancerous lesions of the uterine cervix. Acta Cytol. v. 35, 1990, n.1, p. 40-46.
30. PARKIN, D. M.; BRAY F. I.; DEVESA S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. EUR J Cancer 2001; 37:S4-66.
31. PEREYRA, E. A. G.; PARELLADA, C. I. Entendendo melhor a infecção pelo Papilomavírus Humano. São Paulo: Artsmed, 2003.
32. PEREZ, M.; GIL, A. O.; WROCLAWSKI, R. R. et al. HPV no homem. I Consenso Brasileiro de HPV. São Paulo, 2000.
33. RIVERA, Z.; AGUILER, A. T. et al. Epidemiologia Del virus Papiloma Humano (HPV). Rev. Chil. Obstet. Ginecol. [online]. v. 67, 2002, n. 6, p. 501-506. Disponível em: www.scielo.cl. Acesso em: 16 nov. 2003.
34. ROUCOURT, S.; AMARAL, E.; COSTA, K. C. B. C. HPV em Obstetrícia. I Consenso Brasileiro de HPV. São Paulo, 2000.
35. ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA, FILHO. N. Introdução à Epidemiologia. Rio de Janeiro: Médici, 2002.
36. SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; DE-VILLERS, E. M. et al. Sensitivity of the cytologic diagnostic of cervical condyloma in comparison with DNA-HPV hybridization studies. Diag. Cytopathol. v. 3, 1987, p. 250-55.
37. SMOTKIN, D. Virology Human Papillomavirus. Clin. Obst. Gynecol. v. 32, 1989, p. 141-146.
38. SONNEX, C. Human Papillomavirus infection with particular reference to Genital Disease. Journal Clinical of Pathology, n. 51, p. 643-648, 1998.
39. STONE, K. M. Epidemiologic aspects of genital HPV infection. Clin. Obst. Gynecol. v. 32, 1989, p. 112-115.
40. SYRJÄNEN K.; HAKAMA M.; SAARIKOSKI S. et al. Prevalence, incidence and estimated life-time of cervical human papillomavirus (HPV) infections in nonselected finnish population. Sex Transm Dis. 1990; 17:15-9.
41. SYRJANEN, K. J.; SYRJANEN S. M. Papillomavirus in human pathology. 1. ed. Chichester, 2000, p. 615.
42. WALBOOMERS J. M.; JACOBS M. V.; MANOS M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. J Pathol, 189: 12-19, 1999.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dra. Alda Maria Alves Queiroz
E-mail: aldaqueiroz@anvisa.gov.br

IFCC WORLDLAB

Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial

35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

PRÊMIO SBAC

REGULAMENTO



I - DO PRÊMIO

- 1) O Prêmio SBAC é promovido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC;
- 2) O Prêmio será no valor correspondente a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais), além de diploma alusivo;
- 3) O Prêmio será entregue na solenidade programada pela SBAC nos Congressos Brasileiros de Análises Clínicas - CBAC.

II - DOS OBJETIVOS

O Prêmio SBAC tem por objetivos;

- 1) Estimular o desenvolvimento de pesquisas na área de Análises Clínicas no País; e
- 2) Premiar o melhor trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.

III - DA PARTICIPAÇÃO

- 1) Poderão concorrer ao Prêmio, todos os trabalhos inscritos e apresentados no Congresso Brasileiro de Análises Clínicas;
- 2) Para concorrer ao Prêmio, os autores deverão remeter à Secretaria da SBAC, até 30 dias antes do Congresso, 05 (cinco) cópias em papel do trabalho original completo e uma cópia em disquete ou CD (linguagem Word for Windows), atendendo às normas de publicação da Revista Brasileira de Análises Clínicas, contendo: introdução (com objetivo definido do trabalho) material e métodos, resultados, discussão, conclusão, bibliografia, resumo em português, summary em inglês, palavras chaves (unitermos) e key words (uniterms).
- 3) Os trabalhos concorrentes deverão ser escritos em português e ser originais, ainda não publicados nem comprometidos para publicação em qualquer Revista Científica da Especialidade;
- 4) O trabalho premiado será obrigatoriamente publicado, com exclusividade, na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 5) Os demais trabalhos selecionados pela Comissão Julgadora para concorrer ao Prêmio SBAC, poderão ser publicados na Revista Brasileira de Análises Clínicas;
- 6) O não atendimento aos itens 1 a 3 desqualifica o trabalho e/ou o recebimento do Prêmio.

IV - DA COMISSÃO JULGADORA

- 1) A Comissão Julgadora será composta de pelo menos 05 (cinco) membros nomeados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, sendo um o Presidente;
- 2) A composição da Comissão Julgadora será divulgada pela SBAC nos Programas oficiais dos CBAC;
- 3) A Comissão Julgadora selecionará os 03 (três) melhores trabalhos apresentados, outorgando a um deles o Prêmio SBAC, e aos outros 02 (dois), será outorgado um diploma de Menção Honrosa;
- 4) A decisão da Comissão Julgadora é soberana e irrecorrível.

V - DISPOSIÇÕES GERAIS

- 1) O Prêmio SBAC é indivisível e será conferido a apenas um trabalho, ficando a inteiro critério dos autores seu eventual rateio;
- 2) O Trabalho concorrente ao Prêmio SBAC obrigatoriamente, deve ser apresentado na Sessão de Temas Livres por um dos autores regularmente inscrito no Congresso;
- 3) Caso a Comissão Julgadora dos Prêmios decidir não premiar nenhum dos trabalhos apresentados para concorrer ao prêmio em virtude de não atingir os objetivos de prêmios, o valor deste será revertido para pagamento dos anúncios da empresa promotora publicados na RBAC, no SBAC Jornal e divulgados no site da SBAC.
- 4) Os casos omissos serão resolvidos pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, ouvida a Comissão Julgadora.

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 2004.

Dr. Ulisses Tuma
Presidente

Informações:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Prêmio SBAC

Rua Vicente Licínio, 95 • Tijuca • Rio de Janeiro • RJ • 20270-902

Revista Brasileira de Análises Clínicas

AOS COLABORADORES

A REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades em laboratório de análises clínicas.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Todos os artigos destinados à Revista deverão ser redigidos na ortografia oficial, podendo ser apresentados:

- datilografados: duas vias de cada, espaço duplo em folhas de papel ofício, numeradas no ângulo superior direito e com margens de 3 cm de ambos os lados.
- computador: disquete com o programa utilizado além de duas cópias de seu conteúdo.

As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas), quadros e tabelas poderão ser apresentados à parte, ou feitos através de programas eletrônicos com o respectivo disquete e devidamente identificados, assinalando-se, no texto, onde deverão ser inseridos.

No preparo do texto, os autores deverão obedecer à seguinte ordem:

Título* em português

Título em inglês

Nome do autor ou autores (dados pessoais no rodapé)

Resumo em Português - Unitermos

Resumo em inglês - Key Words

Introdução

Material e métodos

Resultados

Discussão

Agradecimentos

Referências bibliográficas

*Um asterisco após o título, é colocado com o objetivo de mencionar o local (Universidade, Departamento, Laboratório, etc.) em que se realizou a pesquisa e, se for o caso, as fontes financiadoras).

TÍTULO - Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

RESUMOS - Deverão ser concisos e claros, pondo em relevo de forma precisa os fatos essenciais encontrados e as conclusões obtidas; serem redigidos de forma impessoal e conterem no máximo 200 palavras.

INTRODUÇÃO - Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos do mesmo setor. Extensas revisões da literatura devem ser evitadas, devendo ser substituídas por referências aos trabalhos ou fontes mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

MATERIAL E MÉTODOS - Deverão ser descritos de modo breve, porém o suficiente para possibilitar a repetição do trabalho; métodos e técnicas já publicados, a menos que tenham sido modificados substancialmente, deverão ser apenas referidos por citação.

RESULTADOS - Deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, etc. simples e ilustrativos.

DISCUSSÃO - Deve ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se hipóteses baseadas nos mesmos.

AGRADECIMENTOS - Devem ser inseridos no final do trabalho, antes das referências.

O estilo editorial da Revista segue, em linhas gerais, o *Style Manual of Biological Journals* (Conference of Biological Editors, Committee on Form and Style. *Style Manual of Biological Journals*, 2nd. Washington, American Institute of Biological Sciences, 1974).

As nomenclaturas, abreviações e unidades bioquímicas e físico-químicas devem seguir as adotadas pelo *Handbook of Biochemistry* (Sober, H. A. - *Handbook of Biochemistry*, 2nd. ed. Cleveland, Chemical Rubber Co., 1977, Sec. A4-A100). *Handbook of Chemistry and Physics* (West R. C. - *Handbook of Chemistry and Physics*, 53rd. ed. Cleveland Chemical Rubber Co., 1972-1973), e, essencialmente, o recomendado pela WHO através da *Resolution WHA 30.30 adopted by thirtieth World Health Assembly, May 1977; Système International d'Unités: use of SI units in medicine e da publicação The SI for Health Professions*. WHO, 1977.

As atividades enzimáticas devem ser expressas em unidades internacionais e seguir o adotado em *Enzyme Nomenclature* (*Enzyme Nomenclature*, Elsevier Publishing Co., 1965).

A nomenclatura dos microrganismos deve obedecer aos critérios adotados pelo Manual de Bergey (Breed, H. S.; Murray, E. G. D. & Smith, N. R. - *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1957).

REFERÊNCIAS - Deverão ser apresentados somente os trabalhos consultados ligados ao assunto e citados no texto. Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências.

No texto - As referências no texto podem citar o sobrenome do autor e ano ou o n° na referência.

Na bibliografia - a relação das referências deve ser numerada e colocada em ordem alfabética dos sobrenomes dos autores, e seguir o disposto para artigos ou livros:

a) artigos - sobrenome do autor (ou autores), seguido das iniciais; título do trabalho; título do periódico (abreviaturas de acordo com o World Scientific Periodicals); volume (sublinhado) e número do volume, se houver; número da página inicial, número da página final, ano.

b) livros - sobrenome do autor (ou autores ou editor responsável), seguido das iniciais; título do livro; edição, tradução (se for o caso); local de publicação, editora, ano. Número de páginas, se um volume, ou número de volumes, se mais. No caso de consulta de páginas particulares, então citá-las.

- Ilustrações: deverão ser citadas no texto como "Fig.", numeradas e vir acompanhadas de legendas explicativas. Os desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas poderão ser feitos com nanquim preta, em papel vegetal e elaboradas de modo a poderem ser reduzidas a 1/2 ou 1/3 do tamanho original, sem perda de nitidez ou legibilidade. Para as curvas é conveniente indicar os pontos por meio de círculos, triângulos, etc., afim de que, na redução não fiquem menores que um milímetro. O computador também poderá ser utilizado para esses itens, devendo serem acompanhados de provas impressas e respectivo disquete com o programa utilizado.

- Fotografias: deverão ser apresentadas em envelope à parte: serem nítidas e de bom contraste, feitas em papel brilhante e trazer no verso o nome do autor, título do artigo e número com que irão figurar no texto.

- Quadros e tabelas: deverão ser numeradas em arábico e apresentadas datilografadas, desenhadas em papel vegetal ou feitas em computador, acompanhadas de provas impressas e disquete com o programa utilizado. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consultas ao texto. São permitidas notas explicativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições das experiências. Seguir o quanto possível, as normas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Nenhuma casa, em quadros ou tabelas, deverá ficar vazia; a ausência de dados será representada por:

- quando o fenômeno não existe;

0; 0,0 quando o fenômeno existe, não atingindo o seu valor, porém, o adotado no quadro;

... quando o dado não foi apurado, não implicando, porém, afirmar ou não a existência do fenômeno.

Quando o fenômeno for mensurável, deverá ser expresso de maneira a somente figurarem os algarismos significativos.

DA PUBLICAÇÃO

1. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação de pelo menos dois pareceres de membros do Conselho de Redação.
2. Os originais, os disquetes de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
3. No caso de haver mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação. Na ausência dessa informação, o primeiro será considerado o responsável.
4. Os trabalhos em língua estrangeira serão submetidos a um revisor competente (pelo que será cobrada uma taxa dos autores) e devolvidos se a redação for inadequada.
5. Para correspondência ou contatos posteriores, os autores responsáveis devem fornecer os seus endereços, telefone, fax ou E-mail (quando houver).
6. A reprodução dos trabalhos publicados na Revista será permitida quando citada a origem da publicação:

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Rua Vicente Licínio, 99 - Tel.: 0XX(21)2187-0800 - Fax:

0XX(21)2187-0805 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-902

Home page: HYPERLINK <http://www.sbac.org.br>

www.sbac.org.br - e-mail: HYPERLINK

<mailto:geral@sbac.org.br> teac@sbac.org.br

Título de Especialista em Análises Clínicas

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

Os candidatos para se inscreverem no Concurso do TEAC, deverão solicitar regulamento e ficha de inscrição na SBAC-Nacional ou Regionais/Delegacias, por fax, telefone, e-mail, carta ou pessoalmente.

Condições para inscrição no Concurso do TEAC:

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

As Disciplinas:

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

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

As Provas:

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

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

Avaliação da Prova de Títulos a Outorga do TEAC.:

Os Candidatos aprovados terão que enviar no prazo máximo de 2 anos (de acordo com o Regulamento do TEAC), Currículo Vitae e cópia de documentação comprobatória de exercício profissional e atualização de conhecimentos.

Validade do TEAC:

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

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

Próximo Concurso do TEAC:

Informamos, que o 67º Concurso para Outorga do TEAC – Título de Especialista em Análises Clínicas, será realizado em 09/06/2007 de 08 às 12h (Prova Escrita/Slide) e 13:30 às 18h (Prova Oral), durante o 34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 7º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, em BELO HORIZONTE – MG.

A taxa de inscrição para o Concurso do TEAC e TECC é no valor R\$ 198,00 (cada). Para os inscritos no 34º CBAC e 7º CBCC, haverá desconto de 50% nas inscrições.

O prazo de recebimento das fichas de inscrição para o Concurso do TEAC será até o dia 26/05/2007, (data de postagem).

Lembramos que a ficha de inscrição e o pagamento da taxa para o Concurso do TEAC, deverão ser enviados para a SBAC-Nacional, Rua Vicente Licínio, 99 – Tijuca – 20270.902 – RIO DE JANEIRO – RJ.

**No caso de dúvida e esclarecimentos,
entre em contato conosco:**

**SBAC, através dos tel./fax (21) 2187-0800 e 2187-0805 ou
através do e-mail: teac@sbac.org.br**

**SBCC, através dos tel./fax (62) 3229-0468 e 3223-5661 ou
através do e-mail: sbacco@terra.com.br**