

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

A RBAC é classificada como Qualis Internacional A em farmácia.



Consolidando o Futuro das
Análises Clínicas no Brasil

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| Prevalência e perfil de resistência de microrganismos isolados do trato respiratório inferior de pacientes internados no hospital divina providência - Porto Alegre, RS..... | 83 |
| <i>Sandro Goulart Martins, Rafael Silvio Remus Pulcinelli, Alzira Resende do Carmo Aquino e Roberto Christ Vianna Santos</i> | |
| Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the lower respiratory tract of inpatients in divina providencia hospital- Porto Alegre, RS | |
| Prevalência de anti-hcv, anti-HIV e co-infecção HCV/HIV em um presídio feminino do estado do Rio Grande do Sul..... | 87 |
| <i>Cristina Gabe, Gustavo Muller Lara</i> | |
| Prevalence of anti-HCV, anti-HIV and co-infection HCV/HIV in a female prison of the State of Rio Grande do Sul | |
| Doença Arterial Coronariana: Ausência de associação entre o índice apoB/apoA-I e o grau de ateromatose..... | 91 |
| <i>Luciana Moreira Lima, Maria das Graças Carvalho, Cirilo Pereira da Fonseca Neto, José Carlos Faria Garcia, Marinez de Oliveira Sousa</i> | |
| Coronary Artery Disease: Lack of association between apoB/apoA-I ratio and atheromatosis extent | |
| Associações entre diferentes fatores de risco para doenças cardiovasculares e hipertensão arterial de pacientes com dislipidemia pertencentes a uma comunidade universitária..... | 97 |
| <i>Rodrigo Schütz; Geny A. Cantos; Cláudia Cavaletti; Cláudia S. M. Silva; Elizabeth M. Hermes; Maria da Graça Balén</i> | |
| Associations between different risk factors to arterial cardiovascular diseases and arterial hypertension of patients with dyslipidemics pertaining to a university community | |
| Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular..... | 101 |
| <i>Michele Duarte, Rafael Noel Moresco e Andreza Fabro de Bem</i> | |
| Assays for measurement of oxidized low density lipoprotein and its application as a marker of cardiovascular risk | |
| Espécies fúngicas responsáveis por onicomicose em Recife, Pernambuco..... | 107 |
| <i>Kedma de Magalhães Lima, Rossana Sette de Melo Régio, Francisco Montenegro & Norma Suelly Sobral da Silveira</i> | |
| Fungal species causing onychomycosis in Recife, Pernambuco | |
| Hemostasia na gravidez: Um estudo prospectivo..... | 111 |
| <i>Moreira, C.E.S., Ogino, M.A.S., de Moraes, A.C.R., Neiva, T.J.C.</i> | |
| Hemostasis in pregnancy: A prospective study | |
| Atipias cervicais detectadas pela citologia em mulheres atendidas em dois hospitais da rede pública de São Luís - MA..... | 115 |
| <i>Luiz Mário da Silva Silveira, América de Lourdes Nogueira da Cruz, Manuel dos Santos Faria</i> | |
| Cervical atypias detected by cytology in women attended in two public hospitals of São Luís - MA | |
| Atipias escamosas de significado indeterminado: novas qualificações e importância na conduta clínica..... | 121 |
| <i>Karen Shelen Bueno</i> | |
| Atypia in squamous cells of undetermined significance: news qualifications and importance in clinical conduct | |
| Análise do retinol sérico em puerperas atendidas em uma maternidade pública de Natal/RN..... | 129 |
| <i>Fernanda Barros Soares, Karla Danielly da Silva Ribeiro, Roberto Dimenstein</i> | |
| Analysis of serum retinol in puerperal women at a public maternity in Natal, RN | |
| Níveis de colesterol total versus fatores regionais de três cidades do Paraná..... | 133 |
| <i>Dalton S. Melo; Edson C. Fréz; Maristeli C. R. Fréz; Germano A. Pascotto; Arthur E. Svidzinski; Terezinha Inez E. Svidzinski; Márcia R. Batista</i> | |
| Total cholesterol level versus regional factors on three cities of Paraná state | |
| Prevalência e Perfil de Susceptibilidade antimicrobiana em cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL), isoladas de pacientes do Hospital Universitário/Uel..... | 137 |
| <i>Angelo Augusto Chiachia Pasta, Fernando Henrique Arthico Fração, Gerusa Luciana Gomes Magalhães, Regina Mariuza Borsato Quesada</i> | |
| Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profile of <i>Klebsiella pneumoniae</i> producing of Extended Spectrum β-lactamases Enzyme, isolated from patient of University Hospital/ UEL | |
| Controle de qualidade laboratorial pré-analítico: avaliação de solicitações médicas de exames bioquímicos no hospital de clínicas da universidade estadual de campinas, São Paulo, Brasil..... | 143 |
| <i>Livia Maria Dias Freire, Fábio Lima Sodré, Rogério Antônio de Oliveira, Lúcia Nassi Castilho, Eliana Cotta de Faria</i> | |
| Pre-analytical laboratory quality control: evaluation of medical requests for biochemical laboratory exams in the university of campinas state university hospital, São Paulo, Brazil | |
| Prevalência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtoras de β-lactamases do tipo AMP-C em isolados clínicos de Santa Maria - RS..... | 147 |
| <i>Ana Paula Mortari, Eder Moraes Saucedo, Renata da Silva Pereira, Marta Duarte, Bruno Stefanello Vizzotto e Roberto Christ Vianna Santos</i> | |
| Prevalence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AMP-C β-lactamases in clinical isolates of Santa Maria-RS | |
| Avaliação da taxa de isolamento de micoplasmas do trato urogenital por um método comercial em comparação com meios de cultura produzidos no próprio laboratório..... | 151 |
| <i>Eduardo M. Dalmarco, Solange L. Blatt, Caio M. M. de Cordova</i> | |
| Assessing the rate of isolation of mycoplasma treatment of urogenital by a business method in compared with media culture produced in itself laboratory | |
| Variantes estruturais da hemoglobina: estudo sobre prevalência em militares..... | 155 |
| <i>Zama Messala Luna da Silveira, Elisângela Nascimento da Silva, Neussana Kellen de Araújo Medeiros Torreão, Isabelle Medeiros Bezerra, Tereza Maria Dantas de Medeiros</i> | |
| Structural variants of hemoglobin: study about prevalence in military | |
| Estudo comparativo dos diagnósticos de vaginose bacteriana pelas técnicas de Papanicolaou e Gram..... | 159 |
| <i>Beatriz Schlatter Hasenack, Ana Karina M. Benthien Miquelão, Audrey de Souza Márquez, Eryka Helena Trapp e Pinheiro & Ana Paula Uraui</i> | |
| Comparative study for the diagnosis of bacterial vaginosis by Papanicolaou and Gram staining techniques | |

2

VOLUME 40

2008

Prevalência e perfil de resistência de microrganismos isolados do trato respiratório inferior de pacientes internados no Hospital Divina Providência- Porto Alegre, RS*

Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the lower respiratory tract of inpatients in Divina Providencia Hospital-Porto Alegre, RS

Sandro Goulart Martins, Rafael Silvio Remus Pulcinelli, Alzira Resende do Carmo Aquino & Roberto Christ Vianna Santos

RESUMO - Anualmente, dois milhões de casos de pneumonia ocorrem no Brasil e mais de 33000 brasileiros evoluem para óbito. Pneumonia hospitalar é a mais fatal das infecções hospitalares, com taxas de mortalidade de 30 a 60%. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência e o perfil de resistência de microrganismos isolados do trato respiratório inferior de pacientes internados no Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS. Foram analisados 945 amostras de janeiro de 2004 a dezembro de 2005. Foram utilizadas metodologias automatizadas e/ou preconizadas pelos NCCLS para a identificação e análise do perfil de resistência. As espécies mais frequentemente isoladas foram *Pseudomonas aeruginosa* com 64 (27,6%), *Staphylococcus aureus* 37 (15,9%), *Klebsiella pneumoniae* 22 (9,5%), *Streptococcus pyogenes* 14 (6,1%), *Serratia liquefaciens* 10 (4,3%), *Haemophilus* sp. 10 (4,3%) e *Acinetobacter baumannii* 10 (4,3%). Os Gram negativos apresentaram um elevado índice de resistência, entre os antimicrobianos testados, onde 71,3% das cepas foram resistentes à Cefuroxima, 67,6% resistentes à Cefotaxima, 57,6% à Gentamicina, 55% à Ciprofloxacina. Entre os Gram positivos, 65,5% das cepas foram resistentes à Penicilina, 66,7% à Ampicilina, 47,8% à Eritromicina e 46,9% à Lincomicina. Os resultados deste estudo mostraram uma alta prevalência de *P. aeruginosa* associado a altas taxas de resistência.

PALAVRAS-CHAVE - Pneumonia, prevalência, perfil de resistência.

SUMMARY - Annually, two million pneumonia cases occur in Brazil and more than 33,000 Brazilians evolve for death. Nosocomial pneumonia is the most common fatal nosocomial infection with attributable mortality rates ranging from 30 to 60%. The aim of this study was evaluate the prevalence and the antimicrobial susceptibility of microorganisms collected from the lower respiratory tract of inpatients in Divina Providência Hospital-Porto Alegre, RS. Were analyzed 945 samples from January of 2004 to December of 2005, and were used NCCLS recommended or automated tests for bacterial identification and antimicrobial susceptibility. The most frequently isolated species were *Pseudomonas aeruginosa* with 64 cases (27.6%), *Staphylococcus aureus* 37 (15.9%), *Klebsiella pneumoniae* 22 (9.5%), *Streptococcus pyogenes* 14 (6.1%), *Serratia liquefaciens* 10 (4.3%), *Haemophilus* sp. 10 (4.3%) and *Acinetobacter baumannii* 10 (4.3%). The Gram negative showed high rates of resistance, where 71.3% of strains had been resistant to Cefuroxim, 67.6% to Cefotaxim, 57.6% to Gentamicin, 55% to Ciprofloxacin. In the Gram positives, 65.5% of strains had been resistant to Penicillin, 66.7% to Ampicilin, 47.8% to Eritromicin and 46.9% to Lincomicin. The results of this study demonstrated a higher prevalence of *P. aeruginosa* and higher resistance rate.

KEYWORDS - Pneumonia, prevalence, antimicrobial susceptibility

INTRODUÇÃO

Anualmente, dois milhões de casos de pneumonia ocorrem no Brasil e mais de 33.000 brasileiros evoluem para óbito. Embora esta patologia seja uma preocupação especial para idosos e aqueles com doenças crônicas, ela pode acometer pessoas jovens e saudáveis também. As altas taxas de mortalidade encontradas em pneumonias hospitalares refletem em grande parte fatores relacionados ao paciente, à instituição e a características regionais. Como muitos pacientes com pneumonia hospitalar apresentam também outras patologias de base, imunossupressão, alteração do nível de consciência e/ou disfunção cardiopulmonar, o início rápido da terapia antimicrobiana adequada é essencial para obter sucesso terapêutico (TORRES, 1998). Os microrganismos mais comuns responsáveis pela Pneumonia Adquirida no Hospital (PAH), incluem os patógenos das espécies *Enterobacter*, *Escherichia coli*, espécies da *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia marsecens*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* sensível ou resistente a metilicina. Essas infecções respiratórias acontecem quando, no mínimo, uma das três condições existe: imunossupressão, uma inoculação dos microrganismos alcança o trato respiratório do paciente e anula as defesas do hospedeiro, ou um microrganismo al-

tamente virulento está presente. O paciente hospitalizado também está exposto a potenciais bactérias provenientes de outras fontes (equipamentos e dispositivos de terapia respiratória e transmissão de patógenos pelas mãos da equipe profissional) (SMELTZER, 2002). Numerosos fatores relacionados às internações também podem exercer um papel importante no desenvolvimento da PAH (p. ex., agentes terapêuticos que levam à depressão do sistema nervoso central com diminuição da ventilação, o comprometimento da remoção das secreções ou o potencial de aspirações; os procedimentos toráco-abdominais prolongados ou complicados, que podem comprometer a função mucociliar e as defesas celulares do hospedeiro; a intubação endotraquel; o uso prolongado ou inadequado de antimicrobianos, o uso de sondas nasogástricas). A PAH está associada a um elevado índice de mortalidade, em parte devido à virulência dos microrganismos, à resistência destes aos antimicrobianos e à doença subjacente do paciente (SMELTZER, 2002). O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência e o perfil de resistência de microrganismos isolados do trato respiratório inferior de pacientes internados no Hospital Divina Providência de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Recebido em 21/03/2007

Aprovado em 10/03/2008

*Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica
- Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 945 amostras de material provenientes do trato respiratório inferior de pacientes internados no Hospital Divina Providência, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005. Foi realizado o método de Bartlett (OPLUSTIL, 2004) para a avaliação da qualidade do material recebido (quando escarro). O material foi analisado inicialmente pelo método de Gram. Após, foi realizado o isolamento das amostras, onde foram utilizados os meios de cultura, Ágar Sangue, Ágar Mc Conkey, Ágar Azida Sódica e Ágar Chocolate. Os métodos de identificação se basearam em metodologias tradicionais (NCCLS, 2003) ou automatizadas (Mini-Api-BioMerrieux) para a identificação bacteriana. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado através do teste de disco-difusão (Kirby-Bauer). As colônias isoladas foram suspensas em solução fisiológica até escala 0,5 Mac Farland e posteriormente semeadas no Ágar Mueller-Hinton. Os antimicrobianos utilizados para avaliar o perfil de resistência dos bacilos Gram-negativos foram: Cefuroxima, Ceftriaxona, Ceftazidima e Cefotaxima, Cefepima, Imepenem, Meropenem, Polimixina B, Gentamicina, Amicacina e Ciprofloxacina. Para avaliação do perfil de resistência dos Gram-positivos foram utilizados Penicilina, Ampicilina, Oxacilina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Vancomicina, Teicoplanina, Eritromicina e Lincomicina.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisadas 945 amostras do trato respiratório inferior, onde 232 (24,5%) houve crescimento bacteriano significativo, conforme figura 1. Os materiais biológicos mais frequentes podem ser visualizados na figura 2.

A maior frequência dos microrganismos isolados foram os Gram-negativos, contribuindo com 161 (69,4% das cepas isoladas), e os Gram-positivos tiveram frequência de 71 (30,60% das cepas isoladas), como pode ser visualizado na figura 3. Entre os microrganismos Gram-negativos isolados, houve uma prevalência de 27,6% de *Pseudomonas aeruginosa* (64/232), seguido de *Klebsiella pneumoniae* com 9,5% (22/232), *Serratia liquefaciens* com 4,3% (10/232) casos, *Haemophilus sp.* e *Acinetobacter baumannii* com 4,3% (10/232), e *Escherichia coli* juntamente com *Stenptrophomonas maltophilia* com 3,4% (8/232) conforme mostrado na figura 4. A alta prevalência de bacilos gram-negativos, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, como causa de pneumonia e outras infecções hospitalares, aumentou muito a preocupação com este microrganismo, tendo em vista que este é um importante produtor de β -lactamases (SADER, 2001 e YANGAN, 1997).

Os patógenos predominantes para a PAH são os bacilos gram-negativos (*P. aeruginosa* e espécies de *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*) e *S. aureus*. A pneumonia por *Pseudomonas sp.* ocorre preferencialmente em pacientes debilitados, naqueles com estado mental alterado e naqueles com intubação prolongada ou traqueostomias. A pneumonia estafilocócica pode ocorrer por inalação de microrganismos ou sua disseminação através da via hematológica. Ela é geralmente acompanhada por bacteremia e hemoculturas positivas. A pneumonia estafilocócica pode ser responsável por mais de 30 % dos casos de PAH, apresentando elevado índice de mortalidade (SMELTZER, 2002, TAVARES, 2000 e MOREIRA, 2004).

A gravidade das infecções das vias aérea inferiores por *Pseudomonas aeruginosa* pode variar desde uma colonização ou traqueobronquite benigna até a ocorrência de broncopneumonia necrosante grave. A colonização é observada em pacientes com fibrose cística, outras doenças pulmonares crônicas ou neutropenia. A infecção pulmonar por *Pseudomonas* em pacientes com fibrose cística tem sido associada à exacerbação da doença subjacente, bem como a doença invasiva no parênquima pulmonar. As cepas mucóides estão comumente associadas nestes pacientes e sua erradicação é difícil com antibioticoterapia. Os pacientes neutropênicos e outros pacientes imunocomprometidos são frequentemente expostos a *Pseudomonas* através de exposição a equipamentos de tratamento respiratório combinado. A doença invasiva nesta população caracteriza-se por broncopneumonia difusa e geralmente bilateral, com formação de microabscessos e necrose tecidual (MURRAY, 2000). Os Gram-positivos (Figura 6) também apresentaram grande significado nas infecções do Trato Respiratório Inferior. O *Staphylococcus aureus* apresentou uma prevalência de 15,9% (37/232), entre os outros Gram-positivos, o *Streptococcus pyogenes*, apresentou 6,1% (14/232) e o *Streptococcus pneumoniae* que foi relatado somente em 3% dos casos (7/232). Os resultados do perfil de resistência microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos podem ser visualizados nas figuras 6 e 7.

Os microrganismos isolados apresentaram um elevado perfil de resistência frente ao grupo das penicilinas. Para a Ampicilina houve índices de resistência de 66,70%, para a Penicilina 65,50% e para a Oxacilina, 42,90%. Quando os Gram-positivos apresentarem resistência a este fármaco, todos demais Beta-lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e ao monobactâmico aztreonam não deverão ser utilizados, independentemente do resultado do antibiograma, pois haverá falha terapêutica quando do uso *in vivo* destes fármacos. (OPLUSTIL, 2004).

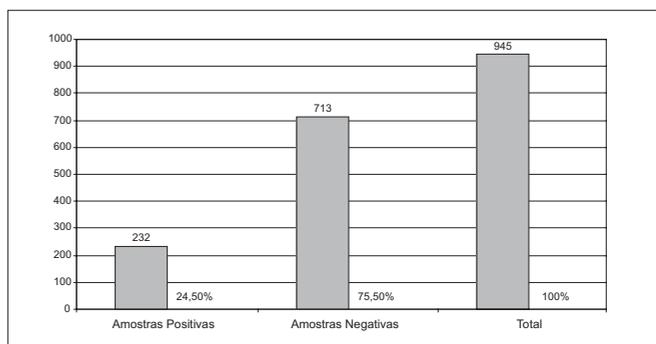


Figura 1 – Número de amostras analisadas

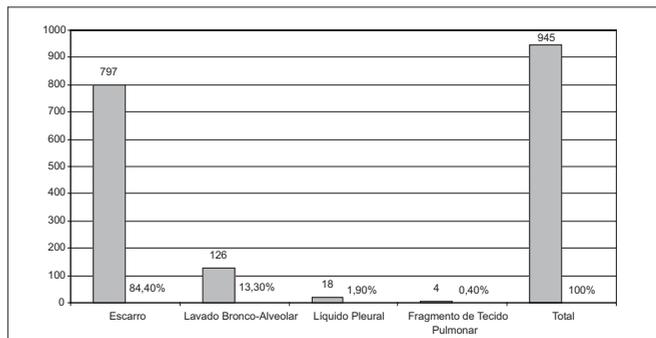


Figura 2 – Materiais biológicos analisados

CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência e o perfil de resistência de microrganismo isolados do trato respiratório inferior de pacientes atendidos no Hospital Divina Providência de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Uma comunicação da Organização Mundial da Saúde em 2001 estimou que dos 52 milhões de seres humanos mortos em 2000 em mais de 17 milhões (33%) a causa foi uma doença infecciosa. Destas, as infecções bacterianas foram responsáveis por 11,4 milhões (22% do total de mortes e 67% das mortes por infecções) (MAIDEN, 2002).

Dentre as razões para esta elevada participação das infecções bacterianas entre as causas de morte do homem situa-se a crescente resistência destes microrganismos aos fármacos antimicrobianos, denunciada nas várias publicações sobre a disseminação destes em hospitais e sua ascensão no meio extra-hospitalar (MAIDEN, 2002).

Este estudo pode relatar a importância da averiguação da prevalência e do perfil de resistência dos microrganismos que acometem doenças no trato respiratório, principalmente o inferior, pois uma grande parte da população mundial, evolui a óbito, devido a esta patologia.

Este trabalho detectou uma alta prevalência de bacilos Gram-negativos, principalmente de *Pseudomonas aeruginosa*, que é um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose, que produz em grande quantidade e variedade β-lactamases, degradando fármacos beta-lactâmicos, principalmente cefalosporinas e carbapenêmicos (KONEMAN, 2001).

Outro microrganismo que apresenta-se como um dos maiores causadores de pneumonias, a *Klebsiella pneumoniae* também apresentou um elevado perfil de resistência, sendo este microrganismo um grande responsável por pneumonia adquirida em hospitais. Isto ocorre devido ao comprometimento das defesas do hospedeiro, quando uma inoculação dos microrganismos alcança o trato respiratório do paciente e anula as defesas do hospedeiro, ou quando um microrganismo altamente virulento está presente.

Os cocos Gram-positivos, também apresentaram alta prevalência, principalmente o *Staphylococcus aureus*, um microrganismo saprófita, que torna-se clinicamente importante principalmente quando da imunossupressão do hospedeiro. O perfil de resistência dos Gram-positivos mostrou-se elevado. Principalmente entre as penicilinas, mais de 65% dos Gram-positivos, apresentaram resistência frente a Ampicilina e a Penicilina. 42% dos Gram-positivos também obtiveram resistência frente a Oxacilina. Estes dados são significativos, tendo em vista a importância da Oxacilina como um marcador de resistência intrínseca. Quando os Gram-positivos apresentarem resistência a este fármaco, todos demais Beta-lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e o monobactâmico aztreonam não deverão ser utilizados, independentemente do resultado do antibiograma, pois haverá falha terapêutica quando do uso *in vivo* destes fármacos. (OPLUSTIL, 2004).

No estudo dos Glicopeptídeos, as cepas dos Gram-positivos não obtiveram resistência diante da Vancomicina e do Teicoplanin, tendo em vista que estes antimicrobianos são usados somente em âmbito hospitalar, sendo as últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por estes microrganismos.

É necessário a reflexão da sociedade sobre a importância da disseminação de microrganismos multirresistentes e do uso extensivo e errôneo de antimicrobianos. Deve ser estimulada a implementação de um sistema de vigilância mais rígido para que não ocorra o uso inadequado de agentes antimicrobianos – diminuindo o impacto do surgimento de microrganismos multirresistentes.

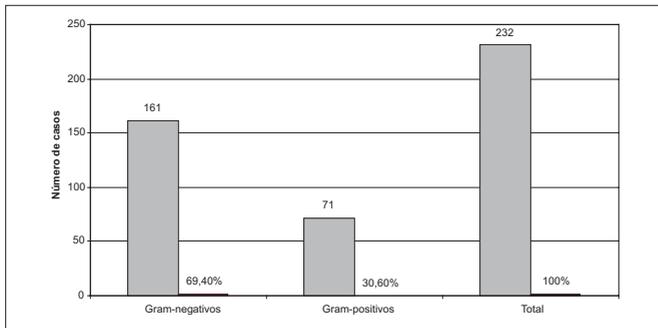


Figura 3-Número total de microrganismos isolados

TABELA I

Prevalência de microrganismos Gram-negativos

| Gram-negativos | Número de Prevalência | |
|-------------------------------------|-----------------------|------|
| | Casos | (%) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 64 | 27,6 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 22 | 9,5 |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | 10 | 4,3 |
| <i>Haemophilus sp.</i> | 10 | 4,3 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 10 | 4,3 |
| <i>Escherichia coli</i> | 8 | 3,4 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 8 | 3,4 |
| Outros | 29 | 12,6 |
| Total | 161 | 69,4 |

TABELA II

Prevalência de microrganismos Gram-positivos

| Gram-positivos | Número de Prevalência | |
|---------------------------------|-----------------------|------|
| | Casos | (%) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 37 | 15,9 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 14 | 6,1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 7 | 3 |
| Outros | 13 | 5,6 |
| Total | 71 | 30,6 |

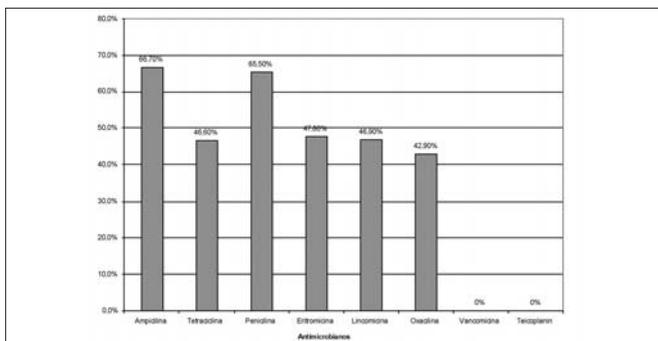


Figura 4-Perfil de resistência de microrganismos Gram-positivos

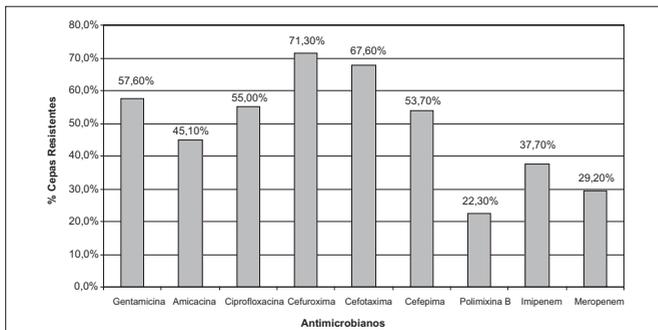


Figura 5-Perfil de resistência de microrganismos Gram-negativos.

REFERÊNCIAS

- KONEMAN, E. W., et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Medsi, 2001.
- MAIDEN, M.C.J.; Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, p. 12-20, 2002.
- MOREIRA, J. S.; Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. V. 30 (6). p. 540-548, 2004.
- MURRAY, P. R.; Microbiologia médica. 3ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2000.
- NCCLS. Padronização dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-Difusão: Norma Aprovada. 8ª ed. V. 23. Nº 1. Pensilvânia, EUA, 2003.
- OPLUSTIL, C. P.; Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2ª ed. São Paulo, SP: Sarvier, 2004.
- SADER, Hélio S; MENDES, Rodrigo E; GALES, Ana C; JONES, Ronald N; PFALLER, Michel A; SAMPAIO, Jorge. Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos de Bactérias Isoladas do Trato Respiratório Baixo de Pacientes Internados em Hospital Brasileiros. *Jornal de Penumologia, são Paulo*, v. 27, n. 2, p. 59-67, 2001.

- SMELTZER, S. C.; BARE, B. G.; Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica. 9ª ed. 2 V. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002.
- TAVARES, W.; Bactérias gram-positivas problemáticas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 33, n. 3, 2000.
- TORRES, A.; AZNAR, R.; GATELL, J. M.; JIMENEZ, P.; GONZALES, J. Incidence, risk and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *American Review Respiratory Diseases*, n.142, p.523-528, 1998.
- YANGAN, M.B.; Hospital-acquired pneumonia and its management. *Crit Care Nurs*, n.20, p.36-43, 1997.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Professor Roberto Christ Vianna Santos
Centro Universitário Franciscano – UNIFRA
Laboratório de Microbiologia Clínica
Rua dos Andradas, 1614, Prédio 4 – Sala 115-B
Cep:97010-032 Santa Maria - RS
Fone: (55)3220-1200

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro a 02 de outubro 2008
Fortaleza - CE - Brasil



*Sociedade
Brasileira de
Análises
Clínicas*

A SBAC facilita para você ir ao maior congresso mundial de Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário
Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.
Corra e aproveite!

Maiores informações:

21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

Prevalência de anti-HCV, anti-HIV e co-infecção HCV/HIV em um presídio feminino do Estado do Rio Grande do Sul*

Prevalence of anti-HCV, anti-HIV and co-infection HCV/HIV in a female prison of the State of Rio Grande do Sul

Cristina Gabe¹ & Gustavo Muller Lara²

RESUMO - A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (HCV), sendo um problema mundial de saúde pública. O HCV possui semelhante epidemiologia ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e ambos são transmitidos principalmente pelas vias parenteral e sexual. Assim, a co-infecção HCV/HIV é comumente observada em populações de alto risco a essas vias de transmissão. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anti-HCV, anti-HIV e co-infecção HCV/HIV em um presídio feminino do estado do Rio Grande do Sul – Brasil. Foram analisadas 76 amostras sorológicas de presidiárias, 11 (14,47%) foram positivas para HCV, 7 (9,21%) para HIV e 2 (2,63%) para co-infecção HCV/HIV. Através dos resultados encontrados foi possível verificar que mulheres encarceradas constituem um grupo de risco, vulnerável ao HCV, HIV e co-infecção HCV/HIV e devem ser realizadas campanhas de prevenção e testes de triagem para essas doenças nesta população.

PALAVRAS-CHAVE - Hepatite C, HIV, co-infecção-HCV/HIV, presídio.

SUMMARY - The hepatitis C is an infectious disease caused by hepatitis C virus (HCV) and is a worldwide problem of public health. The HCV and human immunodeficiency virus (HIV) present common epidemiology and both are transmitted principally by parenteral and sexual routes. The co-infection HCV/HIV is particularly common among specific groups considered to be at higher risk for this transmission routes. The objective of this study was to evaluate the prevalence of anti-HCV, anti-HIV and co-infection HCV/HIV in a female prison of the state of Rio Grande do Sul – Brazil. It was examined 76 samples of female prisoners, 11 (14,47%) were positive to anti-HCV, 7 (9,21%) to anti-HIV, and 2 (2,63%) to co-infection HCV/HIV. This data confirm that female prison population is considered at risk and vulnerable to HCV, HIV and co-infection, and prevention strategies and screening tests should be performed for these diseases in this population.

KEYWORDS - Hepatitis C, HIV, co-infection, prison.

INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (HCV), sendo um importante problema mundial de saúde pública e a principal causa de doença hepática crônica, cirrose, hepatocarcinoma e transplante hepático. Há aproximadamente 180 milhões de pessoas infectadas, cerca de 3% da população mundial e é relevante o número de pessoas que desconhecem a própria infecção, pois o quadro clínico da doença é geralmente assintomático^{4,23}. Apenas 20 a 25% dos pacientes com infecção aguda livram-se da doença⁶ e o tempo para ocorrer a depuração viral é de aproximadamente 3 anos¹³. Nos homens, essa remissão espontânea é menos freqüente¹³. Por outro lado, cerca de 50 a 85% dos infectados evoluem lentamente para a cronicidade²². Nas mulheres e crianças essa evolução é mais lenta¹⁸. O risco para o desenvolvimento de hepatite C crônica é maior em indivíduos do sexo masculino, maiores de 25 anos, de etnia afro-americana, imunodeprimidos, co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e assintomáticos⁴. O HCV persiste no sangue, fígado e linfócitos¹⁹. O vírus já foi isolado na saliva, urina, sêmen e secreções vaginais, porém, a real forma de transmissão via esses fluidos biológicos não está bem elucidada^{9,10}. Sabe-se que a transmissão vertical e a sexual são incomuns e, que, a transmissão parenteral é a principal rota de transmissão do HCV²². Conseqüentemente, indivíduos de maior risco compreendem receptores de transfusão sanguínea ou órgão transplantado (casos que vêm sendo eliminados desde o início das triagens em bancos de sangue), pacientes em hemodiálise e, principalmente, usuários de drogas injetáveis^{14,19,21,22}.

Além disso, existem estudos que apontam riscos de transmissão do HCV por compartilhamento de escovas dentais ou barbeadores²², uso coletivo de materiais perfuro-cortantes não esterilizados adequadamente, como, por exemplo, em procedimentos odontológicos, de tatuagem, *body-piercing*, acupuntura e compartilhamento de equipamentos para uso de cocaína intranasal^{16,22}.

A infecção pelo HCV pode ser diagnosticada pela pesquisa sorológica de anticorpos anti-HCV, os quais surgem após 4 a 20 semanas do contágio¹⁹, através de testes imunoenzimáticos (EIA ou ELISA) de terceira geração, altamente sensíveis e capazes de detectar a infecção após 6 a 8 semanas da exposição²². A confirmação de um EIA positivo pode ser realizada por testes suplementares Immunoblot recombinante (RIBA), mais específicos e empregados para verificar falso-positivos em indivíduos com baixo risco de infecção. Porém, o padrão-ouro para diagnosticar a infecção ativa é a identificação do HCV-RNA através de testes de biologia molecular qualitativos ou quantitativos. A genotipagem também é útil para fins epidemiológicos e guia de tratamento².

O tratamento atual para a hepatite C compreende a utilização de α -interferon peguilado (adição de um polietileno-glicol ao tradicional α -interferon usado anteriormente) associado à Ribavirina^{5,17,22}.

Nos últimos anos, a infecção pelo HCV vem sendo comumente observada em indivíduos HIV positivos. Ambos RNA - vírus, o HCV e o HIV compartilham semelhantes modos de transmissão, principalmente via parenteral, sexual e vertical. Usuários de drogas injetáveis representam um grupo de alto risco para co-infecção HCV/HIV^{11,12}. Um estudo sobre hepatites virais em indivíduos HIV positivos revelou

Recebido em 18/04/2007

Aprovado em 08/04/2008

*Trabalho realizado no Curso de Graduação de Biomedicina, Instituto de Ciências da Saúde, FEEVALE. Novo Hamburgo-RS
¹Biomédica; ²Professor Mestre e Supervisor de Estágio, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Biomedicina da FEEVALE.

que as chances de adquirir HCV são 10,8 vezes maiores quando a transmissão do HIV ocorreu via parenteral¹⁵. Nos indivíduos co-infectados há uma rápida progressão à cirrose e à AIDS, menor depuração viral, aumento da mortalidade em HIV positivos, maior hepatotoxicidade na terapia anti-HIV e, conseqüentemente, menor resposta no tratamento da hepatite C¹⁷.

Populações carcerárias também se caracterizam como grupos de risco para infecções transmitidas principalmente pelas vias parenterais e sexuais. Estudos realizados em presídios brasileiros evidenciam a vulnerabilidade dessa população à transmissão parenteral de HCV e HIV através do uso de drogas injetáveis e a transmissão via práticas sexuais de risco, além de associarem esse quadro às condições de confinamento, status social marginal e serviços de saúde precários^{3,8}. Strazza *et al* encontraram em seu estudo a prevalência de 16,2% para HCV e 13,9% para HIV em um presídio feminino brasileiro²⁰. Estudos de co-infecção HCV/HIV, nessa população, são raros ou inexistentes. Há pesquisas de co-infecção em populações de risco, como a realizada por Zocratto *et al* em um grupo que faz uso de drogas injetáveis - prática também relatada por presidiários - encontrando 37,09% de homens co-infectados HCV/HIV e apenas 5,5% de mulheres²⁴. Neste mesmo estudo, 69,9% dos 272 usuários de drogas injetáveis estudados já esteve confinado em instituições correccionais²⁴.

Sendo assim, este estudo tem o propósito de determinar a prevalência de anti-HCV, anti-HIV e co-infecção HCV/HIV em mulheres presidiárias devido a suas condições de confinamento e, conseqüentemente, exposição a fatores de risco, como também alertar dirigentes de saúde pública para esse problema.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento: Foi realizado um estudo de prevalência, retrospectivo, sobre anticorpos anti-HCV e anti-HIV em um presídio feminino do estado do Rio Grande do Sul.

Amostras: Foram analisadas 76 amostras séricas de presidiárias para os parâmetros anti-HCV e anti-HIV durante os meses de setembro e outubro de 2006. Essas amostras estavam armazenadas no Laboratório Santa Helena, localizado na cidade de Porto Alegre/RS, responsável pela realização de exames a esse presídio feminino. Os dados referentes à característica amostral não foram analisados, pois os prontuários apresentavam-se incompletos.

Dosagens: Os exames sorológicos para a pesquisa de anti-HCV e anti-HIV foram realizados pelo método Imunoensaio Enzimático ELISA de terceira geração (InVitro®) em conjunto com o Laboratório Santa Helena e o Laboratório de Biomedicina da Feevale.

Análise estatística: Os resultados armazenados foram analisados pelo método estatístico de distribuição binomial avaliado pelo software Microsoft Office Excel 2003.

Ética: Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale sob o processo de nº 4.00.03.06.371 e, também, autorizada pelos responsáveis do Laboratório Santa Helena, envolvidos nesse estudo.

RESULTADOS

O estudo de 76 amostras de presidiárias permitiu estimar a prevalência de anticorpos anti-HCV, anti-HIV e de co-infecção HCV/HIV, numa população presidiária feminina do estado do Rio Grande do Sul. Entre as amostras estudadas, 14,47% foram positivas para anti-HCV, 9,21% para anti-HIV e 2,63% para co-infecção HCV/HIV.

A avaliação descritiva da população em estudo não pôde ser realizada devido ao fato dos protocolos que caracterizavam as amostras estarem incompletos. Assim, características como idade, tipo racial, tempo de detenção e uso de drogas não puderam ser avaliados.

A análise estatística mostrou a prevalência dos parâmetros analisados com um intervalo de confiança de 95%. O teste z foi aplicado para a análise de distribuição binomial baseado em resultados de estudos observados na literatura. Os dados obtidos estão resumidos na tabela I.

TABELA I
Prevalência de anti-HCV, anti-HIV e co-infecção HCV/HIV nas amostras analisadas

| Parâmetros | N | Prevalência (%) | IC 95% | Z calculado |
|---------------------|----|-----------------|-------------|-------------|
| Anti-HCV | 11 | 14,47 | [7,8; 24,8] | 0,24 |
| Anti-HIV | 7 | 9,21 | [4,1; 18,6] | 1,01 |
| Co-infecção HCV/HIV | 2 | 2,63 | [0,4; 10,0] | 0,85 |

Z crítico = 1,96

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A existência de anticorpos anti-HCV e anti-HIV nas amostras analisadas indica que essa população constitui um grupo de risco para hepatite C, HIV e co-infecções HCV/HIV. De acordo com os resultados deste estudo, foi observado que não existe diferença estatística de prevalência entre anti-HCV, anti-HIV e co-infecção na amostra estudada, em relação aos dados descritos na literatura, sugerindo que os resultados sigam uma distribuição semelhante.

Dentre as formas de aquisição do HCV e HIV, práticas sexuais e uso de drogas injetáveis são comportamentos de risco associados a indivíduos em condições de confinamento³. Strazza *et al*. indicaram que, além do uso de drogas injetáveis pelas presidiárias, o risco de aquisição do HCV e HIV aumentava quando seus parceiros também possuíam esse comportamento²⁰.

De forma semelhante, o estudo de Burattini *et al*. evidenciou em um presídio brasileiro a transmissão parenteral por uso de drogas injetáveis como principal forma de aquisição do HIV, além de sugerir a detecção sorológica de anti-HCV como indicador da transmissão do HIV pela via parenteral. Também, o estudo, verificou que o tempo de detenção e a incidência do HIV são diretamente proporcionais³. Já, Guimarães *et al*., associaram a positividade do HCV em uma população correccional masculina às variáveis de tempo de detenção superior a 130 meses, detenção prévia e uso de drogas ilícitas antes da prisão⁸.

As limitações encontradas neste estudo não permitiram associar essas variáveis nesta população devido ao fato dos protocolos das amostras estarem incompletos.

Em relação à co-infecção HCV/HIV encontrada neste presídio feminino do estado do Rio Grande do Sul e, considerando que estudos na literatura relacionados à co-infecção HCV/HIV em presídios, são raros ou inexistentes; supõe-se que este possa ser um dado preliminar de co-infecção em populações carcerárias. Porém, os resultados devem ser analisados com cautela, visto a falta das características amostrais que impediram a análise descritiva da população. Enfim, as prevalências de anti-HCV, anti-HIV e co-infecção HCV/HIV encontradas neste presídio feminino caracterizam esta população como vulnerável a essas infecções. Por isso, populações carcerárias devem ser alvo de campanhas de prevenção que visam o controle destes problemas de

saúde pública e também conscientizam presidiários ainda não infectados a evitar comportamentos de risco. Além disso, é de grande importância a implantação de testes diagnósticos de rotina logo no início da detenção, possibilitando o diagnóstico e o tratamento precoce das infecções.

REFERÊNCIAS

- Arends, J.E.; Boucher, C.A.B.; Hoepelman, A.I.M. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus coinfection: where do we stand? *N Engl J Med*, 35 (5): 156-163, 2005.
- Brandão, A.B.M.; Fuchs, S.C.; Silva, M.A.A.S.; Emer, L.F. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 9 (3): 161-166, 2001.
- Burattini, M.N.; Massad, E.; Rozman, M.; Azevedo, R.S.; Carvalho, H.B. Correlation between HIV and HCV in Brazilian prisoners: evidence for parenteral transmission inside prison. *Rev Saúde Pública*, 34 (5): 431-436, 2000.
- Chen, S.L.; Morgan, R.T. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*, 3 (2): 47-52, 2006.
- Chevaliez, S.; Pawlotsky, J.M. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci*, 3 (2): 35-40, 2006.
- Chung, R.T. Acute hepatitis C virus infection. *Clin infect dis*, 41: 14-17, 2005.
- Dieterich, D.T. HCV in HIV: challenges and opportunities. *PRN Notebook*, 6 (1): 14-18, 2001.
- Guimarães, T.; Granato, C.F.H.; Varela, D.; Ferraz, M.L.G.; Castelo, A.; Kallás, E.G. High prevalence of hepatitis C infection in Brazilian prison: identification of risk factors for infection. *Braz J Infect Dis*, 5 (3): 111-118, 2001.
- Leão, J.C.; Teo, C.G.; Porter, S.R. HCV infection: aspects of epidemiology and transmission relevant to oral health care workers. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35: 295-300, 2006.
- Lemos, J.; Benvegnù, S.A. Frequência do vírus da hepatite C na região de abrangência do Hemopasso – Hemocentro Regional de Passo Fundo. *Rev Medica HSVP*, 16 (35): 15-18, 2004.
- Mendes-Corrêa, M.C.J.; Barone, A.A.; Guastini, C. Hepatitis C virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. *Rev Inst Med trop S Paulo*, 43 (1): 15-19, 2001.
- Mendes-Corrêa, M.C.J.; Barone, A.A. Hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus: a review and experience of a Brazilian ambulatory. *Rev Inst Med trop S Paulo*, 47 (2): 59-64, 2005.
- Micallef, J.M.; Kaldor, J.M.; Dore, G.J. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*, 13: 34-41, 2006.
- Moreira, C.M.; Lemos, M.F.; Longui, C.A.; Granato, C. Hepatitis C and hemodialysis: a review. *Braz J Infect Dis*, 9 (3): 269-275, 2005.
- Pavan, M.H.P.; Aoki, F.H.; Monteiro, D.T.; Gonçalves, N.S.L.; Escanhoela, C.A.F.; Júnior, F.L.G. Viral hepatitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Braz J Infect Dis*, 7 (4): 253-261, 2003.
- Ramji, A.S.; Yoshida, E.M. Long-term management of hepatitis C virus infection. *Can J CME*, 13: 75-83, 2001.
- Rockstroh, J.K. Should HIV/HCV Coinfected patients with severe hepatitis be treated for hepatitis C. *Presse Med*, 34 (20): 1585-1588, 2005.
- Santana, N.P.; Freitas, L.A.R.; Lyra, A.C.; Paraná, R.; Santana, G.; Trepo, C.; et al. Liver histological alterations in patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels in the city of Salvador, Northeast-Brazil. *Braz J Infect Dis*, 9 (2): 134-141, 2005.
- Strauss, E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34 (1): 69-82, 2001.
- Strazza, L.; Azevedo, R.S.; Carvalho, H.B.; Massad, E. The vulnerability of Brazilian female prisoners to HIV infection. *Braz J Med Biol Res*, 37 (5): 771-776, 2004.
- Vogler, I.H.; Nishiya, A.; Morimoto, H.K.; Reiche, E.M.V.; Bortolero, A.L.; Matsuo, T.; et al. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002. *Rev Inst Med trop S.Paulo*, 46 (6): 303-308, 2004.
- Wong, T.; Lee, S.S. Hepatitis C: a review for primary care physicians. *CMAJ*, 174 (5): 649-659, 2006.
- World Health Organization. Health Topics: Hepatitis. <http://www.who.int/topics/hepatitis/en/> (acessado em 09/Mai/2006).
- Zocratto, K.B.F.; Caiaffa, W.T.; Carneiro-Proietti, A.B.; Mingoti, S.A.; Ribeiro, G.J.R.; et al. HCV and HIV infection and co-infection: injecting drug use and sexual behavior, AJUDE-Brasil I Project. *Cad Saúde Pública*, 22 (4): 839-848, 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Cristina Gabe
Rua Castanhal 44, Bairro São Jacob
CEP 98200-000 – Ibirubá – RS
Fone: (54) 3324-1359
Celular: (54) 9142-3442
E-mail: crisgabe@pop.com.br

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
35^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica



28 de setembro a 02 de outubro 2008
Fortaleza - CE - Brasil



Sociedade
Brasileira de
Análises
Clínicas

A SBAC facilita para você ir ao
maior congresso mundial de
Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário
Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.
Corra e aproveite!

Maiores informações:
21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

Doença Arterial Coronariana: Ausência de associação entre o índice apoB/apoA-I e o grau de aterosmatose

Coronary Artery Disease: Lack of association between apoB/apoA-I ratio and atheromatosis extent

Luciana Moreira Lima¹, Maria das Graças Carvalho¹, Cirilo Pereira da Fonseca Neto², José Carlos Faria Garcia² & Marinez de Oliveira Sousa¹

RESUMO - O índice apoB/apoA-I representa o balanço entre partículas aterogênicas ricas em apolipoproteína B e as anti-aterogênicas, ricas em apolipoproteína A-I. O objetivo deste estudo, de caráter transversal, foi investigar a associação entre o índice apoB/apoA-I e o grau de aterosmatose coronariana em um grupo de indivíduos submetidos à angiografia, buscando estabelecer a possível correlação entre este parâmetro e a gravidade da doença arterial coronariana (DAC). Os níveis plasmáticos das apolipoproteínas A-I e B foram determinados em amostras de sangue de 38 indivíduos hígidos (controle), 35 indivíduos angiograficamente normais, 31 indivíduos apresentando aterosmatose leve/moderada e 57 apresentando aterosmatose grave. Os níveis plasmáticos de apolipoproteína B e o índice apoB/apoA-I foram significativamente mais baixos no grupo controle quando comparados com os demais grupos ($p < 0,001$), enquanto que os níveis de apolipoproteína A-I foram significativamente mais altos no grupo controle em relação aos demais ($p < 0,001$). Não foram observadas diferenças significativas para idade, sexo, índice de massa corporal, hipertensão arterial, história familiar e perfil lipídico entre os três grupos de indivíduos submetidos à angiografia coronariana. Apesar do índice apoB/apoA-I ter sido associado com a doença arterial coronariana, o mesmo não apresentou correlação com o grau de aterosmatose nos indivíduos estudados.

PALAVRAS-CHAVE - Índice ApoB/ApoA-I, Doença Arterial Coronariana.

SUMMARY - The apoB/apoA-I ratio represents the balance between atherogenic particles, rich in apoB, and the anti-atherogenic ones, rich in apo A-I. This study investigated the correlation of atheromatosis extent in subjects undergoing coronary angiography by using the apoB/apoA-I ratio. Apolipoproteins A-I and B were assessed in blood sample of 35 subjects with normal angiographically coronary arteries, 31 subjects with mild/moderate atheromatosis, 57 subjects with severe atheromatosis and 38 healthy subjects (controls). Apolipoprotein B and apoB/apoA-I ratio were significantly lower in controls compared to the other groups ($p < 0.001$), while apolipoprotein A-I was significantly higher in controls than in the subjects undergoing coronary angiography ($p < 0.001$). No significant differences were observed for lipid profile, age, gender, body mass index and clinical variables i.e., arterial hypertension and family history among the three groups of patients undergoing coronary angiography. Despite apoB/apoA-I ratio showed significantly higher in CAD patients when compared to controls, apoB/apoA-I ratio was not associated to the severity of CAD and did not provide further information in these subjects concerning to atheromatosis extent.

KEYWORDS - ApoB/apoA-I ratio, Coronary Artery Disease.

INTRODUÇÃO

As partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) apresentam uma molécula de apolipoproteína (apo) B em sua estrutura¹⁴. Assim, a concentração plasmática de apo B é um indicador do número total de partículas potencialmente aterogênicas, as quais se correlacionam com a fração colesterol não-HDL (lipoproteínas de alta densidade)²¹. A concentração plasmática de apo A-I está fortemente associada com as HDL, e a sua expressão parece determinar os níveis plasmáticos da fração colesterol HDL (HDLc)²³. Desta forma, o índice apoB/apoA-I representa o balanço entre as partículas de colesterol potencialmente aterogênicas, ricas em apo B, e as partículas de colesterol anti-aterogênicas, ricas em apo A-I. As apolipoproteínas podem ser medidas diretamente no plasma, por métodos exatos e precisos, padronizados internacionalmente^{10,11}, utilizando-se material de referência comum para apo A-I e apo B, o qual não está disponível para as medidas de HDLc e LDLc, e sem a interferência significativa de níveis elevados de triglicérides¹². Os níveis plasmáticos das apolipoproteínas são pouco influenciados pelas variáveis biológicas, enquanto que os parâmetros lipídicos apresentam variações de suas concentrações plasmáticas em resposta aos vários estímulos do controle metabólico¹⁵. Além disso, as dosagens de apolipoproteínas A-I e B podem ser realizadas sem a necessidade de jejum prévio do paciente^{3,20,25}.

Os valores das apolipoproteínas A-I e B têm sido descritos como melhores preditores de doenças ateroscleróticas do que os valores de lípidos e lipoproteínas^{16,23}, e tem sido sugerido que o índice apoB/apoA-I representa um parâmetro superior para predição de risco cardiovascular do que outros índices lipídicos, como colesterol total/HDLc, LDLc/HDLc e colesterol não-HDL/HDLc^{18,22}. O valor preditivo das apolipoproteínas A-I e B para doença arterial coronariana (DAC) está bem estabelecido e documentado na literatura. Níveis elevados de apo B, diminuição dos níveis de apo A-I e aumento do índice apoB/apoA-I têm sido consistentemente associados ao risco de DAC^{1,2,8,24,30}. Entretanto, a associação entre o índice apoB/apoA-I e a gravidade da doença ainda não está totalmente elucidada. O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre o índice apoB/apoA-I e a presença de graus crescentes de aterosmatose coronariana em indivíduos submetidos à angiografia, buscando correlacionar as possíveis alterações com a gravidade da DAC.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 123 pacientes, com faixa etária de 42 a 65 anos, de ambos os sexos, no Departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor de Belo Horizonte, Minas Gerais, após realização de angiografia coronariana. Com base nos resultados da angiografia coronariana, os indivíduos foram divididos em três grupos: angiograficamente normal

Recebido em 19/11/2007

Aprovado em 08/05/2008

Prêmio Doles de 2007

¹Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

²Hospital Socor, Belo Horizonte.

(n=35), ateromatose leve/moderada (n=31) e ateromatose grave (n=57). Este último grupo com ateromatose grave foi subdividido em três outros subgrupos considerando o número de artérias comprometidas: se uma, duas ou três. No mesmo período foram selecionados 38 indivíduos hígidos para composição do grupo controle, extraídos da comunidade em geral, com média de idade e índice de massa corporal (IMC) semelhantes à média dos pacientes participantes dos três grupos de estudo. No entanto, não fez parte do objetivo deste trabalho um estudo do tipo caso-controle.

O protocolo de estudo recebeu parecer favorável sob o ponto de vista ético e formal pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Soroc e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Aos indivíduos selecionados, foi feito o esclarecimento dos objetivos da pesquisa e, aqueles que estiveram de acordo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Uma ficha clínica de cada indivíduo com identificação, dados demográficos, história familiar e resultado da angiografia coronariana foi preenchida pelos médicos cardiologistas do Departamento de Hemodinâmica.

Foram excluídos do estudo indivíduos portadores de doenças intercorrentes como distúrbios da coagulação, doenças renais, hepáticas, tireoideanas, auto-imunes e câncer. Também não participaram os indivíduos que apresentaram síndrome coronariana aguda (infarto agudo do miocárdio ou angina instável) nos três meses que antecederam a coleta do sangue para as análises laboratoriais, bem como indivíduos em uso de anticoagulantes e drogas hipolipemiantes, ou aqueles com concentrações de triglicérides maiores que 400mg/dL.

A angiografia coronariana foi realizada por técnica percutânea, via femoral, tendo sido os filmes examinados por três médicos cardiologistas experientes e os laudos apresentados conforme critérios definidos pela redução dos diâmetros intraluminais da luz de pelo menos uma artéria coronária: até 30% de estenose foi classificada como ateromatose leve; de 30 a 69% de estenose foi classificada como ateromatose moderada e acima de 70% de estenose foi classificada como ateromatose grave.

A presença das variáveis tabagismo, sedentarismo e história familiar para DAC, foi constatada com base nas recomendações das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose¹⁹. Foram considerados tabagistas os indivíduos com consumo regular de qualquer quantidade de cigarros, por um período superior a seis meses até o mês anterior ao preenchimento da ficha clínica. Foram considerados sedentários os indivíduos que não praticavam exercícios físicos regularmente, com frequência mínima de 40 minutos pelo menos três vezes por semana. Foi considerada presença de história familiar para DAC indivíduos que apresentaram parentes de primeiro grau com menos de 55 para homens e menos de 65 anos para mulheres com DAC diagnosticada. Foram considerados hipertensos os participantes com diagnóstico prévio de hipertensão arterial que faziam uso regular de medicamentos anti-hipertensivos. Portadores de SCA anterior a três meses da entrevista foram considerados no estudo, incluindo aqueles que apresentaram quadro de infarto agudo do miocárdio ou angina instável.

As amostras de sangue venoso foram obtidas com o paciente em jejum de 12 horas. Os mesmos foram orientados para não praticarem atividade física vigorosa e evitar a ingestão de etanol, nas 24 e 72 horas, respectivamente, que antecederam a coleta de sangue, na tentativa de obter amostras biológicas de pacientes em estado metabólico de equilíbrio. Foram coletados 10mL de sangue venoso em tubo sem anticoagulante do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson). As amostras obtidas foram rapidamente centri-

fugadas a 3000rpm por 15 minutos para separação do soro, que foi aliquoteado e estocado à -70°C, até o momento das dosagens laboratoriais.

O colesterol total e triglicérides foram determinados pelos métodos enzimáticos colorimétricos *Randox® Cholesterol CHOD-PAP* e *Randox® Triglycerides GPO-PAP*, respectivamente. A determinação de HDLc foi realizada pelo método enzimático de eliminação da *Randox® HDL Cholesterol Direct*. Foi utilizada a equação de Friedewald⁴ para a estimativa do LDLc.

As dosagens de apo B e apo A-I foram realizadas pelo método turbidimétrico utilizando-se os conjuntos diagnósticos *Biotécnica® Apolipoproteína B Turbidimetria* e *Apolipoproteína A-I Turbidimetria*, respectivamente. O fundamento do teste baseia-se na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. Os antígenos apo A-I ou apo B presentes na amostra originam uma aglutinação imunológica com os anticorpos anti-apo A-I ou anti-apo B, respectivamente, presentes no reagente. O grau de aglutinação é proporcional à concentração de apo A-I ou apo B na amostra e pode ser medido por turbidimetria em 340nm. Este processo baseia-se na detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em meio líquido. Quando um anticorpo (anti-apo A-I ou anti-apo B) e a amostra (antígeno) são misturados, formam-se imunocomplexos. A diluição adquire turbidez, que é proporcional à quantidade de antígeno. Este método é chamado homogêneo, pois não possui fase sólida. Os coeficientes de variação observados foram de 2,67% e 2,29% para apo A-I e apo B, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus (Roche®) em sistema automatizado, utilizando-se os procedimentos técnicos recomendados pelos fabricantes e soros-controle específicos para verificar o desempenho dos ensaios.

A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para as variáveis contínuas. As variáveis categóricas (fatores de risco) foram analisadas pelo teste exato de contingência Qui-quadrado. Foi utilizado o teste de correlação de Pearson para analisar as correlações entre os parâmetros estudados. O nível de significância adotado foi de 0,05. Os programas Sigma Stat versão 1.0 e Prism versão 3.0 foram utilizados para realizar as análises e plotar o gráfico, respectivamente.

RESULTADOS

A caracterização dos grupos estudados é apresentada na tabela 1 e os resultados dos parâmetros bioquímicos são apresentados na tabela 2, como valores das médias e respectivos desvios-padrão. Os grupos avaliados apresentaram homogeneidade em relação à idade, sexo e IMC. As porcentagens de homens e mulheres também não se mostrou significativamente diferente nos grupos avaliados (tabela 1). Foram observadas diferenças significativas entre os grupos AnN e AG para tabagismo ($p=0,02$) e presença de SCA anterior a três meses da entrevista ($p>0,0001$). Para a variável sedentarismo, observou-se diferenças significativas entre os grupos AnN e ALM ($p=0,023$) e AnN e AG ($p=0,021$) (tabela 1).

Não houve diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros colesterol total, HDLc e LDLc. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos de indivíduos submetidos à angiografia coronariana (AnN, ALM, AG) e os indivíduos hígidos (grupo controle). Para triglicérides entre controle e AnN ($p<0,001$), controle e ALM ($p<0,001$), controle e AG ($p<0,001$); para ApoA-I entre controle e AnN ($p<0,001$), controle e ALM ($p<0,001$), controle e AG ($p<0,001$); Apo B entre controle e AnN ($p<0,001$), controle

e ALM ($p=0,001$), controle e AG ($p<0,001$). A figura 1 apresenta a distribuição dos valores obtidos para o índice apoB/apoA-I nos grupos estudados, além de apresentar também os valores para o mesmo índice em subgrupos do grupo com ateromatose grave considerando o número de artérias comprometidas pelo processo ateromatoso. A comparação entre estes subgrupos também não apresentou diferença significativa, embora tenha sido observada uma tendência ao aumento deste índice proporcionalmente relacionado ao número de artérias afetadas.

TABELA I
Caracterização dos grupos estudados

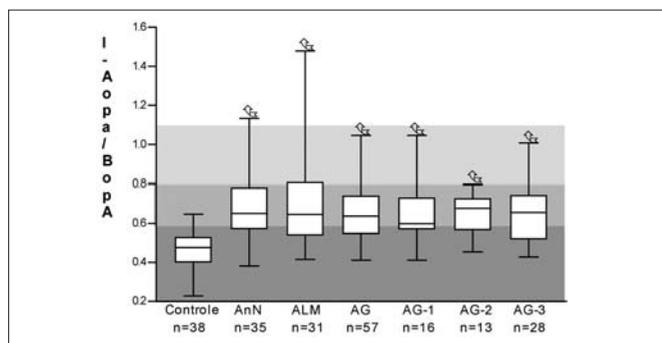
| | Controle | AnN | ALM | AG | p |
|---------------------------|------------|------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| n (M/F) | 38 (18/20) | 35 (16/19) | 31 (17/14) | 57 (31/26) | ---- |
| Homens | 18 (47,3%) | 16 (45,7%) | 17 (54,8%) | 31 (54,4%) | ns |
| Idade (anos) | 59,2 ± 6,2 | 59,0 ± 7,5 | 59,5 ± 9,0 | 60,5 ± 8,8 | ns |
| IMC (Kg/m ²) | 26,4 ± 4,4 | 25,3 ± 4,1 | 26,8 ± 4,7 | 25,8 ± 3,5 | ns |
| Tabagismo | 0 | 6 (17,1%) | 8 (25,8%) | 23 (40,4%) ^a | $p^a=0,020$ |
| Hipertensão Arterial | 0 | 31 (88,6%) | 25 (80,6%) | 48 (84,2%) | ns |
| Sedentarismo | 20 (52,6%) | 33 (94,3%) | 23 (74,2%) ^{a1} | 43 (75,4%) ^{a2} | $p^{a1}=0,023$ $p^{a2}=0,021$ |
| História familiar | 9 (23,7%) | 14 (40,0%) | 18 (58,1%) | 29 (50,8%) | ns |
| Diabetes mellitus | 0 | 5 (14,3%) | 7 (22,6%) | 8 (14,0%) | ns |
| SCA anterior à entrevista | 0 | 7 (20,0%) | 12 (38,7%) | 35 (61,4%) ^a | $p^a<0,0001$ |

Caracterização quanto ao n (tamanho), M (sexo masculino) e de F (sexo feminino), idade e índice de massa corporal (expressos como média e desvio padrão) e número de participantes e porcentagem da presença do fator de risco e síndrome coronariana aguda (SCA) nos grupos estudados. Foram observadas diferenças significativas entre as variáveis tabagismo, sedentarismo e presença de SCA anterior a três meses da entrevista, representadas pela letra: a. vs AnN (qui-quadrado). AnN = angiograficamente normais; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; ns = não significativo.

TABELA II
Parâmetros bioquímicos para os grupos estudados

| | Controle | AnN | ALM | AG |
|-------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| n | 38 | 35 | 31 | 57 |
| CT (mg/dL) | 179,4 ± 40,9 | 206,7 ± 49,3 | 203,4 ± 56,6 | 201,6 ± 44,4 |
| HDLc (mg/dL) | 47,2 ± 8,6 | 43,8 ± 9,9 | 43,7 ± 9,6 | 42,1 ± 9,4 |
| LDLc Friedewald (mg/dL) | 113,0 ± 36,3 | 129,3 ± 45,0 | 125,6 ± 46,7 | 127,7 ± 39,2 |
| TG (mg/dL) | 96,2 ± 43,3 | 167,6 ± 73,8 ^a | 170,3 ± 82,0 ^a | 159,4 ± 66,1 ^a |
| Apo A-I (mg/dL) | 152,1 ± 10,4 | 135,6 ± 19,9 ^a | 134,5 ± 18,7 ^a | 138,1 ± 16,3 ^a |
| Apo B (mg/dL) | 70,5 ± 13,9 | 90,7 ± 23,0 ^a | 89,7 ± 25,5 ^a | 89,1 ± 21,4 ^a |
| Índice ApoB/apo A-I | 0,46 ± 0,1 | 0,67 ± 0,1 ^a | 0,68 ± 0,2 ^a | 0,65 ± 0,1 ^a |

AnN = angiograficamente normais; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; CT = colesterol total; HDLc = colesterol HDL; LDLc = colesterol LDL; TG = triglicérides; As diferenças significativas estão representadas pela letra: a. vs Controle (ANOVA seguida de Teste de Tukey - $p<0,05$).



Índice apoB/apoA-I para os grupos controle, angiograficamente normal (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave com 1 artéria comprometida (AG-1), duas artérias comprometidas (AG-2) e três ou mais artérias afetadas (AG-3). A área sombreada em cinza escuro corresponde a valores considerados de baixo risco para infarto agudo do miocárdio (até 0,6) para o índice apoB/apoA-I, a área sombreada em cinza intermediário corresponde a valores considerados de risco intermediário (0,6 a 0,8), a área sombreada em cinza claro corresponde a valores considerados de alto risco (0,8 a 1,1). (?) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$), cada box indica a mediana, primeiro e terceiro quartil para o respectivo grupo, enquanto as linhas horizontais representam os valores máximo e mínimo de cada grupo.

Figura 1 – Distribuição do índice apoB/apoA-I nos grupos estudados e divisão do grupo ateromatose grave de acordo com o número de artérias comprometidas.

DISCUSSÃO

Este estudo transversal avaliou uma população de risco intermediário a elevado, considerando que os pacientes selecionados foram encaminhados à angiografia coronariana para avaliação de dor torácica e apresentaram perfil demográfico e fatores de risco associados à DAC conforme mostrado na tabela 1. Esse critério possibilitou maior confiabilidade na comparação entre os grupos. O grupo ateromatose grave apresentou número significativamente maior de indivíduos tabagistas e que apresentaram SCA anterior a três meses da etapa de randomização, quando comparado com o grupo angiograficamente normal quase todos os indivíduos são sedentários e que os grupos ALM e AG apresentam altas porcentagens de indivíduos sedentários. As porcentagens das variáveis hipertensão arterial, história familiar e *Diabetes mellitus* foram similar entre os quatro grupos.

Os participantes não apresentaram sobrepeso ou obesidade, sugerindo a ausência do componente metabólico nestes indivíduos. Uma análise da Tabela 2 permite observar que os três grupos de indivíduos submetidos à angiografia não apresentaram diferenças significativas com relação aos parâmetros dos perfis lipídico (colesterol total, HDLc, LDLc e TG) e apolipoprotéico. Os valores das médias destes parâmetros situam-se praticamente na faixa de valores desejáveis e limítrofes para lípidos, e na faixa de referência para apolipoproteínas A-I e B, demonstrando que a maioria dos indivíduos selecionados não apresentou alterações significativas nos perfis lipídico convencional e apolipoprotéico, em virtude do próprio desenho do estudo, que excluiu indivíduos em uso de drogas hipolipemiantes e com níveis de TG superiores a 400mg/dL. Os dados apresentados na Tabela 2 permitem inferir que os pacientes dos grupos ateromatose leve/moderada e ateromatose grave apresentaram estenose coronariana, independente do grau de obstrução, mesmo apresentando níveis lipídicos e apolipoprotéicos normais ou moderadamente elevados, demonstrando que, apesar da conhecida contribuição das dislipidemias para o desenvolvimento de DAC, outros fatores também são responsáveis pela progressão da aterosclerose. Segundo Russel¹⁷, apesar da hipercolesterolemia ser importante em aproximadamente 50% dos pacientes com DAC, outros fatores devem ser levados em consideração.

Torna-se importante observar que os parâmetros apo B e índice apoB/apoA-I apresentam-se significativamente elevados nos três grupos de indivíduos submetidos à angiografia quando comparados com o grupo controle, constituído por indivíduos hígidos. Já o parâmetro apo A-I apresentou-se significativamente mais baixo nos três grupos de pacientes quando comparados com o grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros LDLc e HDLc entre os quatro grupos estudados. Estes dados indicam que os parâmetros apolipoproteínas A-I e B e índice apoB/apoA-I mostraram-se mais importantes do que LDLc e HDLc na diferenciação de indivíduos com DAC de indivíduos hígidos, apesar de não terem apresentado contribuição adicional a respeito da gravidade da DAC nos indivíduos estudados. Alguns estudos prospectivos recentes destacam importantes evidências para a associação entre as apolipoproteínas A-I e B e a DAC. O Quebec Cardiovascular Study⁸ avaliou 2155 homens canadenses e foi o primeiro estudo prospectivo a demonstrar que a apo B foi superior aos índices lipídicos convencionais na predição de risco cardiovascular. Na avaliação de cerca de 170.000 indivíduos suecos, o estudo

AMORIS²⁵ demonstrou que a apo B se apresentou como melhor marcador de risco cardiovascular do que o LDLc, especialmente em indivíduos com níveis desejáveis de LDLc, independente do sexo. O índice apoB/apoA-I foi identificado neste estudo como a variável isolada mais fortemente associada com o aumento do risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) fatal, principalmente quando os níveis lipídicos estavam na faixa de valores desejáveis.

Walldius & Jungner (2004)²⁴ sugeriram pontos de corte para o índice apoB/apoA-I de 0,9 e 0,8 para homens e mulheres, respectivamente, demonstrando que valores superiores a estes representariam risco aumentado para doenças cardiovasculares. Estes valores têm sido confirmados por outras pesquisas^{21,27} e os resultados dos estudos AMORIS²⁶ e INTERHEART²⁹ estabeleceram faixas de risco para IAM, apresentados na Figura 1. O presente estudo demonstrou valores inferiores à este ponto de corte para os grupos angiograficamente normal, ateromatose leve/moderada e ateromatose grave, porém significativamente mais elevados em relação ao grupo controle.

Enquanto alguns estudos demonstraram a utilidade de níveis elevados de apo B como preditores de risco cardíaco^{13,28}, outros atribuíram este risco à diminuição dos níveis de apo A-I. Entretanto, prevalece um consenso na literatura de que o balanço entre as partículas aterogênicas e anti-aterogênicas, refletido pelo índice apoB/apoA-I, representa um parâmetro adicional e importante para predição do risco cardiovascular, sendo atualmente considerado por alguns autores superior aos lipídeos, lipoproteínas e índices lipídicos convencionais^{7,24}. O presente estudo demonstrou uma ausência de associação entre o índice apoB/apoA-I e a gravidade da DAC estabelecida por angiografia. Com relação a estudos angiográficos, a literatura sugere a associação entre o índice apoB/apoA-I e estenose coronariana com obstrução superior a 50%^{5,6}. No entanto, não foram encontrados estudos angiográficos envolvendo a associação de estenose coronariana com obstrução superior a 70% e o índice apoB/apoA-I. Considerando este fato, estudos adicionais, envolvendo grande número de indivíduos são essenciais para esclarecer, com fidedignidade, a relação entre o índice apoB/apoA-I e diferentes graus de ateromatose coronariana.

Ao nosso ver, apesar do número limitado de amostras analisadas, os resultados deste estudo realçam a importância da determinação rotineira de parâmetros lipídicos não convencionais, tais como as apolipoproteínas A-I e B, como ferramenta essencial na avaliação de risco para DAC. A assertiva acima fundamenta-se não apenas em dados da literatura, como também em resultados criteriosamente obtidos em nosso meio, refletindo as características próprias da nossa população. Os dados mostrados na tabela 2, indicam que o perfil lipídico convencional (CT e frações) pode não traduzir o risco coronariano, já que os resultados obtidos para os três grupos de pacientes e para os controles, não diferiram significativamente. Por outro lado, os resultados obtidos para apo A-I e para apo B, bem como para o índice apoB/apoA-I foram significativamente diferentes do grupo controle. Estes achados fortalecem a idéia de que o perfil lipídico convencional, em muitos casos, pode não oferecer subsídio à real estimativa do risco coronariano. Portanto, quando este perfil se apresenta normal, não necessariamente exime o paciente de risco devido às dislipidemias. Desta forma, a introdução de testes laboratoriais relativos ao perfil lipídico não convencional, seria extremamente desejável em busca de uma real estimativa do risco coronariano, em adição a todos os outros fatores de risco tradicionalmente investigados.

CONCLUSÃO

O índice apoB/apoA-I apresentou uma elevação significativa em pacientes com DAC quando comparados com indivíduos hígidos. No entanto, este parâmetro não se associou com a gravidade da doença e não se mostrou significativamente elevado nos indivíduos angiograficamente normais. A presença de outros fatores de risco neste grupo, tais como maior número de indivíduos sedentários e hipertensos, poderia justificar, em parte, os resultados obtidos, apesar da ausência de estenose detectável pelo exame angiográfico.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, à Capes, ao CNPq e ao LABORATEL Laboratório de Análises Clínicas pelo apoio recebido.

REFERÊNCIAS

1. Bolibar I, Von Eckardstein A, Assmann G et al. Short-term prognostic value of lipid measurements in patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Thromb Haemost*, v. 84, p. 955-960, 2000.
2. Chan DC, Watts GF. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk. *QJM*, v.99, p. 277-87, 2006.
3. Durrington PN. Can measurement of apolipoprotein B replace the lipid profile in the follow-up of patients with lipoprotein disorders? *Clin Chem*, v. 48, p. 401-2, 2002.
4. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, v. 18, p. 499-502, 1972.
5. Garfagnini A, Devoto G, Rosselli P, et al. Relationship between HDL C and apolipoprotein A-I and the severity of coronary artery disease. *Eur Heart J*, v. 16, p. 465-470, 1995.
6. Horimoto M, Hasegawa A, Ozaki T, et al. Independent predictors of the severity of angiographic coronary atherosclerosis: the lack of association between impaired glucose tolerance and stenosis severity. *Atherosclerosis*, v. 182, p. 113-119, 2005.
7. Kim HK, Chang SA, Choi EK, et al. Association between plasma lipids, and apolipoproteins and coronary artery disease: a cross-sectional study in a low-risk Korean population. *Int J Cardiol*, v. 101, p. 435-440, 2005.
8. Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ et al. Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation*, v. 94, p. 273-278, 1996.
9. Luc G, Bard JM, Ferrières J, et al. Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease. The PRIME Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 22, p. 1155-1161, 2002.
10. Marcovina SM, Alberts JJ, Henderson LO et al. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. III Comparability of apolipoprotein A-I values by use of international reference material. *Clin Chem*, v. 39, p. 773-781, 1993.
11. Marcovina SM, Alberts JJ, Kennedy H et al. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. IV Comparability of apolipoprotein B values by use of international reference material. *Clin Chem*, v. 40, p. 586-592, 1994.
12. Marcovina S, Packard J. Measurement and meaning of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B plasma levels. *J Intern Med*, v. 259, p. 437-446, 2006.
13. Meisinger C, Loewel H, Mraz W et al. Prognostic value of apolipoprotein B and A-I in the prediction of myocardial infarction in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Eur Heart J*, v. 26, p. 271-278.
14. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 17, p. 3542-3556, 1997.
15. Rifai N, Bachorik PS, Alberts JJ. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER (Ed.). *Tietz - textbook of clinical chemistry*. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 809-61.

16. Roeters Van Lennep JE, Westerveld T, Roeters Van Lennep HWO et al. Apolipoprotein concentrations during treatment and recurrent coronary artery disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 2408-2413, 2000.
17. Russel R. Mechanisms of disease: atherosclerosis an inflammatory disease. *N Eng J Med*, v. 340, p. 115-126, 1999.
18. Sniderman AD, Jungner I, Holme I, et al. Errors that result from the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. *J Intern Med*, v. 259, p. 455-461, 2006.
19. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*, v. 77, p. 1-48, 2001. Suplemento III.
20. Talmud PJ, Hawe E, Miller GJ et al. Non-fasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 22, p. 1918-1923, 2002.
21. Thompson A, Danesh J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary artery disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. *J Intern Med*, v. 259, p. 481-492, 2006.
22. Walldius G, Jungner I, Aastveit AH et al. The apoB/apoA-I ratio is better than cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin Chem Lab Med*, v. 42, p. 1355-1363, 2004.
23. Walldius G, Jungner I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *J Intern Med*, v. 255, p. 188-205, 2004.
24. Walldius G, Jungner I. Apolipoproteins are new and better risk indicators of myocardial infarction. *Lakartidningen*, v. 101, p. 1188-1194, 2004.
25. Walldius G, Jungner I, Holme I et al. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS Study): a prospective study. *Lancet*, v. 358, p. 2026-2033, 2001.
26. Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. *J Intern Med*, v. 259, p. 493-519, 2006.
27. Wallenföldt K, Bokemark L, Wikstrand J et al. Apolipoprotein B/Apolipoprotein A-I relation to the metabolic syndrome and change in carotid artery intima-media thickness during 3 years in middle-aged men. *Stroke*, v. 35, p. 2248-52, 2004.
28. Westerveld HT, Roeters Van Lennep JE, Roeters Van Lennep HWO et al. Apolipoprotein B and coronary artery disease in women. A cross-sectional study in women undergoing their first coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 18, p. 1101-1107, 1998.
29. Yusuf S, Hawken S, Öunpuu S et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, v. 364, p. 937-952, 2004.
30. Zambon A, Brown BG, Deeb SS et al. Genetics of apolipoprotein B and apolipoprotein AI and premature coronary artery disease. *J Intern Med*, v. 259, p. 473-480, 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Dra. Marinez de Oliveira Sousa
 Faculdade de Farmácia
 Universidade Federal de Minas Gerais.
 Av. Antônio Carlos, 6627
 CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais
 Tel. /Fax: 55.31.3499-6885
 E-mail: marinez@farmacia.ufmg.br

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
 35^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
 8^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro a 02 de outubro 2008
 Fortaleza - CE - Brasil



*Sociedade
 Brasileira de
 Análises
 Clínicas*

A SBAC facilita para você ir ao maior congresso mundial de Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário
 Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.
 Corra e aproveite!

Maiores informações:
 21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

Associações entre diferentes fatores de risco para doenças cardiovasculares e hipertensão arterial de pacientes com dislipidemia pertencentes a uma comunidade universitária*

Associations between different risk factors to arterial cardiovascular diseases and arterial hypertension of patients with dyslipidemics pertaining to a university community

Rodrigo Schütz; Geny A. Cantos; Cláudia Cavalett; Cláudia S. M. Silva;
Elizabeth M. Hermes & Maria da Graça Balén

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo discutir a relação entre a hipertensão arterial sistêmica e alguns fatores de risco para doença arterial coronariana, em indivíduos com dislipidemia, pertencentes a uma comunidade universitária. Foram obtidos dados clínicos e laboratoriais de 140 pacientes durante o período de março de 1997 a dezembro de 2004. A população analisada constituiu-se de 76 mulheres e 64 homens, com idade entre 27 a 81 anos. Calculou-se o percentual de ocorrência dos fatores de risco e estes foram associados à hipertensão. A prevalência avaliada foi de 11,25% para o *diabetes mellitus*, 25,8% de tabagismo e 39,28% de hipertensão, sendo que para estes últimos 12,57% tinham hipertensão leve, 19,65% estágio moderado e 7,06% estágio grave. Conclui-se que a hipertensão é o fator de risco mais prevalente na população em estudo, sendo importante uma abordagem interdisciplinar e multiprofissional, a fim de maximizar o controle da hipertensão e as medidas de prevenção para doenças cardiovasculares.

PALAVRAS-CHAVE - HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA, DISLIPIDEMIA, FATORES DE RISCO.

SUMMARY - This work had for objective to (discuss) the relation between the systemic arterial Hypertension and some risk factors for arterial coronary illness, in individuals, who pertain to a university community, that presented dyslipidemics. Clinical and laboratorie data have been obtained from 140 patients from March of 1997 to December of 2004. The population that has been analyzed consists of 76 (54,3%) women and 64 (45,7%) men, with age between 27 and 81 years. The percentage of FR occurrence has been calculated and associated with the HAS. The evaluated prevalence was 11,25% for diabetic, 25.8% for tabagism and 39.28% for HAS, considering that, for the latter, 12.57% of that percentage is related to the people with light hypertension, 19.65% is related to the people with a hypertension moderate stage, and 7.06% is related to the people with a hypertension grave stage. It is concluded that the HAS is the FR more prevalent in the population that has been studied; thus, it is important to consider the interdisciplinary and multiprofessional factor in order to maximize the HAS's control and the means of cardiovascular diseases' prevention.

KEYWORDS - SYSTEMIC ARTERIAL HYPERTENSION, DYSLIPIDEMICS, RISK FACTORS

INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC), segundo diversos estudos epidemiológicos, é a principal causa de morte no ocidente. A dislipidemia é um distúrbio do metabolismo que cursa com a alteração de uma ou mais frações dos lípidos séricos, quando, então, alcançam níveis associados com um aumento de risco cardiovascular (PERSON, 1996; GUIMARÃES, 2002; MATOS, 2004). Outros estudos têm mostrado que o controle de fatores de riscos, como; dislipidemia, idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes mellitus* (DM) e tabagismo estão diretamente ligados à redução dessa doença (PIRES, 2004).

A HAS é uma patologia de caráter multigênico e multifatorial, de alta prevalência, com repercussões importantes de morbimortalidade cardiovascular, caracterizada por elevação crônica de pressões sistólicas e diastólicas, sendo responsável por 65% das mortes por AVC (acidente vascular cerebral). Segundo o III CBHA (Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial), o hipertenso é todo indivíduo adulto, maior de 18 anos, com valores de pressão arterial sistólica igual ou maior do que 130mmHg e pressão arterial diastólica superior a 85mmHg, os valores intermediários são considerados limítrofes (III CBHA, 2004; MICHELON, 1999). A melhor forma de atuar efetivamente na queda da morbidade e mortalidade da DAC é trabalhar de acordo com os preceitos da Cardiologia Preventiva. Assim, este trabalho

teve como objetivo associar alguns fatores de risco (FR) para doenças cardiovasculares com a HAS, em indivíduos com dislipidemia, levando em conta um programa interdisciplinar e multiprofissional oferecido a estes pacientes.

METODOLOGIA

Participaram desta pesquisa 140 indivíduos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Assistência a Dislipidemia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (NIPEAD-HU-UFSC), no período de março de 1997 a dezembro de 2004.

Todos os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos a que seriam submetidos, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido.

A obtenção dos dados foi realizada a partir dos exames clínicos realizados no setor de cardiologia, onde se investigou a presença de alguns FR para DAC, tais como: tabagismo, dislipidemia e diabetes, os quais foram associados a HAS. Para dislipidemia foram dosados os níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), utilizando método enzimático-colorimétrico automatizado, sendo considerados elevados a partir de 200mg/dL; a fração LDL-Colesterol (LDL-C) foi obtida por cálculo, utilizando a fórmula de Friedewald, executando-se os valores de triglicerídeos acima de 400mg/dL, sendo esta considerada elevada a partir de 130 mg/dL; a fração HDL-Colesterol (HDL-C) foi obtida pelo

Recebido em 18/04/2007

Aprovado em 14/02/2008

*Núcleo de Pesquisa, Ensino e Assistência a Dislipidemia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (NIPEAD-HU-UFSC), onde se realizou o trabalho

¹Farmacêutico-Bioquímico, ²Prof.(a) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ³Aluna de mestrado do curso de Farmácia-UFSC, ⁴Cardiologista do Hospital Universitário (HU)-UFSC, ⁵Bioquímica do Hospital Universitário (HU)-UFSC, ⁶Nutricionista do Hospital Universitário (HU) - UFSC

método de precipitação seletiva acoplada à dosagem por método enzimático colorimétrico automatizado, sendo considerada baixa quando foi menor que 40mg/dL. Também foi dosada à glicemia de jejum pelo método da glicose oxidase, enzimático (SOUZA, 2005).

O tabagismo foi definido pelo ato de fumar, independente da quantidade de cigarros por dia e do tempo de duração do hábito.

Pelo Terceiro Consenso Brasileiro de Hipertensão de 1998, obteve-se a definição da HAS e os padrões de referência.

RESULTADOS

Os resultados desse estudo mostraram que a HAS foi o principal e mais freqüente fator de risco para DAC, ou seja, 39,28% desses pacientes apresentaram tal patologia (Tabela 1). De fato, fortes evidências relacionam HAS com maior probabilidade de ocorrência de doença isquêmica do coração e acidente vascular cerebral (SCHAAN, 2004; GOLDSTEIN, 1992).

Por outro lado, a HAS eleva-se com a idade, tanto no sexo masculino quanto no feminino, sendo que, até 50 anos, os homens mostram taxas mais elevadas que nas mulheres. Após essa idade, a prevalência inverte-se (THERRIEN, 1992). Por exemplo, com aumento da idade, há também maiores chances de desenvolvimento para DAC e evolução para um quadro de angina ou de infarto (KANNEL, 1993). Nesta pesquisa a população em estudo era adulta. A faixa etária dos indivíduos que participaram desta pesquisa foi de 29 a 81 anos (idade média 60 anos) e, portanto, com maior propensão a desenvolver a HAS.

A interação entre idade e sexo gera diferenças nas taxas de prevalência que, vistas globalmente, parecem ser semelhantes (ZÉTOLA, 2001). Os indivíduos que participaram desta pesquisa constituíam-se de 64 (54,3%) homens e 76 (45,7%) mulheres (Tabela 1). As mulheres apresentaram maior ocorrência de HAS, sobretudo, para o estágio 1 e 2, provavelmente devido à instalação do climatério (SPOSITO, 2004).

TABELA I
Parâmetros bioquímicos para os grupos estudados

| Características Parâmetros considerados | Sexo Feminino | | Sexo Masculino | | Total (n=140) |
|---|---------------|-------|----------------|------|------------------|
| | (n=76) | % | (n=64) | % | |
| Hipertensão estágio 1 | 6 | 7,89 | 3 | 4,68 | 9 |
| Hipertensão estágio 2 | 9 | 11,84 | 5 | 7,81 | 14 |
| Hipertensão estágio 3 | 3 | 3,94 | 2 | 3,12 | 5 |
| Diabetes mellitus | 5 | 6,57 | 3 | 4,68 | 8 |
| Tabagistas | 9 | 11,84 | 9 | 14 | 18 |

Independente do uso de tratamento específico

A HAS é um importante contribuinte para a morbidade e mortalidade cardiovasculares (CANTOS et al., 2004). Sua prevalência na população brasileira adulta é elevada. Estima-se que 15% a 20% dessas pessoas sejam hipertensas (MATOS, 2004; FUCHS, 2006). Neste trabalho, verificou-se que 12,57% da população estudada tinham hipertensão leve, 19,65% estágio moderado e 7,06% estágio grave.

O tabagismo aumenta o risco para DAC (SILVA, 1998). Indivíduos que fumam mais de uma carteira de cigarros ao dia têm risco 5 vezes maior de morte súbita do que indivíduos não fumantes. Adicionalmente, o tabagismo colabora para o efeito adverso da terapêutica de redução dos lípides séricos e induz resistência ao efeito de drogas anti-hipertensivas e à insulina (SOCESP, 1997). Porém, estima-se que o tabagismo dobra o risco cardiovascular resultante do aumento da pressão arterial, especialmente a sistólica. Entre-

tanto, a cessação do uso do fumo parece reduzir rapidamente o risco cardiovascular a ele associado. Neste trabalho, o tabagismo foi um fator preponderante nesta análise atingindo 25,8% dos pacientes. Este é um fator de risco que chama a atenção, pois depende diretamente do comportamento do indivíduo e, portanto a atuação de uma equipe multiprofissional é fundamental.

O DM, por sua vez, é uma das principais síndromes de evolução crônica que acomete a população nos dias atuais e a sua prevalência vem crescendo significativamente com o processo de industrialização dos últimos anos (CANTOS et al., 2004). O aumento de DAC em diabéticos está bem estabelecido, tanto nos DM do tipo 1 quanto no tipo 2, e tem sido demonstrado que ocorrem alterações significativas nos níveis séricos das frações lipídicas, dos triglicerídeos e do colesterol total (CT), mesmo em diabéticos que controlam seus níveis de glicemia (SOUZA, 2003; PICCINI, 2004). O DM, seja ele do tipo um ou dois, foi um fator presente em 11,25 % dos pacientes que participaram deste estudo, sobretudo naqueles que possuíam alto risco para DAC. Este grupo tem recebido monitoramento e atenção especial pela equipe do NIPEAD.

DISCUSSÃO

As dislipidemias juntamente com a HAS, o DM e o hábito de fumar são causas fundamentais de DAC. Embora muitos FR tenham atividade aterogênica autônoma, a associação de um ou mais fatores tem um efeito nefasto sobre o aparelho cardiovascular. Não há uma causa única para as doenças cardiovasculares mas, sabe-se que existem fatores que aumentam a probabilidade de sua ocorrência (RIBEIRO, 1996; RIERA, 2000; III DIRETRIZES BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS, 2001). Sob esta ótica, é importante a identificação desses fatores em um grupo-alvo para a tomada de ações preventivas em nível individual e populacional. Assim, dado a importância do tema, desde os anos 1997, uma equipe interdisciplinar e multiprofissional tem atuado na prevenção da doença aterosclerótica, surgindo o NIPEAD-HU-UFSC. Inicialmente, realizava-se uma triagem dos indivíduos que procuravam o Serviço de cardiologia do SASC (Serviço de Atendimento à Comunidade Universitária). Posteriormente, definia-se o perfil lipídico dos mesmos, convidando-os a participar do referido Núcleo. De 1997 até o ano 2004, 140 pacientes tiveram suas fichas cadastradas, sendo realizada uma classificação dos FR com objetivo de atuar de forma mais direcionada na prevenção dessa doença.

Em pacientes com dislipidemia, a HAS mostrou-se como principal FR para DAC, sendo importante uma abordagem interdisciplinar e multiprofissional a fim de que haja mudanças positivas no estilo de vida dessas pessoas. Sendo assim, a alta prevalência de hipertensão e seu poderoso impacto sobre a incidência de doença cardiovascular são indicadores de alta prioridade para a sua detecção e o seu tratamento, por parte dos médicos e das autoridades oficiais de saúde.

REFERÊNCIAS

- III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Rev. Brás. Clin. Terap. 24(6)231-272, 1998.
- III DIRETRIZES BRASILEIRAS SOBRE DISLIPIDEMIAS E DIRETRIZ DE PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq. Brás. Cardiol. 77 (Supl 3): 1-48, 2001.

CANTOS, G.A.; PEROZIN, A.; WALTRICK, C.A.; SILVA, C.M.; HERMES, E.M.; DUTRA, R.L.; SILVA, M.F. Prevalência de fatores de risco de doença arterial coronariana em funcionários de hospital universitário e a sua correlação com estresse psicológico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro. 40 (4): 240-47, 2004.

FUCHS, S.C. Fatores de risco para hipertensão arterial. In: Brandão AA, Amodeo C, Nobre F, Fuchs FD. *Hipertensão*. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 27-34, 2006.

GUIMARÃES, A.C. Prevenção das doenças cardiovasculares no século 21. *Hipertensão*. 5 (3), 2002.

GOLDSTEIN, M.R. Cholesterol inhibition, cancer and coronary heart disease. *Rev. Lancet*. 340:127-28, 1992.

KANNEL, W.B. Hypertension as a risk factor for cardiac events. Epidemiologic results of long-term studies. *J. Cardiovas. Pharmacol*. 21: 27-37, 1993.

MATOS, M.F.D.; SILVA, N.A.S.; PIMENTA, A.J.M. Prevalência dos fatores de risco para doença cardiovascular em funcionários do Centro de Pesquisas da Petrobrás. *Arq. Brás. Cardiol*. 82(1): 1-4, 2004.

MICHELON, E.; MORIGUCHI, E. Dislipidemias. *Rev. Bras. Med*. 56: 117-29, 1999.

PERSON, T.A.; SOUZA, J.M.P. Efeito dose-resposta de fatores de risco para a doença isquêmica do coração. *Rev. Saúde Pública*. 30(5): 471-78, 1996.

PICCINI, R.X.; VICTORA, C.G. Hipertensão arterial sistêmica em área urbana no sul do Brasil: prevalência e fatores de risco. *Rev. Saúde Pública*. 28 (4): 261-67, 2004.

PIRES S.I.; GAGLIARDI, R.J.; GORZONI, M.L. Estudo das frequências dos principais fatores de risco para acidente vascular cerebral isquêmico em idosos. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 62 (3): 844-51, 2004.

RIBEIRO, A.B. Atualização em hipertensão arterial. São Paulo: Atheneu, 1996.

RIERA, A.R.P. *Hipertensão Arterial*. São Paulo: Atheneu, 2000.

SCHAAN, B.D.; HARZHEIM E.; GUS, I. Perfil de risco cardíaco no diabetes melittus e na glicemia de jejum alterada. *Rev. Saúde Pública*. 38 (4): 529-36, 2004.

SILVA, M.A.D.; SOUSA, A.G.M.R.; SCHARDGOSKY, H. Fatores de risco para infarcto do miocárdio no Brasil: estudo Fricas. *Arq. Brás. Cardiol*. 71 (5): 667-75, 1998.

SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO (SOCESP). *Cardiologia*, vol. 2. São Paulo: Atheneu, 1997.

SOUZA, C.F.M. Exames laboratoriais mais comuns. In: Xavier RM, Albuquerque GC, Barros E. *Laboratório na prática clínica*. Porto Alegre: Artmed. p. 601-02, 2005.

SOUZA, L.J.; CHALITA, F.E.B.; REIS, A.F.F. Prevalência de diabetes mellitus e fatores de risco em campos dos Goytacazes, RJ. *Arq. Brás. Endocrinol. Metab*. 47 (1): 69-74, 2003.

SPOSITO, A.C.; FILHO, B.; AUGUSTO, J. Hipercolesterolemia e seu potencial papel no aparecimento e exacerbação da hipertensão. *The British Journal of Cardiology*. 11 (4): 292-98, 2004.

THERRIEN, J.M.; LAVIE, C.J. Smoking and ischemic heart disease. *Postgrad. Med*. 91: 74-76, 1992.

ZÉTOLA, V.H.; FLUMIGNAM, N.E.M.; CAMARGO, C.H.F. Acidente vascular cerebral em pacientes jovens: análise de 164 casos. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 59 (3): 740-45, 2001.

Ω

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Análises Clínicas
Cep. 88040-900 Florianópolis - SC

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
35^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro a 02 de outubro 2008
Fortaleza - CE - Brasil



*Sociedade
Brasileira de
Análises
Clínicas*

A SBAC facilita para você ir ao maior congresso mundial de Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário
Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.
Corra e aproveite!

Maiores informações:
21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular

Assays for measurement of oxidized low density lipoprotein and its application as a marker of cardiovascular risk

Michele Duarte¹, Rafael Noal Moresco¹ & Andreza Fabro de Bem¹

RESUMO - Diversos estudos têm evidenciado que as doenças inflamatórias estão fortemente ligadas à condição de estresse oxidativo. Dentre elas, uma das mais estudadas é a aterosclerose. A aterosclerose é uma doença de grande importância mundial, devido à alta mortalidade resultante de condições clínicas decorrentes da doença, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral. As lipoproteínas oxidadas, especialmente a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), estão presentes no plasma de pacientes com aterosclerose. Estudos demonstram que a modificação da LDL é um fator importante no desenvolvimento da doença. Por isso, a determinação da LDL-ox plasmática é essencial, não apenas para investigar sua relevância para as doenças cardiovasculares, mas, também, como um auxiliar no diagnóstico destas doenças. Estudos sobre a susceptibilidade da LDL à oxidação, dosagens bioquímicas de produtos da oxidação da LDL, ensaios imunológicos para a pesquisa da LDL-ox e de anticorpos anti LDL-ox têm sido utilizados como marcadores de risco para desenvolvimento de aterosclerose e, conseqüentemente, de eventos cardíacos e vasculares graves.

PALAVRAS-CHAVE - Aterosclerose, lipoproteína de baixa densidade, métodos.

SUMMARY - *Inflammatory disorders are strongly associated with the condition of oxidative stress, and atherosclerosis is one of the most studied condition. Atherosclerosis is a disease of great world-wide importance due to the high mortality of decurrently clinical conditions of the illness, as acute myocardial infarction and stroke. The oxidized lipoproteins, especially the oxidized low density lipoprotein (LDL-ox), are present in the plasma of patients with atherosclerosis. Studies have demonstrated that the modification of the LDL is an important factor in the development of the illness. Therefore, the determination of the plasma LDL-ox is essential not only to investigate its relevance for the atherosclerotic diseases, but also to contribute in the diagnosis of these illnesses. Studies of the susceptibility of the LDL to oxidation, measurements of LDL oxidation products, immunological assays to research LDL-ox and antibodies against LDL-ox have been carried through as markers of risk for development of atherosclerosis, and consequently, of serious cardiac and vascular events.*

KEYWORDS - *Atherosclerosis, low density lipoprotein, methods.*

INTRODUÇÃO

Pequenas quantidades de radicais livres de oxigênio são constantemente formadas em resposta a estímulos externos e internos nos organismos aeróbicos.^[1-3] Uma produção elevada de radicais livres pode levar a um desequilíbrio, principalmente, quando o sistema antioxidante natural não é eficiente em eliminar este excesso de produção, podendo ocorrer, então, o chamado estresse oxidativo. A associação entre o excesso de espécies reativas de oxigênio e doenças inflamatórias, doenças autoimunes, aterosclerose e doenças neurológicas degenerativas, como, por exemplo, Esquizofrenia^[4,5], Síndrome de Down^[6], Mal de Alzheimer^[7] e Doença de Parkinson^[8,9]. É bem reconhecida, atualmente, sendo o mecanismo de injúria celular o mais aceito para explicar esta correlação.

A aterosclerose é uma das doenças mais estudadas atualmente e tem sua patogênese altamente ligada à condição de estresse oxidativo. É uma doença multifatorial e progressiva que afeta a parede dos vasos sanguíneos e que pode levar a complicações importantes, sendo as mais conhecidas o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral, enfermidades agudas, além da doença vascular periférica, de natureza crônica.^[10,11]

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade nos países ocidentais^[12-14], do mesmo modo, no Brasil, são responsáveis por 25% dos óbitos, vitimando 250.000 pessoas por ano^[15]. Números dos Estados Unidos da América demonstram que a aterosclerose é o principal fator de risco para acidente vascular cerebral e, esta, é a terceira maior causa de morte no país.^[12-14]

Por ser uma doença de grande importância e prevalência mundial, a aterosclerose tem sido exaustivamente investigada ao longo dos anos. A teoria mais aceita para explicar sua

patogênese é a hipótese oxidativa. Existem grandes evidências do importante papel da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) na etiologia da aterosclerose^[16-18]. A teoria oxidativa diz que os lipídeos circulantes, principalmente a LDL, podem penetrar no endotélio das artérias e, ao entrar, sofrem modificações oxidativas por produtos metabólicos, radicais livres de oxigênio e enzimas produzidos pelas células vasculares (macrófagos, células endoteliais e musculares lisas)^[19], processo este catalisado pela presença de metais de transição, como ferro e cobre.^[20-21]

A modificação oxidativa da LDL acontece na íntima do vaso e parece ocorrer em duas fases. Na primeira fase, ou fase inflamatória, os lipídeos da LDL sofrem oxidação, sem que ocorram grandes modificações na apolipoproteína B, o que resulta na formação da LDL minimamente oxidada (LDL-ox min)^[22]. Nesta fase, a LDL-ox min contribui para o estado inflamatório da parede vascular, pois pode recrutar monócitos circulantes através do aumento da expressão de glicoproteínas de adesão da superfície das células. Os monócitos, então, se aderem à superfície da parede vascular e outras moléculas específicas (proteína quimiotática específica, proteína-1 quimiotática monocitária), podem atraí-los para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos^[23]. Na camada íntima do vaso, as partículas de LDL minimamente oxidada podem sofrer intensiva oxidação por espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas produzidas pelos macrófagos, como a mieloperoxidase e a lipoxigenase, transformando-as em LDL altamente oxidada (LDL-ox), caracterizando, assim, a segunda fase da modificação oxidativa da LDL^[24] (Figura 1). Nesta fase, surgem produtos de decomposição lipídica, os quais podem reagir com resíduos de lisina da apolipoproteína-B, modificando-os, o que torna a LDL mais eletronegativa.^[25,26]

Recebido em 05/04/2007

Aprovado em 03/04/2008

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

As LDL-ox passam a ser reconhecidas pelos receptores do tipo scavenger dos macrófagos, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol [27,28]. Ocorre captação indiscriminada de LDL-ox e acúmulo maciço de colesterol nos macrófagos, formando-se as células espumosas [29,30]. Após essa fase inicial, desenvolvem-se as estrias gordurosas, que se caracterizam pelo acúmulo de células espumosas e lipídeos extracelulares, levando à inflamação e espessamento da parede arterial [31]; além disso, acontece a migração de células musculares da camada média da parede vascular para a íntima, estimulada pelos fatores de crescimento derivados das plaquetas, fator de crescimento derivado do fibroblasto e fator de crescimento b. A estria gordurosa é a lesão inicial da aterosclerose, que pode progredir e, à medida que isso acontece, forma-se uma capa fibrosa que envolve as células espumosas, leucócitos, lipídeos e células musculares lisas no centro da lesão. [32]

Diferentes mediadores inflamatórios são liberados no espaço intimal, perpetuando e ampliando o processo, levando finalmente à formação da placa aterosclerótica. As placas podem ser divididas em estáveis ou instáveis [32]. As mais instáveis, portanto mais propensas à ruptura, possuem alto conteúdo lipídico em seu interior [33-34]. A fissura e o rompimento de placas instáveis pode levar à formação de trombos, responsáveis muitas vezes pelos acidentes vasculares e pelos infartos [35,36], conseqüências mais graves da aterosclerose.

Além de contribuir significativamente para o surgimento das células espumosas, a LDL-ox possui várias outras atividades pró-aterogênicas, dentre elas: formação de intermediários e produtos finais da reação de oxidação que são citotóxicos para células da parede vascular [37-39]; induz e perpetua o estado inflamatório no local de seu acúmulo, por ser quimiotática para monócitos e por aumentar a expressão de genes das células endoteliais que sintetizam substâncias responsáveis por recrutar monócitos [40-43]; favorece a secreção de interleucina-1 pelos monócitos, o que aumenta a proliferação de células musculares lisas na lesão [44].

Somam-se a estes efeitos, o aumento na disfunção endotelial, a indução da agregação plaquetária e a formação de trombos e a desestabilização das placas ateromatosas, por mecanismos que incluem a expressão de metaloproteínas, todos promovidos pela LDL-ox [45].

A reação de lipoperoxidação em cadeia dos lipídeos da LDL tem sido muito utilizada em métodos experimentais que visam avaliar a oxidação da LDL *in vitro*, deste modo inferindo seu estado oxidativo *in vivo*. Valendo-se desta reação facilmente induzida pela presença de metais, é possível quantificar e qualificar a cinética da modificação oxidativa da LDL, bem como dosar os produtos formados no processo de lipoperoxidação, como o malondialdeído (MDA) e outros, os quais podem ser utilizados como marcadores do estado oxidativo da LDL. Deste modo, é possível sugerir o uso do estado oxidativo da LDL como um dado adicional para a avaliação do risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares.

Este trabalho enumera algumas metodologias que avaliam a oxidação de LDL *in vivo* e *in vitro*, bem como discute sua possível utilização clínica e experimental.

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DA LDL

Para avaliar a oxidação da LDL, num primeiro passo, faz-se necessário o isolamento desta lipoproteína. O isolamento é geralmente feito através da ultracentrifugação das amostras, que utiliza o gradiente de densidade das lipoproteínas para separá-las em bandas. [46]

Susceptibilidade da LDL à oxidação:

Medida de dienos conjugados

Este método permite avaliar a oxidação lipídica através do acompanhamento da cinética da reação de formação de dienos conjugados durante a oxidação da LDL, monitorando continuamente a mudança na absorvância da amostra no comprimento de onda de 234 nm. Para iniciar o processo de oxidação é utilizada a incubação da LDL com íons de metais de transição, como o cobre. A oxidação não ocorre instantaneamente, e o tempo decorrido entre a adição dos íons e o início da formação dos dienos é chamado de fase lag e pode ser utilizado como um parâmetro do estado oxidativo inicial da LDL. [47]

A fase lag é medida em minutos e a susceptibilidade da LDL à oxidação pode ser inferida pela duração desta fase, pois quanto mais curta esta fase, maior a susceptibilidade da LDL à oxidação [47], o que se reflete também *in vivo*. [48,49] Outros parâmetros podem ser utilizados a fim de se averiguar a oxidação da LDL por este método, como a medida da absorvância inicial da amostra em 234nm e a razão da oxidação por hora, expressa como a produção de dienos conjugados por minuto por miligrama de proteína de LDL, durante a fase de propagação da reação. Além destes, podem ser também aferidos outros índices, como a quantidade máxima de dienos formada e o tempo necessário para a formação dessa quantidade máxima de dienos. [50] Todos estes parâmetros podem auxiliar na determinação do estado oxidativo da LDL.

Experimentalmente, estes dados são utilizados como parâmetros de comparação em populações estudadas [51,52], mas o tempo requerido para se fazer este teste e a dificuldade de padronização existente torna difícil o emprego deste método na rotina clínica laboratorial. [53]

Modificação da mobilidade eletroforética

Durante a oxidação da LDL, formas mais eletronegativas da lipoproteína surgem devido à reação de grupos amino de resíduos de lisina da apoB com aldeídos, produtos finais da peroxidação de ácidos graxos polinsaturados. [54]

Valendo-se da diferença na mobilidade eletroforética existente entre a LDL e a LDL-ox é possível avaliar a oxidação da LDL através de várias técnicas de eletroforese, com sensibilidade e especificidade diferentes. [53]

A eletroforese fornece um parâmetro qualitativo da oxidação da LDL pois avalia sua modificação durante o processo de oxidação, o que pode ser um aspecto vantajoso do uso deste método, com relação a outros que utilizam parâmetros quantitativos, mais sujeitos a erros. [53]

Além do aumento na mobilidade da LDL, a oxidação também produz fragmentação protéica na lipoproteína, causando bandas mais dispersas [55], outro parâmetro útil para determinar a oxidação da LDL através da eletroforese.

Muitos estudos utilizam diferentes técnicas de eletroforese de LDL para avaliar a oxidação desta lipoproteína em grupos de indivíduos, como, por exemplo, em crianças e adolescentes hipercolesterolêmicos [56] e em diabéticos tipo II [57].

Dosagem de produtos da peroxidação lipídica

Estes marcadores são amplamente usados na determinação do estresse oxidativo através da avaliação da peroxidação lipídica, baseando-se na determinação da concentração dos produtos mais estáveis resultantes desta reação. [58]

Dosagem de hidroperóxidos lipídicos

Dentre os vários produtos de degradação e decomposição resultantes da reação de oxidação da LDL, os primeiros a se for-

marem são os hidroperóxidos lipídicos e sua dosagem, também, pode ser feita para aferir o estado oxidativo da LDL.^[58] O conteúdo ou acúmulo de hidroperóxidos lipídicos em uma amostra pode ser aferido usando técnicas espectrofotométricas, onde o produto da reação dos hidroperóxidos com reagentes, como, por exemplo FOX, desenvolvido por Wolff *et al.*^[59] pode ser dosado. O resultado pode ser expresso em uma razão hidroperóxidos lipídicos/concentração de colesterol na amostra.^[53]

Outra técnica de dosagem de hidroperóxidos lipídicos também usa a espectrofotometria para a leitura dos resultados, porém utiliza a reação dos hidroperóxidos com um sistema enzimático de glutathione peroxidase/glutathione reduzida e NADPH. São feitas duas medidas de absorbância em 340 nm, uma anterior à reação e uma posterior, visando determinar o decréscimo da absorbância, devido à oxidação do NADPH, neste comprimento de onda.^[50,60]

Este método é amplamente utilizado, sozinho ou em conjunto com outros métodos, por ensaios científicos publicados recentemente, com o objetivo de avaliar indiretamente a oxidação da LDL em diversas amostras biológicas.^[50, 58]

Dosagem de malondialdeído (MDA)

O malondialdeído (MDA), composto de três carbonos, é um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados (principalmente ácido aracdônico) e seus ésteres, sendo formado pela cisão destes ácidos graxos, após a peroxidação.^[61]

O MDA é o marcador para determinar peroxidação lipídica mais amplamente utilizado atualmente^[62] e o método para sua dosagem geralmente se baseia na reação clássica do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido, de absorbância máxima no comprimento de onda de 532 nm.^[63]

A técnica espectrofotométrica é a mais empregada para determinar a concentração de MDA em amostras biológicas^[64], mas existem algumas limitações neste método, principalmente a interferência devido a reações entre TBA e outros compostos biológicos. Este problema vem sendo resolvido usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a determinação de MDA, após a reação com TBA, possibilitando uma maior separação do composto formado e tornando o método mais específico.^[65-67]

Este aperfeiçoamento da técnica e outros semelhantes têm sido muito utilizados para determinação dos níveis de MDA em uma grande variedade de amostras biológicas.^[68-74]

A dosagem de MDA é a base para muitos ensaios científicos que visam determinar indiretamente o estado oxidativo da LDL em determinados grupos, como, por exemplo, em pacientes com psoríase^[50], autismo^[62] e, até, em voluntários saudáveis.^[75]

Dosagem de F₂-Isoprostanos

Outros produtos da oxidação também podem ser dosados para determinar oxidação lipídica em amostras biológicas além de MDA e hidroperóxidos lipídicos.

Este é o caso dos F₂-Isoprostanos (produtos da oxidação do ácido aracdônico), que atualmente é considerado como um método específico para determinar a peroxidação lipídica.^[76,77] Os F₂-Isoprostanos podem ser quantificados utilizando extração de fase sólida, CLAE e Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-EM).^[78,79]

Existem, também, ensaios imuno-enzimáticos sendo desenvolvidos, capazes de detectar a presença de F₂-Isoprostanos no plasma e na urina, até mesmo em pequenas concentrações^[80,81], que poderão ser muito úteis clinicamente para auxiliar na avaliação de risco cardiovascular.

Dosagem de outros produtos de peroxidação lipídica

Além dos já citados, outros produtos de oxidação de lipoproteínas também têm sido propostos como marcadores de oxidação da LDL. Como exemplos são os ácidos hidroxiicosatetranóicos (HETEs), derivados da oxidação do ácido aracdônico e os ácidos hidroxiocetadecanóicos (HODEs), resultantes da oxidação do ácido linoléico.^[79] Estes compostos já foram encontrados aderidos à placa aterosclerótica, e cogita-se que sua presença está associada à placas instáveis e sujeitas à ruptura.^[82]

A presença destes compostos pode ser determinada, após a extração da fração lipídica do material a ser analisado, por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).^[82]

Da mesma forma, estão sendo propostos outros marcadores como os hidrocarbonetos voláteis de cadeia curta, etano e pentano, igualmente formados durante a peroxidação lipídica, que são medidos como gases respiratórios utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.^[83-85]

Métodos imunológicos

Uma das propriedades que diferenciam a LDL nativa da LDL-ox é sua capacidade imunogênica. A LDL-ox possui um papel imunogênico no processo da aterosclerose, pois é considerada um autoantígeno formado na lesão aterosclerótica.^[86,87]

A evidência que apóia esta afirmação é o fato de que são encontrados no sangue e nas lesões de pacientes com aterosclerose, além de em animais experimentais, anticorpos IgM e IgG, específicos para LDL-ox.^[86, 88-90]

A partir desta constatação foi possível desenvolver métodos imunológicos para verificar a presença de LDL-ox e quantificá-la. Estes métodos podem avaliar a presença de LDL-ox na amostra, utilizando anticorpos anti-LDL-ox ou, ainda, medir os autoanticorpos, usando a própria lipoproteína oxidada.

Estes métodos vêm sendo muito utilizados em estudos científicos que visam avaliar diretamente a oxidação da LDL *in vivo*, em determinadas populações, como, por exemplo: em gestantes^[91], em pacientes com doença cardiovascular^[92] e em fumantes.^[93]

Determinação de autoanticorpos anti LDL-ox:

Os níveis de autoanticorpos fornecem uma evidência indireta da importância da LDL-ox na doença cardiovascular e podem ser determinados por um procedimento de enzima imunoensaio (EIA).^[94]

Na dosagem de autoanticorpos por ELISA do tipo indireto, a LDL oxidada pelo íon Cu⁺⁺ é fixada nos micropoços da placa, como forma de antígeno, onde os anticorpos, se presentes na amostra, se ligarão especificamente. Após uma etapa de lavagem, um anticorpo IgG anti-humano específico ligado a uma enzima (conjugado) é adicionado para se ligar aos anti LDL-ox ligados à LDL-ox. Depois da remoção do conjugado que não se ligou, por uma nova etapa de lavagem, o substrato cromogênico da enzima é adicionado, sendo então modificado pela enzima ligada ao anticorpo anti-humano, gerando solução colorida. A concentração da imunoglobulina específica anti LDL-ox é quantificada pela mudança de cor na solução, detectável por um leitor de ELISA. A intensidade de cor desenvolvida é diretamente proporcional à concentração de anticorpos anti LDL-ox na amostra.^[50, 95]

Determinação da LDL-ox:

Os níveis de LDL-ox também podem ser mensurados por ensaios de ELISA, do tipo sanduíche, utilizando anticorpos monoclonais para diferentes epítomos da LDL-ox humana. Geralmente, em um mesmo ensaio, são usados mais de um anticorpo aderido à parede da placa. Após a adição da amostra, a LDL-ox existente no soro se liga aos anticorpos

anti LDL-ox da placa. Depois de uma etapa de lavagem, o anticorpo anti LDL-ox acoplado a enzima é adicionado. Após nova lavagem, o substrato cromogênico é adicionado e modificado pela enzima. Como na técnica de ELISA descrita para dosagem de anticorpos anti LDL-ox, a quantidade de LDL-ox presente na amostra é diretamente proporcional à cor desenvolvida na solução. O nível de LDL-ox nas amostras pode ser expressa em unidades/mL.^[92,96,97]

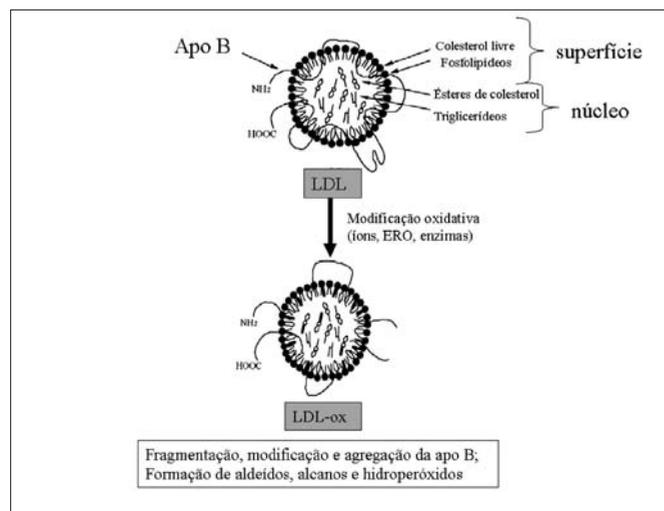


Figura 1. O dano oxidativo afeta os componentes lipídicos e proteicos da LDL. Adaptado de Yamaguchi et al., 2002.

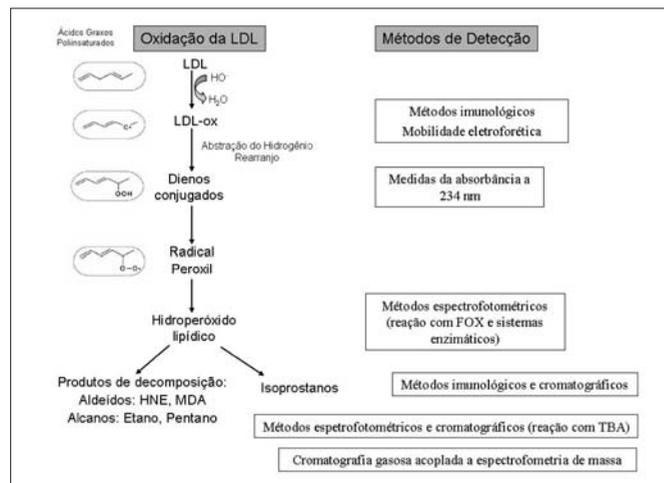


Figura 2. Modificação oxidativa dos componentes lipídicos da LDL e métodos para avaliação do dano oxidativo.

CONCLUSÃO

Na maioria dos estudos em animais experimentais e em humanos, a oxidação da LDL vem sendo avaliada por métodos indiretos, alguns discutidos neste trabalho (determinação de produtos da peroxidação lipídica, avaliação da susceptibilidade da LDL à oxidação, modificação da mobilidade eletroforética) e, até recentemente, o único meio para acessar a oxidação da LDL in vivo tem sido a quantificação de autoanticorpos contra a LDL-ox e a LDL-ox por métodos imunológicos.^[90] (Figura 2).

Em avaliações clínicas, para diagnóstico ou acompanhamento de pacientes de alto risco, os métodos mais utilizados para determinar a oxidação da LDL são os métodos imunológicos, por seu reduzido tempo de execução, fácil adaptação à rotina laboratorial e disponibilidade de kits comerciais.

Já os métodos espectrofotométricos e cromatográficos são mais utilizados em estudos diversos na área de saúde. Geralmente, cada estudo utiliza mais de um método, combinando métodos indiretos entre si ou estes com métodos imunológicos para avaliar o estado oxidativo da LDL, nos mais diversos grupos populacionais.

A eletroforese também é muito utilizada na avaliação das modificações oxidativas na LDL em estudos científicos. Além disso, sugeriu-se que a eletroforese capilar poderia ser um método de triagem clínica em grandes populações.^[53] Os métodos de avaliação da oxidação da LDL abordados neste trabalho e outros aqui não citados podem futuramente ser utilizados de forma mais ampla na triagem e no seguimento de pacientes com doenças cardiovasculares, além de continuarem a contribuir para a elucidação dos mecanismos da aterogênese e da contribuição da LDL-ox para o desenvolvimento da doença.

REFERÊNCIAS

- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-247.
- Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life* 2001; 52:3-6.
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Cur Opin Cell Bio* 2003; 15:247-254.
- Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001; 6:66-73.
- Akyol O, Herken H, Uz E, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidant processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26:995-1005.
- Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7:153-163.
- Cristen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am Journal Clin Nutr* 2000; 71:621S-629S.
- Bostantjopoulou S, Kyriazis G, Katsarou Z, Kiosseoglou G, Kazis A, Mentenopoulos G. Superoxide dismutase activity in early and advanced Parkinson's disease. *Funct Neuro* 1997; 12:63-68.
- Torsdottir G, Kristinsson J, Sveinbjornsdottir S, Snaedal J, Johannesson T. Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85:239-243.
- Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidised lipoproteins in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1996;20: 707-727.
- Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1859-1967.
- Murray C, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349:1436-1442.
- Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX et al. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 478-487.
- Nagai Y, Kitagawa K, Sakaguchi M et al. Significance of earlier carotid atherosclerosis for stroke subtypes. *Stroke* 2001; 32:1780-1785.
- Ministério da Saúde [homepage na internet]. Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares [acessado em 21/04/2005]. Disponível em url: <http://www.portal.saude.gov.br>
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320: 915-924.
- Batlouni M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronariana. *Arq Bras Cardiol* 1997; 68:55-63.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88:1785-1792.
- Ribeiro Jorge PA. Endotélio, lípidos e aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 1997; 68:129-134.
- Morel DM, Di Corletto PE, Chisholm GW. Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis* 1984; 4:357-364.
- Heineck JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of

- lowdensity lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 74: 1890-1894.
22. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488-2496.
 23. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 22 ed. Amsterdam: Elsevier, 2005.
 24. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-
 25. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498-506.
 26. Camejo G, Halberg C, Manschik-Lundin A et al. Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* 1998; 39: 755-766.
 27. Brown MS, Goldstein JL. Scavenging for receptors. *Nature* 1990; 343: 508-509.
 28. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264: 2599-2604.
 29. Autio I, Jaakola O, Solakivi T, Nikkari T. Oxidized low-density lipoprotein is chemotactic for arterial smooth muscle cells in culture. *FEBS Lett* 1990; 277: 247-249.
 30. Leake DS. Effects of mildly oxidised low density lipoprotein on endothelial cell function. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2:301-305.
 31. Tsimikas S, Beyer RW, Patel R et al. Prospective evaluation of the role of oxidized LDL in acute coronary syndromes treated with percutaneous intervention. *Circulation*. 2000; 102: II-13.
 32. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
 33. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993; 69:377-381.
 34. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84:1086-1095.
 35. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326:242-250.
 36. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; 326:310-318.
 37. Coffey MD, Cole RA, Colles SM, Chisolm GM. In vitro cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxy, lipid, and peroxy radicals. *J Clin Invest* 1995; 96:1866-1873.
 38. Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide and iron-mediated reactions. *J Lipid Res* 1993; 34:479-490.
 39. Xavier HT, Parra Abdalla DS, Rocha Martinez TS, Franchini Ramires JA, Toledo Gagliardi AR. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea in vitro de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83:488-492.
 40. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2995-2998.
 41. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344:254-257.
 42. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990; 11: 97-101.
 43. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.
 44. Ku G, Thomas CE, Akeson AL, Jackson RL. Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem* 1992; 267:14183-14188.
 45. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987; 18:27-79.
 46. Himber J, Buhler E, Moll D, Moser UK. Low density lipoprotein oxidation and metabolic studies. Isolation from small volumes of plasma using a tabletop centrifuge. *Int J Vitam Nutr Res* 1995; 65:137-142.
 47. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989; 6:67-75.
 48. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992; 339: 1183-1186.
 49. Liu ML, Ylitalo K, Vakkilainen J et al. Susceptibility of LDL to oxidation in vitro and antioxidant capacity in familial combined hyperlipidemia: comparison of patients with different lipid phenotypes. *Ann Med* 2002; 34:48-54.
 50. Kural BV, Örem A, Cimsit G, Yandi YE, Calapoglu M. Evaluation of the atherogenic tendency of lipids and lipoprotein content and their relationships with oxidant-antioxidant system in patients with psoriasis. *Clin Chim Acta* 2003; 328: 71-82.
 51. Hendrickson A, Mckinstry LA, Lewis JK et al. Ex vivo measures of LDL oxidative susceptibility predict carotid artery disease. *Atherosclerosis* 2005;179: 147-153.
 52. Vasankari T, Ahotupa M, Toikka J et al. Oxidized LDL and thickness of carotid intima-media are associated with coronary atherosclerosis in middle-aged men: lower levels of oxidized LDL with statin therapy. *Atherosclerosis* 2001; 155:403-412.
 53. Carru C, Zinellu A, Galistu F et al. The evaluation of the oxidative state of native-LDL: three methods compared. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 61: 271-281.
 54. Stocks J, Miller NE. Capillary electrophoresis to monitor the oxidative modification of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1998; 39:1305-1309.
 55. Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Res* 1987; 28:1466-1477.
 56. Barros MRAC, Bertolami MC, Abdalla DSP, Ferreira WP. Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. *Atherosclerosis* 2006; 184:103-107.
 57. Gambino R, Uberti B, Alemanno N, Pisu E, Pagano G, Cassader M. In vivo oxidizability of LDL in type 2 diabetic patients in good and poor glycemic control. *Atherosclerosis*, 2004; 173:103-107.
 58. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 200-227.
 59. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzimol* 1994; 233:182-189.
 60. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Determination of plasma lipid hydroperoxides by NADPH/NAD+ coupled enzyme reaction system evaluation of method. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35:893-898.
 61. Suttner J, Cermak J, Dyr E. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Anal Biochem* 1997; 249:20-23.
 62. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen, I. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life Sciences* 2004; 75:2539-2549.
 63. Jain SK. Hiperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem* 1989; 264:21340-21345.
 64. Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 1984; 105:299-305.
 65. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by ADP- FE_2^+ in rat liver microsomes. *Biochem J* 1982; 208:129-140.
 66. Ekstrom T, Garberg P, Egestad B, Hogberg J. Recovery of malondialdehyde in urine as a 1,F-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with High Performance Liquid Chromatography. *Chem Biol Interact* 1988; 66:177-187.
 67. Cordis GA, Maulik N, Bagchi D, Engelman RM, Das DK. Estimation of the extent of lipid-peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of High Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr* 1993; 632: 97-103.
 68. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by High Performance Liquid Chromatography as the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B* 2000; 742:315-325.
 69. Cordis GA, Das DK, Riedel W. High Performance Liquid Chromatography peak identification of 2,4- dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *J Chromatogr A* 1998; 798:117-123.
 70. Volpi N, Tarugi P. Improvement in the High Performance Liquid Chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. *J Chromatogr B* 1998; 713: 433-437.
 71. Hsu CS, Chiu WC, Yeh SL. Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res* 2003; 23:67-75.
 72. O'Reilly JD, Mallet AI, McAnlis GT, Young IS, Halliwell B, Sanders TA, Wiseman H. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of

- effect on F-2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:1040-1044.
73. Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 87-94.
 74. Roig R, Cascon E, Arola L, et al. Effects of chronic wine and alcohol intake on glutathione and malondialdehyde levels in rats. *Nutr Res* 2000; 20:1547-1555.
 75. Browers A, Langlois M, Delanghe J et al. Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis* 2004; 176:189-195.
 76. Meagher EA, Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1745-1750.
 77. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:505-513.
 78. Mori TA, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ. An improved method for the measurement of urinary and plasma F2-isoprostanes using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 268:117-125.
 79. Waddington EI, Croft KD, Sienuarine K, Latham B, Puddey IB. Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates. *Atherosclerosis* 2003; 167:111-120.
 80. Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effect of Alpha-lipoic acid and Alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1114-1121.
 81. Feillet-Coudray C, Tourtauchaux R, Niculescu M et al. Plasma levels of 8-epiPGF2 alpha an in vivo marker of oxidative stress are not affected by aging or Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:463-469.
 82. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Leseche G, Tedgui A, Maclouf J, Murphy RC. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-Isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest* 1999;103:421-427.
 83. Moore K, Roberts L. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun* 1998; 28:659-671.
 84. Aghdassi E, Allard JP. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 880-886.
 85. VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem* 2001; 34:265-270.
 86. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91:281-291.
 87. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1876-1890.
 88. Parums DV, Brown DL, Mitchinson MJ. Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis. *Arch Pathol Lab Med*

- 1990; 114:383-387.
89. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1372-1376.
90. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R et al. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*.1992; 339:883-887.
91. Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EMB, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. LDL size, total antioxidant status and oxidized LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis* 2004; 177:391-399.
92. Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K, Daida H. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004; 174:343-347.
93. Zarin A, Gidlund M, Boschov P, Castilho L, de Faria EC. Antibodies Against Oxidized Low-Density Lipoprotein in Normolipidemic Smokers. *Am J Cardiol* 2002; 90:651-652.
94. Yla-Herttuala S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol* 1998;9: 337-344.
95. Abdalla DSP, Damasceno NRT, Apolinário E, Oliveira JM, Fernandes I. Biomarcador da modificação oxidativa da LDL in vivo. *Rev Bras Análises Clínicas* 2002;3:115-120.
96. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, et al. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res* 1996; 37:3745-3753.
97. Kohno H. Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using antioxidantized phosphatidylcholine monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein-B antibody. *Clin Biochem* 2000; 33: 243-253.
98. Yamaguchi Y, Kunitomo M, Haginaka J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. *J Chromatog. B* 2002; 781:313-330.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

De Bem, AF
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde
 Universidade Federal de Santa Maria
 CEP. 97105900, Santa Maria, RS, Brazil
 Telephone number: 55 55 32208749
 FAX number: 55 55 32208018
 E-mail: debemandreza@yahoo.com.br

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
 35^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
 8^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica



28 de setembro a 02 de outubro 2008
 Fortaleza - CE - Brasil



*Sociedade
 Brasileira de
 Análises
 Clínicas*

SBAC

A SBAC facilita para você ir ao maior congresso mundial de Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário
 Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.
 Corra e aproveite!

Maiores informações:
 21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

Espécies fúngicas responsáveis por onicomicose em Recife, Pernambuco*

Fungal species causing onychomycosis in Recife, Pernambuco

Kedma de Magalhães Lima¹, Rossana Sette de Melo Rêgo², Francisco Montenegro³ & Norma Suely Sobral da Silveira⁴

RESUMO - Onicomicose é a infecção fúngica ungueal causada por leveduras, dermatófitos ou fungos filamentosos não-dermatófitos. O presente trabalho tem como objetivo demonstrar fungos em unhas de pacientes encaminhados a exame micológico em Recife, PE. Foram avaliadas 181 amostras ungueais dos pés e 107 das mãos oriundas de 251 pacientes. O exame direto foi realizado com KOH a 20% e a cultura em Agar Sabourand e Mycosel®. Das amostras estudadas, 167 (58%) foram positivas, 97 (34%) de unhas dos pés e 70 (24%) de unhas das mãos. Leveduras foram isoladas em 86 casos, representando 51% das amostras positivas, principalmente espécies de *Candida*; os fungos filamentosos não dermatófitos foram isolados em 32 (19%) casos, com ênfase para espécies de *Fusarium* e *Scytalidium*; dermatófitos foram identificados em 26 (16%) amostras, com predominância de *Trichophyton rubrum*. Entretanto, não foi possível isolar o agente etiológico em 23 (14%) amostras com exame direto positivo. Os resultados obtidos demonstraram a ampla gama de espécies fúngicas envolvidas em patologias ungueais com destaque para os fungos filamentosos não-dermatófitos que constituíram o segundo grupo mais isolado. O diagnóstico micológico com identificação das espécies envolvidas é essencial para o tratamento mais específico de doenças fúngicas ungueais.

PALAVRAS-CHAVE - Onicomicose, Leveduras, Dermatófitos, Não-dermatófitos.

SUMMARY - Onychomycosis is a fungal infection of the nail caused by dermatophytes, yeasts or non-dermatophytic molds. The present study demonstrates the presence fungal of the nails of patients in Recife, PE. It was studied 181 samples of toenails and 107 of fingernails of 251 patients analyzed. The direct microscopy was carried with KOH 20% and the culture in Agar Sabourand and Mycosel®. Onychomycosis were present in 167 (58%) samples, 97 (34%) toenails and 70 (24%) fingernail. Yeasts had been isolated in 86 cases, represented 51% of the positive samples, mainly species of *Candida*; non-dermatophytic molds had been isolated in 32 (19%) samples, with emphasis for species of *Fusarium* and *Scytalidium*; dermatophytes had been identified in 26 (16%) cases, with predominance of *Trichophyton rubrum*. However, it was not possible to isolate fungi in 23 (14%) samples with direct microscopy positive. The results demonstrated to the ample gamma of involved fungal species in nail pathology with prominence for the non-dermatophytic molds that had constituted as the more isolated group. The correct micologic diagnosis with the identification of the involved species becomes essential in the direction of the search of more specific treatment of fungal disease in nails.

KEYWORDS - Onychomycosis, Dermatophytes, Yeasts, Non-dermatophytic.

INTRODUÇÃO

Onicomicose é uma enfermidade fúngica que acomete as unhas, correspondendo a 20-40% do total das patologias ungueais (MIDGLEY & MOORE, 1998).

Os fungos podem provocar alterações ungueais caracterizadas por hiperqueratose subungueal iniciada pelo bordo livre das unhas na região lateral e/ou distal, descolamento ungueal na proximidade da cutícula, reação inflamatória comprometendo as dobras periungueais (paroníquia) e o aparecimento de leuconíquia, manchas brancas na superfície da unha (MARTINS *et al.*, 2005). Em vista do desenvolvimento do patógeno, as unhas tornam-se friáveis, corroidas, secas, escamosas ou com estrias longitudinais, podendo se processar a separação gradual do limbo do leito ungueal (onicólise) e a ocorrência de onicodistrofia total. Desta forma a onicomicose, segundo seus aspectos clínicos, é classificada em onicomicose subungueal distal e lateral, onicomicose branca superficial, onicomicose subungueal proximal e onicomicose distrófica total (ROBERTS, EVANS & ALLEN, 1990). A coloração da unha geralmente está alterada, podendo tornar-se esbranquiçada, verde-amarelada, acastanhada ou escurida (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Entre os agentes etiológicos da onicomicose destacam-se as leveduras, os dermatófitos e os fungos filamentosos não-dermatófitos (BALESTTÉ, MOUSQUES & GEZUELE, 2003). Os dermatófitos geralmente são considerados os principais

agentes causais, seguidos pelas leveduras (HANEKE, 1991; KENNA & ELEWSKI, 1996; PERCA *et al.*, 2000). Entretanto, a onicomicose causada por fungos filamentosos não-dermatófitos tem se tornado cada vez mais freqüente na prática médica (HATTORI *et al.*, 2005). A ocorrência de infecções ungueais por esse grupo de fungos pode levar a uma dificuldade na decisão do clínico de qual conduta terapêutica deverá ser estabelecida (SIDRIM & ROCHA, 2004).

O tratamento das infecções ungueais por fungos tem gerado muitos gastos ao sistema de saúde. Alguns autores consideram essa infecção a micose superficial de mais difícil tratamento, e mesmo nos casos em que a medicação é adequada ao agente etiológico identificado, nem sempre se obtém cura, sendo freqüente as recidivas (JOISH & ARMS-TRONG, 2002). Contudo, muitas vezes as onicomicoses são tratadas exclusivamente como um problema estético de importância relativamente menor, desconhecendo-se o impacto real que tem esta enfermidade, alterando a qualidade de vida dos pacientes, principalmente em algumas profissões como manipuladores de alimentos, recepcionistas, secretárias e trabalhadores de clubes desportivos (LUBECK, 1998). Neste contexto, torna-se essencial uma insistente busca diagnóstica para detecção correta da etiologia das onicomicoses, visando oferecer tratamento mais específico e adequado para o paciente, principalmente naqueles casos clinicamente evidentes, com exames micológicos constantemente negativos ou com detecção de fungos considerados contaminantes.

Recebido em 25/01/2007

Aprovado em 26/12/2007

*Trabalho desenvolvido no Setor de Micologia da NKB-Diagnósticos, Recife-PE.

¹Mestranda em Medicina tropical, UFPE; ²Supervisora do Setor de Micologia da NKB-Diagnósticos/PE; ³Gestor Técnico da Área de Microbiologia da NKB-Diagnósticos/PE e Professor da Universidade de Pernambuco; ⁴Professora adjunta da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MATERIAIS E MÉTODOS

População alvo

Foram estudadas 288 amostras de escamas ungueais, sendo 181 de unhas dos pés e 107 de unhas das mãos. Este material clínico foi oriundo de 251 pacientes procedentes da região metropolitana da cidade do Recife, Pernambuco e encaminhados para diagnóstico micológico em laboratório privado de Recife – PE, no período de Abril a Setembro de 2005.

Coleta Micológica

Em pacientes com comprometimento subungueal foram realizadas raspagens do leito ungueal com bisturi, sendo o material obtido entre o limite da unha normal e da unha afetada; na presença de manchas na superfície da unha realizou-se raspado intenso da lesão; na forma clínica proximal utilizou-se um estilete para coleta em profundidade, enquanto nos casos em que a região lesada apresentava difícil acesso, o material foi coletado por via transungueal. As amostras foram transferidas para placas de Petri e tubos contendo solução salina.

Procedimentos das amostras

O exame direto das amostras clínicas foi realizado após a clarificação com KOH a 20%, e a cultura pela inoculação em sete diferentes pontos na superfície de Placas de Petri contendo Agar de Sabouraud com cloranfenicol (50 mg/l), o material coletado em salina foi processado em Mycosel®, utilizando-se a técnica de esgotamento.

As culturas foram mantidas à temperatura ambiente (T. A = 28°C±1°C) por 20 dias, e quando da observação de crescimento fúngico, foram removidos fragmentos da colônia e transferidos para água destilada com cloranfenicol (50 mg/l) visando obtenção de colônias purificadas para realização do microcultivo em lâmina.

Análise dos dados

Os dados de incidência de agentes de onicomicose obtidos nos diferentes meses estudados constituíram as repetições para a análise estatística, sendo efetuada ANÁLISE utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Das 288 amostras de escamas ungueais sugestivas de onicomicose analisadas, 121 (42%) foram negativas e 167 (58%) positivas, sendo 97 (34%) oriundas de unhas dos pés e 70 (24%) de unhas das mãos (Figura 1).

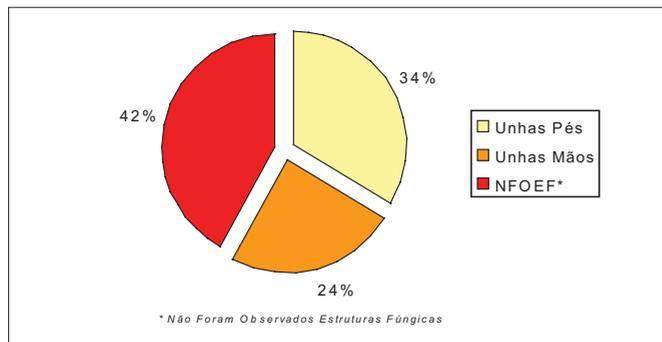


Figura 1 - Distribuição percentual dos casos de onicomicoses e localização das lesões em pacientes encaminhados a exame micológico em Recife-PE.

Entre os agentes causais, as leveduras foram o grupo micológico mais isolado, representando 86 (51%) casos positivos, fungos filamentosos não-dermatófitos foram isolados em 32 (19%) amostras e os dermatófitos em 26 (16%) casos. No entanto, não foi possível isolar o agente etiológico em 23 (14%) amostras com exame direto positivo (Figura 2).

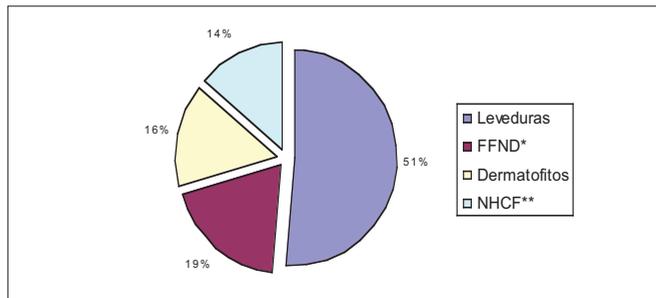


Figura 2 - Distribuição dos grupos micológicos responsáveis por onicomicose em pacientes encaminhados a exame micológico em Recife-PE.

Entre as 86 espécies de leveduras, a *Candida* sp. foi a mais isolada (56 casos), seguida pelo *Trichosporon* sp. (17 casos), *Malassezia* sp. (2 casos) e *Geotrichum* sp. (1 caso).

A etiologia por fungos filamentosos não-dermatófitos foi considerada em 32 casos, exclusivamente quando ocorreu exame direto com presença de filamentos micelianos septados hialinos irregulares e cultura com sete pontos repetidos do mesmo fungo. O gênero *Fusarium* foi identificado em 19 amostras, com predominância do *Fusarium solani* (15 casos), principalmente isolados em unhas dos pés (Figuras 3 e 4). Foram observadas também estruturas reprodutivas (macro e microconídios) ao exame micológico direto em duas amostras com culturas positivas para *Fusarium* (Figura 5). Espécies de *Scytalidium* foram observadas em oito pacientes, com predominância de *Scytalidium dimidiatum* (5 casos), exclusivamente em unhas dos pés (Figura 6).



Figura 3 - Aspecto clínico de onicomicose causada por *Fusarium solani*.



Figura 4 - Aspecto macromorfológico da colônia de *Fusarium solani* em agar Sabouraud.



Figura 5 - Estruturas reprodutivas sugestivas de *Fusarium* sp. observadas ao exame direto com KOH a 20% (400x).



Figura 6 - Onicomicose causada por *Scytalidium* sp: A. Aspecto clínico da lesão, B. Aspecto macromorfológico da colônia em agár Sabouraud, C. Aspecto micromorfológico da colônia em microcultivo.

Os dermatófitos constituíram o terceiro grupo de fungos mais isolados nos pacientes estudados, sendo detectados em 26 amostras, com observação de 24 casos em unhas dos pés e com predominância do *Trichophyton rubrum* em 15 das amostras estudadas (Figura 7).



Figura 7 - Onicomicose causada por *Trichophyton rubrum*: A. Aspecto clínico da lesão, B. Reverso da cultura em agár Sabouraud, C. Aspecto micromorfológico da colônia em microcultivo.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que as onicomicoses ainda constituem uma das principais causas de enfermidades ungueais a nível mundial e tem aumentado sua ocorrência nos últimos anos (DAHDAH & SHER, 2006). Os principais fatores de risco que contribuem para o aumento da frequência de onicomicose são: a idade da população, que coincide com doenças crônicas (diabetes e déficit da circulação periférica); imunocomprometidos por causa de infecção com HIV e uso de terapia imunossupressora (quimioterápicos ou antibióticos de espectro estendido); pessoas que praticam esportes e aqueles que possuem defeitos genéticos que levam as alterações nas funções imunes (ODOM, 1994).

O presente trabalho demonstrou números inferiores de ocorrência de espécies de dermatófitos como agentes de onicomicose, quando comparados com outros estudos realizados anteriormente (ELEWSKI, 1998; MIDGLEY & MOORE, 1998; PEREA *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2003a). Variações entre estes relatos podem ser devidas a distintos grupos geográficos estudados e respectivas diferenças climáticas, tipo de coleta de amostra realizada, amostragens com variações de outros parâmetros (idade, hábitos de vida e sexo). Estes fatores podem gerar resultados divergentes sobre a amplitude de espécies envolvidas na etiologia das onicomicoses (MARAOKI & TSELENTIS, 1998).

Não foi possível o isolamento do agente etiológico em 14% das amostras com exame direto positivo para fungos filamentosos ou leveduras, e este fato deve estar relacionado ao uso prévio de medicação antifúngica ou a ocorrência na amostra clínica de microrganismos contaminantes, de crescimento rápido, que inibiram o desenvolvimento mais lento do agente etiológico da micose. Nestes casos, a pesquisa micológica foi liberada como positiva, considerando que o resultado do exame direto com detecção de estruturas fúngicas em escamas ungueais comprova a etiologia da doença. Nos casos de onicomicose por *Candida* sp. as unhas apresentavam alterações significativas, entretanto não foi observada a ocorrência de paroníquia nos pacientes estudados. Os relatos de onicomicoses por *Malassezia* sp. são recentes

tendo Silva *et al.* (1997) como pioneiros na descrição de 14 casos com observação de *Malassezia* sp. ao exame micológico direto com KOH mais tinta Parker Quink® e cultivo. A predominância de onicomicoses causadas por espécies de leveduras, pode estar relacionada às constantes exposições das mãos a umidade (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Os fungos filamentosos não-dermatófitos têm se tornado cada vez mais frequentes na prática médica e particularmente afetam pessoas que manuseiam solo e plantas, pois em geral, estes fungos habitam microecossistema onde se apresentam como patógenos ou epífitas em muitas plantas (DORDAIN-BIGOT *et al.*, 1996). Neste estudo, as unhas acometidas por este grupo de fungos geralmente apresentaram-se distróficas ou com comprometimento subungueal distal e lateral. O isolamento da espécie *Fusarium solani* principalmente em unha do hálux concorda com estudos realizados por Baran, Tosti, Piraccini (1997), que observaram a predominância de *Fusarium*, principalmente em unhas dos pés que apresentavam traumas, distrofias ou infecção primária por dermatófitos. De forma similar, Godoy *et al.* (2004) relataram oito casos de onicomicoses por *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, esses achados foram confirmados por cortes histológicos.

Com o aumento da frequência de onicomicose ungueal por espécies de *Fusarium* é necessária uma atenção redobrada no diagnóstico laboratorial de onicomicoses, devido ao potencial invasivo do fungo, que poderá se manifestar quando o hospedeiro apresentar alguma imunodepressão (MATSU-MOTO *et al.*, 1994). A detecção de estruturas reprodutivas em tecido parasitado pode ser explicada em vista da ocorrência de onicolise propiciar a formação de cavidade por descolamento da unha, que em contato com o ar, permite a formação de esporos pelo fungo (ARAÚJO *et al.*, 2003a).

Embora Lacaz *et al.* (1999) tenham detectado onicomicose distrófica causada por *Scytalidium dimidiatum* em dois pacientes HIV positivo, os oito casos de espécies de *Scytalidium* observados nesse estudo foram oriundos de pacientes imunocompetentes. De forma similar, Pontarelli *et al.* (2005) relataram dois casos de onicomicose associada a *Scytalidium dimidiatum* em Santa Catarina; Araújo *et al.* (2003b) estudando agentes etiológicos de onicomicose na cidade do Rio de Janeiro, observaram que dos 153 casos de onicomicose, cinco foram causados por *Scytalidium* sp.. Espécies do gênero *Scytalidium* e do gênero *Fusarium* possuem a capacidade de degradar a queratina das unhas, no entanto com intensidade menor que os dermatófitos (LÓPEZ-JODRA & TORRES-RODRIGUEZ, 1999).

A crescente detecção de casos de onicomicoses por fungos oportunistas tanto em pacientes com imunodepressão como em hospedeiros imunocompetentes tem despertado atenção na comunidade científica. A experiência no tratamento de onicomicose não-dermatofítica é ainda limitada, devido à variedade de agentes etiológicos potencialmente envolvidos, sua menor frequência e poucos casos relatados na literatura. Para aumento da eficácia do tratamento dessa patologia é necessário um diagnóstico preciso, com uma metodologia de estudo correta e padronizada, detalhando a etiologia específica.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram o envolvimento de uma variedade de espécies fúngicas em patologias ungueais, com destaque para os fungos filamentosos não-dermatófitos que constituíram o segundo grupo mais isolado no presente estudo.

O diagnóstico micológico com a identificação das espécies envolvidas torna-se essencial, no sentido da busca de tratamento mais específico das onicomicoses. O envolvimento crescente de novas espécies fúngicas em patologia ungueal é uma realidade, sendo necessária a adoção de procedimentos laboratoriais que envolvam, desde técnicas de coletas adequadas como também processamento correto de amostras e conhecimento de aspectos morfológicos de uma ampla variedade de espécies fúngicas.

A crescente detecção e divulgação da diversidade de espécies fúngicas, agentes de onicomicoses, tanto em pacientes com imunodepressão como em hospedeiros imunocompetentes, poderá contribuir para instituição correta da terapêutica nas diferentes apresentações clínicas dessa micose. O reconhecimento da mudança de padrão epidemiológico da etiologia das onicomicoses e do potencial invasivo de algumas espécies, principalmente em pacientes imunocomprometidos, permitirá uma maior interação entre os laboratórios e a classe médica.

REFERÊNCIAS

1. ARAÚJO, A.J.G. et al. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. Anais brasileiros de dermatologia, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 445-455, 2003a.
2. ARAÚJO, A.J.G. et al. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Anais brasileiros de dermatologia, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 229-308, 2003b.
3. BALLESTÉ, R.; MOUSQUÉS, N.; GEZUELE, E. Onicomicosis. Revisión del tema. Revista médica del Uruguay, Montevideo, v. 19, p. 93-106, 2003.
4. BARAN, R.; TOSTI, A.; PIRACCINI, B.M. Uncommon clinical patterns of Fusarium nail infection: report of three cases. British journal of dermatology, London, v. 136, p. 424-427, 1997.
5. DAHDAH, M.J.; SCHER, R.K. Onychomycosis – An Overview. US Dermatology review (Reference Section), 2006.
6. DORDAIN-BIGOT, M.L.; BARAN, R.; BAIXENCH, M.T.; BASEX, J. Onychomycose a Fusarium. The Annales de Dermatologie et Venereologie, Paris, v.123, p. 191-193, 1996.
7. ELEWSKI, B.E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. Clinical microbiology reviews, Washington, v. 11, n. 3, p. 415-29, 1998.
8. GODOY, P. et al. Onychomycosis caused by Fusarium solani and Fusarium Oxysporum in São Paulo, Brazil. Mycopathologia, Netherlands, v. 157, p. 287-290, 2004.
9. HATTORI, N.; SHIRAI, A.; SUGIURA, Y. et al. Onychomycosis caused by Fusarium proliferatum. Br J Dermatol, v. 153, n. 3, p. 647-9, 2005.
10. HANEKE, E. Fungal infections of the nail. Seminars in dermatology, Philadelphia, v. 10, p. 41-53, 1991.
11. JOISH, V.N.; ARMSTRONG, E.P.; Newer drugs and overall costs of treating onychomycosis. Revista iberoamericana de micología, Barcelona, v. 19, n. 3, p. 130-132, 2000.
12. KENNA, M.E.; ELEWSKI, B.E. A US epidemiological survey of superficial fungal diseases. Journal of the american academy of dermatology, Philadelphia, v. 35, p. 539-542, 1996.
13. LACAZ, C.S. et al. Onychomycosis caused by Scytalidium dimidiatum. Report of two cases. Review of the taxonomy of the synanamorph and anamorph forms of this coelomycete. Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo, São Paulo, v.41, n.5, p. 319-23, 1999.
14. LACAZ, C.S. et al. Tratado de micologia médica. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002, 1104 p.
15. LÓPEZ-JODRA, O.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. Revista iberoamericana de micología, Barcelona, v. 16, n.1, p. 11-15, 1999.
16. LUBECK, D.P. Measuring health-related quality of life in onychomycosis. Journal of the american academy of dermatology, Philadelphia, v. 38, n. 5, p. 64-689, 1998.
17. MARAKI, S.; TSELENTIS, Y. Dermatophytoses in Crete, Greece, between 1992 and 1996. Mycoses, Berlin, v. 41, n. 3-4, p. 175-178, 1998.
18. MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M., Atlas de micologia médica, Barueri, SP: Manole, 2005, 170p.
19. MATSUMOTO, T. et al. Developments in hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis. Journal of medical and veterinary mycology, Norway, v.32, n. 1, p.329-349, 1994.
20. MIDGLEY G, MOORE MK. Onychomycosis. Revista iberoamericana de micología, Barcelona, v. 15, p. 113-117, 1998.
21. ODOM, R.B. Comom superficial fungal infections in immunosuppressed patients. J Am Acad Dermatol, v. 31, n. 3, pt. 2 (S56-S59), 1994.
22. PEREA, S. et al. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 38, n. 9, p. 3226-3230, 2000.
23. PONTARELLI, L.N.; HASSE, J.; GALINDO, C.C.; COELHO, M.P.P.; NAPPI, B.P. & IVO-DOS-SANTOS, J. Onychomycosis by Scytalidium dimidiatum: Report of two cases in Santa Catarina, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, v. 47, n. 6, p. 351-353, 2005.
24. ROBERTS, D.T.; EVANS, E.G.V.; ALLEN, R. Fungal nail disease. London, England: Gower Medical Publishing, p. 86, 1990.
25. SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 388p.
26. SILVA, V. et al. Isolation of Malassezia furfur from patient with onychomycosis. Journal of medical and veterinary mycology, Norway, v.35, p. 73-4, 1997.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Kedma de Magalhães Lima
 Rua Paes Cabral, nº 379, Apt. 02, Cordeiro
 CEP: 50630-170 Recife-PE
 E-mail: kedma.biom@gmail.com
 Fone: (81) 3226-9079



*Vejo você em
 Fortaleza!
 No IFCC 2008!*

Hemostasia na gravidez: um estudo prospectivo

Hemostasis in pregnancy: a prospective study

Moreira, C.E.S.¹; Ogino, M.A.S.¹; de Moraes, A.C.R.²; Neiva, T.J.C.²

RESUMO - A gravidez normal está associada a complexas alterações da hemostasia que resultam em um estado de hipercoagulabilidade sanguínea. O objetivo do presente estudo foi avaliar prospectivamente o perfil da hemostasia em gestantes encaminhadas pelas unidades básicas de saúde de Joinville. Foram avaliados 120 gestantes nos períodos de três trimestres, através dos seguintes parâmetros: determinação do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), dosagem de fator VIII, dosagem de fibrinogênio e contagem de plaquetas. A análise dos resultados mostrou uma diminuição significativa entre a média dos três trimestres de gestação em relação ao grupo controle para os tempos de protrombina(TP), tromboplastina parcial ativada(TTPa) e a contagem de plaquetas. A concentração dos fatores VIII e fibrinogênio aumentaram significativamente a partir do segundo trimestre. Estes resultados permitem concluir que, a gravidez normal está associada a uma exacerbação do mecanismo de coagulação, onde a síntese excederia o consumo.

PALAVRAS-CHAVE - Hemostasia; Gravidez; Coagulação.

SUMMARY - The normal pregnancy is associated with complex changes in hemostasis that would result in a state of hypercoagulability. The objective of the present study was to evaluate prospectively the profile of hemostasis in pregnant women directed by the basic units of health of Joinville, through the determination of plasma levels of prothrombin time (PT) activated partial thromboplastin (PTT), Factor VIII, Fibrinogen and counting of platelets, markers that reflect various stages of the hemostatic process. The results showed a significant decrease from the average of the three trimesters of pregnancy in relation to the control group for the PT, PTT and platelets. The concentration factor VIII and fibrinogen significantly increased from the second trimester in relation to the control group. These results allow to conclude that the normal pregnancy is associated with an exacerbation of the mechanism of the coagulation where the synthesis exceed consumption.

KEYWORDS - Hemostasis; Pregnancy; Coagulation.

INTRODUÇÃO

A gravidez normal está associada a uma reorientação das prioridades fisiológicas e anatômicas da gestante, que acarretam acentuadas mudanças no organismo materno, incluindo a composição dos elementos figurados e humorais sanguíneos⁸. Com a evolução da gravidez, há alterações do endotélio vascular e do fluxo sanguíneo, gerando modificações que se iniciam a partir da 10^a semana de gestação. Essas modificações podem resultar em uma acomodação das defesas hemostáticas da mãe para antecipar a separação da placenta da parede uterina⁹. Por outro lado, tais mudanças podem gerar um estado de hipercoagulabilidade sanguínea resultando em trombose⁷.

A hemostasia normal, durante a gestação, resulta de um delicado equilíbrio entre os sistemas coagulante e fibrinolítico¹³. Os efeitos da gestação sobre as proteínas da coagulação já podem ser detectados a partir do terceiro mês, com alterações significativas das proteínas pró-coagulantes em comparação aos inibidores fisiológicos^{3, 5, 12, 21}, contudo, os mecanismos implicados nesse processo permanecem a ser esclarecidos^{3, 10}. Assim sendo, as alterações do sistema hemostático, embora adaptativas, podem aumentar o risco, tanto de tromboembolismo, como de coagulação intravascular disseminada em decorrência da ativação local dessas proteínas durante o parto^{11, 14, 21, 24}.

Embora sejam descritos vários estudos da hemostasia na gravidez, a maioria destes visa estabelecer mudanças na hemostasia sob condições associadas a outros distúrbios patológicos^{9, 12, 20, 24} e raros são os estudos que avaliam a hemostasia sob condições de gravidez normal. Assim sendo, torna-se fundamental e realização constante de estudos prospectivos que permitam estabelecer o perfil da hemostasia em gestantes, visando medidas preventivas que possam minimizar possíveis complicações nessa população durante o período gestacional.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde de Joinville-SC. Após esclarecimentos do projeto aos participantes, o consentimento livre e esclarecido foi obtido. Foi aplicado um questionário contendo as informações de triagem necessárias. Foram avaliados três grupos de gestantes clinicamente saudáveis e um grupo controle, totalizando 120 participantes. Como critério de exclusão adotou-se: gestantes com doença hipertensiva, alterações metabólicas, gravidez múltipla, anemia severa (Hb < 7,0 g/dL) e infecções.

Amostras

As amostras de sangue (10mL) foram colhidas utilizando-se anticoagulante citrato de sódio 0,38%-final. As amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 900g em temperatura de 22°C para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

Parâmetros Avaliados

A coagulação foi avaliada através das determinações: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), dosagem de fator VIIIc e fibrinogênio. Para a realização das determinações utilizou-se o coagulômetro Becton-Dickson de acordo com Triplett e cols.22. A contagem de plaquetas foi realizada em contador eletrônico Pentra 120® (ABX).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em forma de média e desvios padrões para os grupos avaliados. Foi utilizado o programa instat-2 para a análise estatística. O teste de escolha foi o Tukey Kramer test e o nível de significância adotado foi a partir de $p < 0,05$.

Recebido em 22/02/2007

Aprovado em 24/03/2008

¹Curso de Especialização em Hematologia-ACL-UFSC; ²Disciplina Hematologia-ACL-CCS-UFSC.

RESULTADOS

Os resultados obtidos da avaliação do tempo de protrombina (TP) (figura 1), demonstraram que a partir do primeiro trimestre houve, em média, uma diminuição ($11,5 \pm 0,2s$) significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle ($12,4 \pm 0,16s$). De acordo com os resultados, a diminuição do parâmetro avaliado foi maior no segundo trimestre gestacional ($10,1 \pm 0,2s$) ($p < 0.001$). Para a determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) a diminuição ocorreu de forma acentuada no segundo trimestre da gestação ($29 \pm 0,6s$) em comparação ao controle ($35,5 \pm 0,9$) (figura 2). Os resultados avaliados demonstram que a fase de triagem laboratorial, reflete um estado inicial de hipercoagulação. A quantificação dos fatores VIIIc e fibrinogênio da coagulação também demonstraram um aumento destas proteínas. Para a dosagem de fator VIIIc, observou-se que a partir do primeiro trimestre ($148 \pm 7,0\%$) houve um aumento na concentração em comparação ao grupo controle ($126 \pm 9,0\%$). Da mesma forma, o maior aumento foi observado no segundo trimestre da gravidez ($196 \pm 2,6\%$) (figura 3). Com relação a determinação de fibrinogênio, este parâmetro apresentou um aumento significativo ($p < 0.05$) a partir do primeiro trimestre ($3,3 \pm 0,12$ g/L) em relação ao controle ($2,8 \pm 0,1$ g/L), sendo que o maior aumento ocorreu também no segundo trimestre da gravidez ($4,0 \pm 0,2$ g/L) ($p < 0.001$). A quantificação de plaquetas demonstrou uma diminuição significativa ($p < 0.05$) no primeiro trimestre (242.000 ± 5.000) da gravidez em relação ao controle (275.000 ± 10.000) mantendo-se constante nos demais períodos avaliados (figura 5).

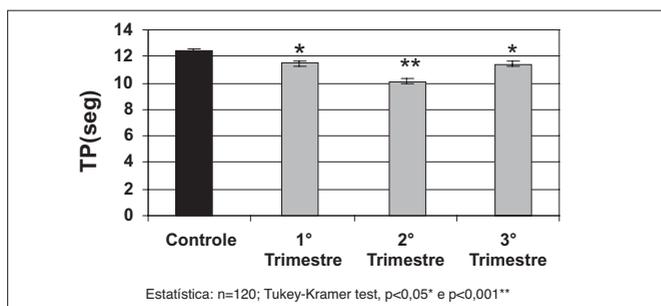


Figura 1: Avaliação do TP em gestantes normais.

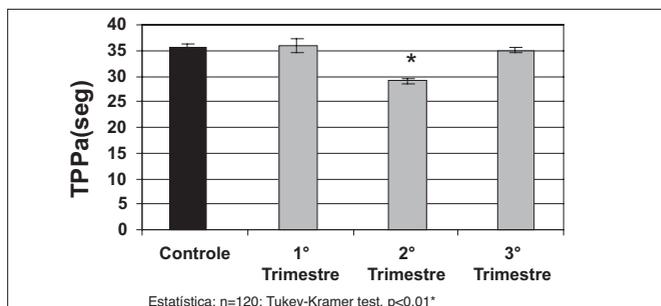


Figura 2: Avaliação do TTPa em gestantes normais.

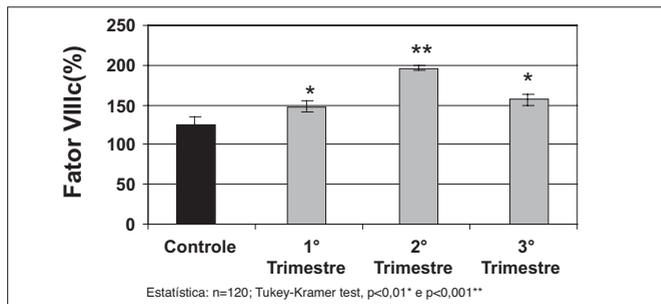


Figura 3: Avaliação do Fator VIIIc em gestantes normais.

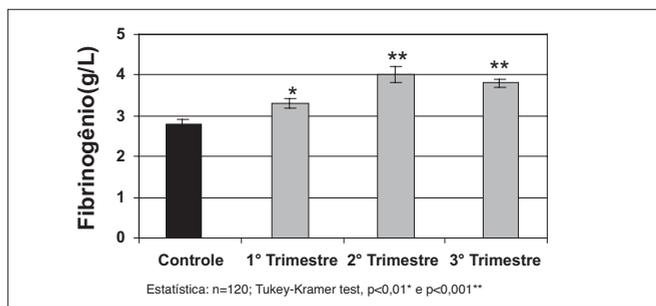


Figura 4: Avaliação do Fibrinogênio em gestantes normais.

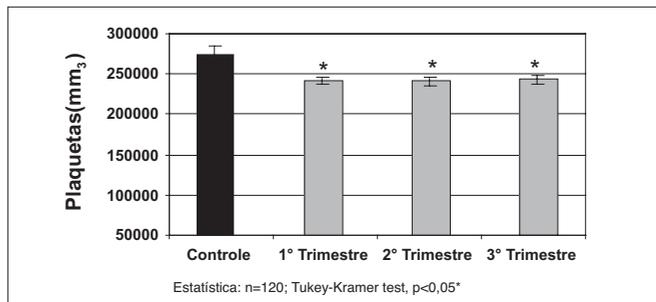


Figura 5: Contagem de plaquetas em gestantes normais.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo acompanhar as alterações hemostáticas decorrentes da gestação normal. Considerando que, a maioria das gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde municipais não tem acesso a uma assistência médica especializada que possa auxiliar na prevenção de distúrbios hemostáticos ocorridos durante e após a gravidez, torna-se necessário formular estudos que identifiquem essas alterações e assim, orientem os clínicos na racionalização dos problemas e esquematização da terapêutica adequada.

Os resultados obtidos do presente estudo demonstraram um estado fisiológico de hipercoagulabilidade sanguínea na gestação normal. Pode-se observar uma diminuição significativa nos tempos dos testes de triagem de coagulação (TP e TTPa) em todos os trimestres da gravidez. Os resultados encontrados de TP demonstraram uma diminuição significativa a partir do primeiro trimestre (Fig. 1), ocorrendo uma diminuição mais acentuada no segundo trimestre. Vários estudos têm demonstrado que, durante a gestação, ocorre aumento dos fatores de coagulação (FII, FVII e FVII) acompanhados de diminuição no TP e no TTPa^{6, 8, 23}. Outros trabalhos demonstraram que, durante a gravidez, os níveis de protrombina aumentam em torno de 10 a 20%⁸. A diminuição dos TP e TTPa obtidos em nosso trabalho demonstram uma provável elevação dos níveis desses componentes. Os resultados obtidos para o TTPa também apresentaram uma diminuição significativa em relação ao controle a partir do segundo trimestre da gravidez (Fig. 2). Cerneca e cols.⁶ observaram uma variação significativa para os TP e TTPa somente na vigésima semana da gravidez. Já Miall e cols.¹⁶ observaram uma diminuição significativa apenas para o TTPa em gestantes com investigação para trombofilias. Em nosso estudo, embora os resultados apresentem uma diminuição significativa para o TTPa apenas no segundo trimestre gestacional, há que considerar-se que o grupo estudado foi constituído de gestantes normais sem nenhum indicativo de sintomas que pudessem sugerir distúrbios trombóticos.

Em nosso estudo, os fatores pró-coagulantes VIII e I foram avaliados como parâmetros indicadores de um estado de hipercoagulabilidade. É bem estabelecido na literatura que, o acúmulo destas proteínas reflete uma predisposição a fenômenos trombóticos^{1,4,6}. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo de fator VIII nos três trimestres da gravidez, em relação ao grupo controle, o que é compatível com a literatura (Fig. 3). Da mesma forma, observou-se um aumento progressivo nas concentrações de fator I (Fig. 4). Esses achados corroboram com um estado fisiológico de hipercoagulabilidade na população estudada. Vários estudos têm demonstrado a importância do acúmulo dessas proteínas durante a gestação^{3,6,10,13}. Letsky e cols.¹³ observaram grandes alterações do sistema de coagulação, havendo aumento acentuado dos fatores da coagulação, em particular o fator I, com fibrina sendo depositada nas paredes dos vasos úteros-placentários para suprimir a fibrinólise. Segundo Bonnar³ o aumento dos fatores da coagulação já pode ser detectado a partir do final do primeiro trimestre da gestação, sendo a quantidade de fibrinogênio no final da gestação de pelo menos o dobro daquela do estado não gestacional. Em nosso estudo, o acúmulo de fatores VIII e I foi de 25,6% e 35,7%, respectivamente.

A trombocitopenia em gestantes é um achado comum que afeta de 6,6% a 11,6% das gestantes². A diminuição da contagem de plaquetas é resultante de uma variedade de condições, tais como, alterações hipertensivas da gestação, consumo excessivo e alterações imunológicas^{15, 17, 18}. Em nosso estudo, o número de plaquetas durante o período gestacional diminuiu significativamente nos três trimestres da gravidez, contudo, os valores permaneceram dentro dos limites de normalidade (Fig. 5). Os resultados obtidos analisados em conjunto, permitem concluir que a gravidez normal está associada a uma exacerbação do mecanismo de coagulação, onde a síntese excederia o consumo.

REFERÊNCIAS

1. Bick, R.L. The clinical significance of fibrinogen degradation products. *Semin. Thromb. Hemost.*; 8(4):302-330, 1982.
2. Boehlen, F.; Hohlfeld, P.; Extermann, P.; Perneger, T.V.; de Moerloose, P. Platelet count at term pregnancy: a reappraisal of the threshold. *Obstet. Gynecol.*; 95(1):29-33, 2000.
3. Bonnar, J. Haemostasis and coagulation disorders in pregnancy. In: Bloom, A.L.; Thomas, D.P. (Ed) *Haemostasis and Thrombosis*; 2^{ed}. Edinburg, Churchill Livingstone, 1987. pp.570-584.
4. Bonnar, J.; McNicol, G.P.; Douglas, A.S. Fibrinolytic enzyme system and pregnancy. *Br. Med. J.*; 3(6667):387-389, 1969.
5. Cadroy, Y.; Grandjean, H.; Pichon, J.; Desprats, R.; Berrebi, A.; Fournie, A.; Boneu, B. Evaluation of six markers of haemostatic system in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension or pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynecol.*; 100(5):416-420, 1993.
6. Cerneca, F.; Ricci, G.; Simeone, R.; Malisano, M.; Alberico, S.; Guaschino, S. Coagulation and fibrinolysis changes induced by pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*; 73(1):31-36, 1997.
7. Crowley, J.P. Coagulopathy and bleeding in the parturient patient. Recent information has helped in the identification of individuals at special risk. *R. I. Med. J.*; 72(4):135-143, 1989.
8. Delascio, D.; Síndromes Hemorrágicas na Gestação. São Paulo, Sarvier, 1997. p.190.
9. Finley, B.E. Acute coagulopathy in pregnancy. *Med. Clin. North. Am.*; 73(3):723-743, 1989.

10. Forbes, C.D.; Greer, I.A. Physiology of haemostasis and effect of pregnancy. In: Turpie, A.G.G.; Forbes, C.D. (Ed) *Haemostasis and Thrombosis in Obstetrics and Gynaecology*. London, Champ and Hall, 1992. pp.1-25.
11. Gilibert, J.; Aznar, J.; Parrilla, J.J.; Reganon, E.; Vila, V.; Estelles, A. Alterations in the coagulation and fibrinolysis system in pregnancy, labour and puerperium, with special reference to a possible transitory state of intravascular coagulation during labour. *Thromb. Haemost.*; 40(2):387-396, 1978.
12. Gilibert, J.; Estelles, A.; Grancha, S.; Espana, F.; Aznar, J. Fibrinolytic system and reproductive process with special reference to fibrinolytic failure in pre-eclampsia. *Hum. Reprod.*; 10(Supl. 2): 121-131, 1995.
13. Letsky, E.A. Mechanisms of coagulation and the changes induced by pregnancy. *Curr. Obstet. Gynaecol.*; 1(4):203-209, 1991.
14. Letsky, E.A. Disseminated intravascular coagulation. In: Morgan, B. (Ed) *Problems in Obstetric Anaesthesia*. Chichester, J Wiley and Sons, 1987. pp.69-87.
15. McCrae, K.R.; Samuels, P.; Schreiber, A.D. Pregnancy-associated thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Blood.*; 80(11):2697-2714, 1992.
16. Miall, F.M.; Deol, P.S.; Barnes, T.A.; Dampier, K.; Watson, C.C.; Oppenheimer, C.A.; Pasi, K.J.; Pavord, S.R. Coagulation status and complications of pregnancy. *Thromb. Res.*; 115(6):461-467, 2005.
17. Romero, R.; Mazor, M.; Lockwood, C.J.; Emamian, M.; Belanger, K.P.; Hobbins, J.C.; Duffy, T. Clinical significance, prevalence and natural history of thrombocytopenia in pregnancy induced hypertension. *Am. J. Perinatol.*; 6(1):32-38, 1989.
18. Sainio, S.; Kekomaki, R.; Riikonen, S.; Teramo, K. Maternal thrombocytopenia at term: a population-based study. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*; 79(9):744-749, 2000.
19. Sheppard, B.L.; Bonnar, J. The ultrastructure of the arterial supply of the human placenta in early and late pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*; 81(7):497-511, 1974.
20. Steinberg, M.H.; Saletaris, S.; Funt, M.; Baker, D.; Collier, B.S. Management of factor XI deficiency in gynecologic and obstetric patients. *Obstet. Gynecol.*; 67(1):130-133, 1986.
21. Stirling, Y.; Woolf, L.; North, W.R.; Seghatchian, M.J.; Meade, T.W. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb. Haemost.*; 52(2):176-182, 1984.
22. Triplett, D. A.; Harms, C. S.; Koepke, J. A. The effect of heparin on the activated partial thromboplastin time. *Am. J. Clin. Pathol.*; 70(Supl. 3):556-559, 1978.
23. Uchikova, E.H.; Ledjev, I.I. Changes in haemostasis during normal pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol.*; 119(2):185-188, 2005.
24. Wallmo, L.; Karlsson, K.; Teger-Nilsson, A.C. Fibrinopeptide A and intravascular coagulation in normotensive and hypertensive pregnancy and parturition. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*; 63(7):637-640, 1984.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Teresinha de Jesus Carvalho Neiva
 Universidade Federal de Santa Catarina,
 Departamento de Análises Clínicas-CCS
 Florianópolis, SC, Brasil;
 Tel:48-3331-9712
 E-mail: neiva@ccs.ufsc.br

Atipias cervicais detectadas pela citologia em mulheres atendidas em dois hospitais da rede pública de São Luís - MA

Cervical atypias detected by cytology in women attended in two public hospitals of São Luís - MA

Luiz Mário da Silva Silveira¹; América de Lourdes Nogueira da Cruz²; Manuel dos Santos Faria³

RESUMO - A triagem citológica é uma importante ferramenta diagnóstica utilizada para detectar lesões cancerosas e pré-cancerosas da cérvix. Avaliou-se a prevalência de alterações celulares em 9.008 laudos de colpocitologia oncótica realizado pelo INLAB Investigação Laboratorial Ltda. (São Luís - MA), em 2004 e 2005, de mulheres atendidas no Hospital Carlos Macieira (São Luís - MA) e Maternidade Marly Sarney (São Luís - MA). Foi avaliada a prevalência de atipias celulares, a ocorrência de distribuição de efeito citopático para HPV nas lesões intra-epiteliais e a prevalência de atipias em gestantes. Foram encontrados 318 casos (3,53%) com laudos de alterações citológicas, onde 1,60% estavam relacionadas a ASCUS, 1,44% a LSIL, 0,34% a HSIL e 0,14% a AGUS. A faixa etária prevalente para ASCUS e LSIL foi abaixo de 35 anos, enquanto que para HSIL foi acima de 49 anos. A alteração celular prevalente em gestantes foi LSIL.

PALAVRAS-CHAVE - Atipias celulares, colpocitologia oncótica, lesão intra-epitelial.

SUMMARY - The cytological screening is an important diagnostic tool used to detect cancerous and precancerous lesions of the cervix. It was evaluated the prevalence of cellular atypias of 9,008 Pap test carried out by INLAB Laboratory (São Luís - MA) in 2004 and 2005, from women attended in Carlos Macieira Hospital (São Luís - MA) and Marly Sarney Maternity (São Luís - MA). It was evaluated the prevalence of cellular atypias, the occurrence of cytopathic effect caused by HPV and the prevalence of atypias in pregnant. Among 318 (3.53%) smears with cytological atypias, ASCUS was the most common atypia (1.60%), followed by LSIL (1.44%), HSIL (0.34%) and AGUS (0.14%). The prevalent age band for ASCUS and LSIL was below 35 years, while that for HSIL was above 49 years. The prevalent cellular atypia observed in pregnant was LSIL.

KEYWORDS - Cellular atypias, intraepithelial lesion, Pap test.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável por cerca de 9% de todos os novos casos de câncer invasivo no mundo todo. A incidência por câncer de colo de útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos, sendo que a maioria dos casos novos ocorre em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, é o câncer mais comum entre as mulheres³².

Tem sido estabelecido que o câncer cervical desenvolve-se progressivamente através de diferentes estágios de alterações celulares, indo do epitélio normal ao carcinoma invasivo. A nomenclatura desses estágios depende do sistema de classificação utilizado, sendo de uso corrente as nomenclaturas do sistema NIC (neoplasia intra-epitelial cervical) e sistema Bethesda.

Os fatores possivelmente envolvidos na origem das neoplasias intra-epiteliais e do câncer do colo podem ser especificados como epidemiológicos, fatores potenciais ou cofatores e relações virais¹¹. Dentre os fatores virais, o papilomavírus humano (HPV) é o principalmente implicado na evolução das neoplasias intra-epiteliais cervicais. A infecção pelo HPV ocorre antes que a neoplasia intra-epitelial tenha se desenvolvido e requer a disponibilidade de células epiteliais da mucosa que ainda são capazes de proliferar (células da camada basal)¹⁹.

A colpocitologia oncótica, introduzida na década de 40 por Papanicolaou e Traut, constituiu grande avanço no controle do carcinoma da cérvix uterina. O método foi gradativamente adquirindo adeptos, assimilado em serviços de ginecologia e, atualmente, representa importante forma de rastreamento deste tipo de neoplasia. A sua grande aceitabilidade, tanto pela população como pelos profissionais de

saúde, aliada à facilidade de execução, têm permitido a redução significativa da mortalidade por câncer do colo do útero nos países onde sua implementação foi ampla, principalmente nos centros mais desenvolvidos²⁶.

Neste trabalho, visando avaliar a situação de alterações celulares cérvico-vaginais e sua correlação com algumas variáveis, realizou-se levantamento retrospectivo de fichas de pacientes submetidas à colpocitologia oncótica através da análise de laudos citológicos das pacientes atendidas em dois hospitais públicos de São Luís - MA.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi realizado um estudo analítico retrospectivo de 9.008 laudos de colpocitologia oncótica diagnosticados pelo laboratório INLAB Investigação Laboratorial (São Luís - MA), no ano de 2004 e 2005.

As amostras foram obtidas de mulheres que procuraram espontaneamente seus ginecologistas para consulta no Hospital Carlos Macieira (São Luís - MA) e Maternidade Marly Sarney (São Luís - MA), hospitais da rede pública estadual do Maranhão. As mulheres foram submetidas à coleta de exame citológico como parte da rotina diagnóstica do médico. O material citológico foi coletado da ectocérvix, com espátula de Ayre e da endocérvix, com escova (cytobrush), estendido em lâmina de vidro, fixado em álcool etílico 96° e corado pela técnica de coloração de Papanicolaou.

As amostras foram examinadas no setor de citologia do Laboratório INLAB e os resultados foram classificados conforme o Sistema Bethesda³⁰.

O HPV foi sugerido pelo exame de citologia por meio das modificações morfológicas produzidas pelo vírus na célula. As alterações citológicas atribuídas ao vírus foram os critérios clássicos associados ou não a critérios não clássicos^{15, 43}.

Recebido em 06/12/2006

Aprovado em 03/09/2007

Trabalho realizado no INLAB Investigação Laboratorial Ltda.

¹Professor do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). ²Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório INLAB-MA. ³Diretor-Geral do Laboratório INLAB-MA.

Para análise estatística foi aplicado o teste qui-quadrado, utilizando o programa BioEstat versão 3.0® e foram consideradas significativas as variáveis com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre todas as localizações, o câncer de colo do útero é o que apresenta um dos mais altos potenciais de prevenção e cura, sendo este próximo a 100%, quando diagnosticado precocemente. Tem sido verificado que a incidência máxima dessa neoplasia situa-se entre 40 e 60 anos de idade, e apenas uma pequena porcentagem ocorre antes dos 30 anos²⁵. Embora haja grande esforço no país para a detecção precoce do câncer de colo uterino, a doença continua a ser um grave problema de saúde pública. Isto porque apenas 30% das mulheres submetem-se ao exame citopatológico pelo menos três vezes na vida, o que resulta em diagnósticos já em fase avançada em 70% dos casos²⁵.

Neste trabalho foram avaliadas retrospectivamente 9.008 fichas diagnósticas de colpocitologia oncológica com diagnóstico satisfatório realizadas no INLAB Investigação Laboratorial em 2004 e 2005. A Tabela 1 descreve a distribuição da idade das mulheres e a idade no início da atividade sexual. Várias características são usualmente associadas com um risco maior para o câncer cervical. As mais consistentes são: múltiplos parceiros sexuais, parceiros sexuais promíscuos e início da atividade sexual precoce. Além disto, o nível socioeconômico baixo, a paridade, o uso de anticoncepcional hormonal, fatores dietéticos e imunossupressão têm sido implicados como potenciais fatores de risco para o carcinoma cervical¹⁰.

Dentre os fatores assinalados acima, foram compilados dados a respeito de início de atividade sexual. Mendonça²⁴ relata que o câncer de colo uterino está fortemente associado à atividade sexual, mais especificamente, ao número de parceiros e à idade da primeira relação sexual. Tem sido descrito que a primeira relação sexual tem ocorrido mais precocemente, independente do estrato social, sendo que esta tendência tem mostrado que as mulheres têm se iniciado sexualmente tão cedo quanto os homens²⁸.

A idade média das mulheres avaliadas neste trabalho foi de 32,5 anos. Com relação à primeira relação sexual encontrou-se média de 15,2 anos, que tem sido semelhante à encontrada por vários autores^{3, 28}, reforçando os achados de início precoce de atividade sexual na população feminina brasileira. Segundo Kahn e Hillard¹⁴, o início precoce de atividade sexual figura entre os mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia cervical.

Na Tabela 2 está expresso os resultados referente ao laudo citológico das 9.008 mulheres avaliadas.

Durante o período de estudo, com laudos satisfatórios para diagnóstico, 9.008 exames citológicos foram interpretados e classificados conforme o Sistema Bethesda. A maioria delas, 8.690 (96,48%), teve resultados citológicos negativos para lesões intra-epiteliais escamosas ou glandulares.

As mulheres que apresentaram resultados citológicos alterados, 318 (3,53%), ficaram distribuídas em 144 (1,60%) com células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), 130 (1,44%) com lesão intra-epitelial de baixo grau com HPV (LSIL), 31 (0,34%) com lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) e 13 (0,14%) com atipias de células glandulares de significado indeterminado (AGUS). Kurman e Solomon¹⁷ relatam que o número total de casos alterados diagnosticados deve corresponder a 4 a 6% do total de casos avaliados, enquanto Cardin⁵ relata valores entre 3 e 5%. A literatura tem registrado prevalências bem próximas às que se encontrou neste trabalho: 4,80%³¹, 3,14%¹, 4,75%².

Em uma análise preliminar, a prevalência de atipias encontrada neste trabalho está de acordo com dados encontrados em nível nacional e internacional. De mesma maneira, comparando-se a prevalência encontrada neste trabalho (3,53%) com os descritos por Silva *et al.*⁴², realizados em mulheres atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA), não se observou diferenças nas prevalências encontradas.

Analisando a prevalência de lesões neoplásicas do colo uterino de acordo com a faixa etária, verificou-se que ASCUS e LSIL foram mais prevalentes nas mulheres abaixo de 35 anos e HSIL na faixa etária acima de 49 anos (Tabela 3).

As lesões de células escamosas de baixo e alto grau somaram 1,78%, que concordam com taxas encontradas por Kjaer¹⁶, Sherman *et al.*⁴¹ e Arcuri *et al.*².

Conforme observado na tabela, verificou-se que as maiores taxas de SIL foram encontradas nas faixas abaixo de 35 anos e acima de 49 anos (0,72%; 0,14%, respectivamente), o que se tem confirmado na literatura. Caprara *et al.*⁴ destacam que a prevalência do diagnóstico de LSIL diminui progressivamente com o avançar da idade, enquanto as alterações HSIL são maiores na faixa etária acima de 49 anos, o que também foi observado neste trabalho. Observou-se que lesões HSIL diferem significativamente ($p=0,0018$) quando avaliada em função da variação da faixa etária, acometendo mulheres de idade mais avançada, enquanto que lesões LSIL apresentaram tendência de maior prevalência em mulheres mais jovens, embora não tenha apresentado diferenças ($p=0,5188$) neste trabalho quando comparado com as várias faixas etárias.

O exame de Papanicolaou, além de permitir a detecção de lesões em colo de útero, é útil ainda para a detecção de alterações compatíveis com a infecção pelo papilomavírus, um reconhecido fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Embora se conheça as formas oncogênicas do HPV, e muito se tenha descoberto nas últimas décadas de como esse vírus acelera o aparecimento do carcinoma escamoso cervical, este tema está longe de ser totalmente elucidado³³. Uma relação causal entre um agente infeccioso e uma doença específica é de certa forma fácil de estabelecer quando um agente é raro e a doença é aguda, fato que não se aplica para que se possa explicar de forma satisfatória a associação de HPV com carcinoma e as lesões pré-malignas. A literatura tem indicado uma variação de 2 a 48% na ocorrência de HPV, sendo que diferenças são encontradas de região a região¹⁸.

No presente trabalho foi encontrado a coexistência de 97 (60,25%) casos incluindo alterações celulares clássicas compatíveis com HPV, dentre as alterações celulares de baixo e alto grau.

Dos casos de alterações citopáticas relacionados ao papilomavírus humano, 77,69% estavam associados a LSIL e 22,68% a HSIL. Neste aspecto, tem sido encontrada uma acentuada discrepância de associação de HPV com SIL, não se estabelecendo um padrão regular de distribuição. Matsukura e Sugase²² têm determinado que a falta de distribuição regular nas lesões precursoras é dependente do tipo de vírus de HPV encontrado no epitélio cervical, sendo que os mesmos autores destacam os tipos 16 e 18 como os mais freqüentemente detectados nas SIL. No entanto, variação geográfica tem sido destacada na prevalência de algum tipo de HPV específico⁶. Porém, independente de qualquer fator de variabilidade, tem sido fartamente descrito que a presença do HPV no epitélio cervical aumenta o risco da mulher desenvolver o câncer cervical^{35, 36, 39, 40, 45, 46}. No presente estudo foi observado a ocorrência de 1.462 (16,23%) gestantes incluídas na população avaliada. Deste

total, 58 (3,97%) apresentaram algum tipo de alteração celular, sendo que 21 casos (1,44%) estavam associados à infecção pelo HPV.

Na Tabela 4 está ilustrada a distribuição de atipias em gestantes de acordo com o tipo de lesão.

As lesões cervicais são largamente propagadas como as mais comuns dentre as anormalidades durante a gravidez, embora a epidemiologia tanto do câncer cervical quanto da gravidez esteja mudando³⁸. Além do mais, a gravidez possibilita a busca de auxílio médico e assim a realização de colpocitologia oncótica, que poderia significar em aumento no número de casos positivos. De acordo com os dados apresentados na Tabela 4 e correlacionando-os com os dados da Tabela 2, não se encontrou diferença estatística significativa ($p=0,3405$) no aparecimento de atipias no caso da mulher ser gestante ou não. Apesar da fisiologia alterada na gestante, tem sido mostrado que a evolução da atipia não é acelerada pela gravidez e que, na verdade, a gestação favorece um bom prognóstico para a atipia⁸.

No que se refere à ocorrência de HPV em gestantes, a literatura tem relatado resultados discordantes. Devido os níveis aumentados dos hormônios esteroidais, os elementos virais podem ativar a replicação do HPV, o que resultaria na progressão mais rápida de uma lesão intra-epitelial ao carcinoma epidermóide⁴⁸. Nesse sentido, alguns autores têm destacado a maior ocorrência de papilomavírus humano em gestantes⁷, embora outros autores não tenham encontrado correlação de prevalência de HPV em gestantes em relação a não gestantes^{8, 27}.

Neste trabalho observou-se que não houve aumento da frequência de alterações citopáticas por HPV de gestantes em relação a não-gestantes ($p=0,4539$). Estes resultados divergem dos trabalhos que mostram ser a gravidez um fator predisponente à infecção por HPV devido a imunomodulação ou influências hormonais, fato que já está clinicamente comprovado pela alta taxa de regressão das lesões após o parto²⁷; porém, os resultados relatados endossam os resultados obtidos por outros autores⁸.

O diagnóstico de atipias de significado indeterminado em células escamosas foi feito com base em critérios citomorfológicos descritos para esta alteração celular que, pelo fato da subjetividade envolvida, conduz, via de regra, a baixa reprodutibilidade interpessoal. Neste trabalho foi encontrado 144 casos descritos como ASCUS, correspondendo a 1,60% das atipias encontradas. Para atipias de significado indeterminado de células escamosas a literatura tem relatado taxas estimadas desde 0,2 até 9%^{2, 15, 20, 41}. A taxa de atipias de significado indeterminado em células glandulares diagnosticado foi baixa (0,14%), embora em concordância com diversos autores^{12, 20, 29, 37}. Kaferle e Malouin¹³ e Souza *et al.*⁴⁴ referem que o diagnóstico de AGUS é bom parâmetro da qualidade de esfregaços citológicos, sendo que sua frequência não deve ultrapassar 1%.

Estudos que relacionam a citologia/histologia no diagnóstico das alterações celulares têm tentado mostrar o real significado destas condições. Como as atipias de significado indeterminado de células escamosas/glandulares não têm correspondentes no diagnóstico histológico, tem sido relatado que mais da metade dos casos de atipias de significado indeterminado de células escamosas resultam em diagnósticos normais pela histologia^{4, 9}, embora Malik *et al.*²¹ e Massad *et al.*²³ tenham encontrado maior malignidade na histo-avaliação. No entanto, convém ressaltar que apesar

da boa correlação de atipia de significado indeterminado de células escamosas com biópsia negativa, Pitman *et al.*³⁴ alertam que redução ou eliminação desse diagnóstico parece diminuir significativamente a sensibilidade do exame de Papanicolaou, reduzindo dessa maneira as chances de diagnóstico de LSIL e HSIL. Em relação às atipias de significado indeterminado de células glandulares, Nasuti *et al.*²⁹ observam que uma interpretação mais cuidadosa da citologia oncótica pode levar a diagnóstico diferente deste, levando-se em consideração a idade da paciente e histórico diagnóstico anterior.

Com relação à distribuição de ASCUS de acordo com a faixa etária, não se observou diferença estatística significativa ($p=0,1316$), embora tenha havido tendência marcante de casos ASCUS na faixa etária mais jovem.

A análise da faixa etária pouco representa no diagnóstico citológico de ASCUS, uma vez que há possibilidade de não haver lesão histológica alguma, o que, segundo Williams *et al.*⁴⁷, tende a ocorrer em 39% dos casos. No presente estudo foi demonstrado uma prevalência maior na faixa abaixo de 35 anos, o que pode levar a crer que seria pelas peculiaridades de eventuais lesões subjacentes do tipo intra-epitelial escamosas, ou tão somente por ser este o período em que as mulheres mais procuram serviços de ginecologia para prevenção de câncer ginecológico.

TABELA I
Variáveis idade e início de atividade sexual das mulheres incluídas no estudo (INLAB Investigação Laboratorial, 2004 - 2005).

| | Média | Mínimo | Máximo |
|-------------------------------------|-------|--------|--------|
| Idade | 32,5 | 15 | 77 |
| Idade de início de atividade sexual | 15,2 | 12 | 22 |

TABELA II
Frequência dos diagnósticos citológicos do colo uterino (INLAB Investigação Laboratorial, 2004 - 2005).

| Diagnóstico citológico | N | % |
|------------------------|--------------|---------------|
| Negativo | 8.690 | 96,48 |
| ASCUS | 144 | 1,60 |
| LSIL | 130 | 1,44 |
| HSIL | 31 | 0,34 |
| AGUS | 13 | 0,14 |
| Total | 9.008 | 100,00 |

TABELA III
Prevalência de atipias de colo uterino de acordo com a faixa etária (INLAB Investigação Laboratorial, 2004 - 2005).

| | Faixa etária (anos) | | | | | | Total | |
|--------------|---------------------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|
| | < 35 | | 35 -49 | | >49 | | N | % |
| | N | % | N | % | N | % | | |
| ASCUS | 80 | 0,89 | 43 | 0,48 | 21 | 0,23 | 144 | 1,60 |
| LSIL | 65 | 0,72 | 45 | 0,50 | 20 | 0,22 | 130 | 1,44 |
| HSIL | 8 | 0,09 | 10 | 0,11 | 13 | 0,14 | 31 | 0,34 |
| AGUS | - | - | 8 | 0,09 | 5 | 0,06 | 13 | 0,15 |
| Total | 153 | 1,70 | 106 | 1,18 | 59 | 0,65 | 318 | 3,53 |

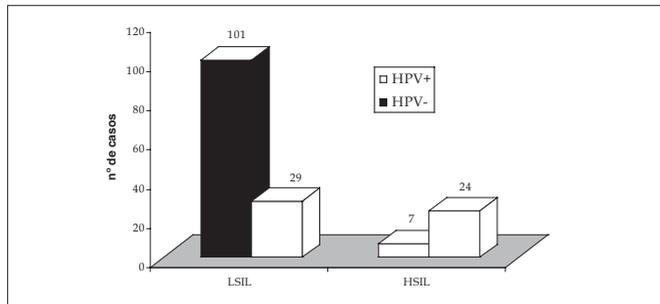


Figura 1: Relação de efeitos citopáticos para HPV em lesões de baixo e alto grau (INLAB Investigação Laboratorial, 2004 - 2005).

TABELA IV

Distribuição de atipias nas gestantes que realizaram a colpocitologia oncológica (INLAB Investigação Laboratorial, 2004 - 2005)

| | N | % |
|--------------|-----------|---------------|
| ASCUS | 18 | 31,03 |
| LSIL | 34 | 58,63 |
| HSIL | 5 | 8,62 |
| AGUS | 1 | 1,72 |
| Total | 58 | 100,00 |

CONCLUSÃO

Os resultados relatados neste trabalho permitem inferir que a colpocitologia oncológica é um exame essencial para fins preventivos, permitindo à mulher que realiza este exame um diagnóstico precoce e um tratamento menos agressivo quando do surgimento de alteração celular.

O perfil de distribuição de casos de atipias celulares observado mostrou a mesma tendência que a literatura vem registrando, acometendo predominantemente mulheres em fase etária jovem, a não influência da condição gestacional no desenvolvimento de alterações celulares e que a avaliação criteriosa das atipias indeterminadas pode direcionar para condutas mais adequadas às pacientes.

Dessa maneira, o papel do profissional que executa o exame é importante em todas as fases do processo, a fim de garantir às suas pacientes um laudo seguro e tratamento precoce e adequado em casos de atipias celulares.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do corpo técnico do laboratório INLAB Investigação Laboratorial Ltda.

REFERÊNCIAS

- Altaf, F.J. Pattern of cervical smear cytology in the western region of Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*, 21(1-2):94-96, 2001.
- Arcuri, R.A.; Cunha, K.C.F.; Alves, E.C. et al. Controle interno da qualidade em citopatologia ginecológica: um estudo de 48.355 casos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38(2):141-147, 2002.
- Borges, A.L.V.; Schor, N. Trajetórias afetivo-amorosas e perfil reprodutivo de mulheres adolescentes residentes no Município de São Paulo. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 5(2):163-170, 2005.
- Caprara, L.; Monari, F.; De Bianchi, P.S. et al. ASCUS in screening. *Pathologica*, 93(6):645-450, 2001.
- Cardin, V. Replies to questions on quality assurance measures in cytopathology. *Acta Cytologica*, 32(6): 915-919, 1988.
- Ferrera, A.; Velema, J.P.; Figueroa, M. et al. Human papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cancer in Honduras: A case control study. *International Journal of Cancer*, 82:799-803, 1999.
- Fife, K.H.; Katz, B.P.; Roush, J. et al. Cancer-associated human papillomavirus

- types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174:1487-1493, 1996.
- Germann, N.; Haie-Meder, C.; Morice, P. et al. Management and clinical outcomes of pregnant patients with invasive cervical cancer. *Annals of Oncology*, 16: 397-402, 2005.
- Giudice, A.; Rizzo, M.; Rossi, R.T. et al. Diagnosis and survey of abnormal/atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions: a retrospective study. *Anticancer Research*, 20(2B):1195-1199, 2000.
- Gontijo, R.C. Incidência de lesões cervicais subseqüentes em mulheres com citologia de rastreamento normal segundo a detecção do papilomavírus humano. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 2005 (Tese de Doutorado).
- Halbe, H. Tratado de ginecologia. 3ed. São Paulo: Roca, 2000.
- Hecht, J.L.; Sheets, E.E.; Lee, K.R. Atypical glandular cells of undetermined significance in conventional cervical/vaginal smears and thin-layer preparations. *Cancer*, 96(1):1-4, 2002.
- Kaferle, J.E.; Malouin JM. Evaluation and management of AGUS Papanicolaou smear. *American Family Physician*, 63:2239-2244, 2001.
- Kahn, J.A., Hillard, P.A. Human papillomavirus and cervical cytology in adolescents. *Adolescent Medicine Clinics*, 15(2):301-321, 2004.
- Kaneshima, E.N.; Suzuki, L.E.; Irie, M.M.T. et al. Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papillomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 35(1): 29-33, 2003.
- Kjaer, S.K. Risk factors for cervical neoplasia in Denmark. *APMIS Supplement*, 80:1-41, 1998.
- Kurman, R.J.; Solomon, D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag Inc., 1994.
- Kornya, L.; Cseh, I.; Deak, J. et al. The diagnostic and prevalence of genital human papillomavirus (HPV) infection in Hungary. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 100:231-236, 2002.
- Liaw, K.L.; Hildesheim, A.; Burk, R.D. et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *The Journal of Infections Disease*, 183:8-15, 2001.
- Lima, D.N.O.; Câmara, S.; Mattos, M.G.G. et al. Diagnóstico citológico de ASCUS: sua importância na conduta clínica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38(1):45-49, 2002.
- Malik, S.N.; Wilkinson, E.J.; Drew, P.A. Do qualifiers of ASCUS distinguish between low- and high-risk patients? *Acta Cytologica*, 43(3):376-380, 1999.
- Matsukura, T.; Suguse, M. Relationship between 80 papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial cervical neoplasia: association and causality. *Virology*, 283:139-147, 2001.
- Massad, L.S.; Collins, Y.C.; Meyer, P.M. Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecologic Oncology*, 82:516-522, 2001.
- Mendonça, G.A.S. Câncer na população feminina brasileira. *Revista de Saúde Pública*, 27(1):68-75, 1993.
- Ministério da Saúde. Normas e Recomendações do Instituto Nacional do Câncer/MS. Recomendações básicas para o controle do câncer do colo do útero no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 46:23-33, 2000.
- Motta, E.V.; Fonseca, A.M.; Bagnoli, V.R. et al. Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 47(4):302-310, 2001.
- Murta, E.F.C.; Souza, M.A.H.; Adad, S.J. et al. Infecção pelo papilomavírus humano durante a gravidez: relação com achados citológicos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 23(6):377-382, 2001.
- Nascimento, M.I.; Pires, E.S.; Gil, D.Q. et al. Características de um grupo de adolescentes com suspeita de neoplasia intra-epitelial cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 27(10): 619-626, 2005.
- Nasuti, J.F.; Fleisher, S.R.; Gupta, P.K. Atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS): clinical considerations and cytohistologic correlation. *Diagnostic Cytopathology*, 26(3):186-190, 2002.
- National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *Acta Cytologica*, 33:567-575, 1989.
- Nyirjesy, I.; Billingsley, F.S.; Forman, M. Evaluation of atypical and low grade cervical cytology in private practice. *Obstetrics and Gynecology*, 92(4):601-607, 1998.

32. Parkin, D.M.; Pisani, P.; Ferlay, J. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 49(1):33-64., 1999.
33. Pinto, A.P.; Tulio, S.; Cruz, O.R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 48(1):73-78, 2002.
34. Pitman, M.B.; Cibas, E.S.; Powers, C.N. Reducing or eliminating use of the category of atypical squamous cells of undetermined significance decreases the diagnostic accuracy of the Papanicolaou smear. *Cancer*, 25(3):125-127, 2002.
35. Ponten, J.; Guo, Z. Precancer of the human cervix. *Cancer Surveys*, 32: 201-229, 1998.
36. Ratnam, S.; Franco, E.L.; Ferenczy, A. Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 9: 945-951, 2000.
37. Reuss, E.; Price, J.; Koonings, P. Atypical glandular cells of undetermined significance. Subtyping as a predictor of outcome. *The Journal of Reproductive Medicine*, 46(8):701-705, 2001.
38. Sadler, L.; Sykes, P. How little is known about cervical cancer in pregnancy? *Annals of Oncology*, 16: 341-343, 2005.
39. Sasagawa, T.; Basha, W.; Yamazaki, H. et al. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 10: 45-52, 2001.
40. Scott, D.R.; Hagmar, B.; Maddox, P. et al. Use of human papillomavirus DNA testing to compare equivocal cervical cytologic interpretations in the United States, Scandinavia, and the United Kingdom. *Cancer*, 96:14-20, 2002.
41. Sherman, M.E.; Schiffman, M.; Herrero, R. et al. Performance of a semiautomated Papanicolaou smear screening system: results of a population-based study conducted in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer*, 84(5):273-280, 1998.
42. Silva, H.A.; Silveira, L.M.S.; Corrêa, P.B.F. et al. A influência da fase pré-analítica no controle de qualidade do diagnóstico colposcópico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 34(3):131-135, 2002.
43. Silveira, L.M.S.; Silva, H.A.; Pereira, I.P. et al. Critérios citomorfológicos para o diagnóstico de HPV e sua relação com a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 37(2): 127-132, 2005.
44. Souza, J.H.K.; Kalil, I.V.; Leite, J.M. et al. Evaluation of cervical slides previously diagnosed as ASCUS: interassay and interobserver comparison. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, 26(3):233-240, 2004.
45. Stern, P.L.; Brown, M.; Tacey, S.N. et al. Natural HPV immunity and vaccination strategies. *Journal of Clinical Virology*, 19: 57-66, 2000.
46. Tonon, S.A.; Picconi, M.A.; Zinovich, J.B. et al. Human papillomavirus cervical infection and associated risk factors in a region of Argentina with a high incidence of cervical carcinoma. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 7: 237-243, 1999.
47. Williams, M.L.; Rimm, D.L.; Pedigo, M.A. et al. Atypical squamous cells of undetermined significance: correlative histologic and follow-up studies from academic medical center. *Diagnostic Cytopathology*, 16:1-7, 1997.
48. Worda, C.; Huber, A.; Hudelist, G. Prevalence of cervical and intrauterine human papillomavirus infection in the third trimester in asymptomatic women. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 12(6):440-444, 2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Luiz Mario da Silva Silveira
 Rua 02 Qd. 05 C-05 - Residencial
 Itaguara II - Cohatrac
 Cep. 65050-100 São Luiz - MA

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
 35^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
 8^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro a 02 de outubro 2008
 Fortaleza - CE - Brasil



*Sociedade
 Brasileira de
 Análises
 Clínicas*

A SBAC facilita para você ir ao maior congresso mundial de Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário
 Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.
 Corra e aproveite!

Maiores informações:
 21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

Atipias escamosas de significado indeterminado: novas qualificações e importância na conduta clínica

Atypia in squamous cells of undetermined significance: news qualifications and importance in clinical conduct

Karen Shelen Bueno*

RESUMO - O termo atipia escamosa de significado indeterminado (ASCUS) foi introduzido pelo Sistema de Bethesda em 1988, gerando diversas discussões a respeito do abuso deste diagnóstico e da conduta clínica mais apropriada a ser seguida. Após a introdução das novas qualificações das ASCUS (ASC-US e ASC-H), novas condutas foram preconizadas visando um tratamento mais objetivo em relação à lesão. O trabalho baseia-se na revisão da literatura para comparar dados e discutir a melhor conduta frente ao resultado de atipias escamosas. Dentre 62.323 colpocitologias realizadas em 2005 pelo laboratório em estudo, 197 casos (0,32%) corresponderam às ASCUS. A porcentagem de retorno foi avaliada até junho de 2006, obtendo 53,3% de presença para a realização da citologia de repetição. O tempo gasto para repetir a colpocitologia variou entre 04 e 06 meses na maior parte (44,8%) dos retornos efetivados. A idade média das pacientes foi 47 anos, cujo seguimento mostrou maior número de lesões escamosas em mulheres com menos de 30 anos. Os dados obtidos através deste estudo se mostraram condizentes com a literatura, garantindo a boa qualidade dos exames realizados. No momento de decidir entre colposcopia, biópsia, repetição da colpocitologia e teste de hibridização para HPV no seguimento das ASCUS, deve-se considerar as subcategorias destas atipias, a fim de evitar o aparecimento de lesões mais graves.

PALAVRAS-CHAVE - ASCUS, células escamosas atípicas, neoplasia cervical.

SUMMARY - The term atypia in squamous cells of undetermined significance (ASCUS) it was introduced by the Bethesda System in 1988, generating several discussions about this diagnostic abuse and the more appropriate clinical to be procedure to be followed. After the introducing new qualifications of ASCUS (ASC-US and ASC-H), new procedures were preconized aiming at a more objective treatment in relation to the lesion. The work is based on literature review to compare data and discuss a better procedure facing the atypia in squamous results. Among 62.323 Pap smears accomplished in 2005 by the referred laboratory, 197 cases (0,32%) corresponded to ASCUS. The return percentage was evaluated up to June of 2006, obtaining 53,3% of presence for the accomplishment of the repetition cytology. The time spent to repeat the Pap smear varied between 04 to 06 months (44,8%) in the great majority of the executed returns. The patients' average age was 47 years, whose continuation showed a greater number of atypia in squamous in women under 30. Data obtained through this study confirm the literature, guaranteeing the good quality of the accomplished exams. In the moment of deciding among colposcopy, biopsy, Pap smear repetition and hybridization test for HPV in the continuation of ASCUS, they should consider their subcategories in order to avoid the emergence of more serious lesions.

KEYWORDS - ASCUS, atypical squamous cells, cervical neoplasia.

INTRODUÇÃO

O carcinoma invasor do colo uterino corresponde ao segundo câncer mais comum em mulheres no mundo. É caracterizado por apresentar diversas fases pré-malignas, de forma que, se for diagnosticado em uma destas fases, pode ser considerado reversível quando se realiza um tratamento adequado. A prevenção e o diagnóstico precoce constituem as formas ideais para reduzir a mortalidade decorrente das neoplasias do colo uterino. Os programas de rastreamento do câncer de colo do útero têm grande importância pelo fato de interromperem a história natural da doença, oferecendo tratamento adequado para as lesões pré-invasoras, evitando o aparecimento de câncer invasor. O surgimento do carcinoma do colo do útero segue normalmente um curso lento, possibilitando o desenvolvimento de protocolos de rastreamento baseados na análise das células obtidas do colo uterino e da vagina, conforme proposto por Papanicolaou em 1940.

O estudo citológico do esfregaço cervical é considerado o método de melhor custo-efetividade para a detecção de lesões precursoras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Este estudo permite a identificação de um conjunto de alterações celulares classificadas de acordo com a presença e o grau das atipias apresentadas. O exame de Papanicolaou tem sido avaliado em diversos trabalhos e, em muitos deles, é considerado um método bastante confiável para detectar as lesões cervicais. Um estudo de Pinho e Mattos

(2002) revelou que a sensibilidade (proporção de casos verdadeiros positivos) do teste de Papanicolaou foi próxima de 79,8% e a especificidade (proporção de casos verdadeiros negativos) foi próxima de 99,9%.

Os resultados dos exames citopatológicos utilizam uma linguagem uniforme, visando permitir um perfeito entendimento pelos diversos profissionais que participam do sistema de diagnóstico. Esta padronização também possibilita a informatização dos resultados, com o objetivo de aumentar o conhecimento epidemiológico das neoplasias do colo uterino, permitindo planejar ações de prevenção e controle. A nomenclatura utilizada nos laudos citopatológicos baseia-se no Sistema de Bethesda que, em 1988, houve a inclusão de novos termos para as alterações citológicas com o objetivo de aumentar o grau de concordância entre citopatologistas e facilitar as atitudes clínicas frente a tais diagnósticos (SOLOMON e NAYAR, 2005). Dentre os novos termos, foi criada a categoria ASCUS (atypia in squamous cells of undetermined significance), empregada para indicar células escamosas com anormalidades que não preenchem os critérios habitualmente encontrados em condições inflamatórias reativas, pré-neoplásicas ou neoplásicas (LIMA *et al.*, 2002).

A grande preocupação que a categoria atipias indeterminadas gera é a de ser usada como via de saída para as limitações de quem interpreta a citologia cérvico-vaginal (SEBASTIÃO *et al.*, 2004), visto que, a interpretação dos critérios citomorfológicos no diagnóstico de ASCUS envol-

Recebido em 15/05/2007

Aprovado em 25/05/2008

Prêmio CFF de 2007

(Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini)

*Farmacêutica-bioquímica do Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini (Laboratório IPD, Varginha, MG); Especialista em Citologia Clínica pela Universidade do Vale do Rio Verde em Três Corações, MG.

ve subjetividade e conduz à baixa reprodutibilidade inter-pessoal (LIMA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2004). Por essa razão, vários programas de prevenção do câncer de colo uterino em todo mundo começaram a utilizar programas de controle de qualidade para garantir a credibilidade dos exames citopatológicos.

Apesar da inespecificidade do termo, diversos autores sugerem que pistas indicativas do processo subjacente sejam identificadas. Foi observado que ASCUS em célula escamosa madura teria um risco de 10% de progressão ou associação com lesão intraepitelial escamosa, ASCUS em célula escamosa metaplásica (metaplasia escamosa atípica) teria este risco aumentado para 24% e ASCUS em metaplasia imatura teria o risco de 41%, indicando a necessidade de uma melhor definição do tipo de atipia escamosa diagnosticada (ELEUTÉRIO JUNIOR *et al.*, 2000).

A correlação histológica de ASCUS se mostra indefinida, independente de subclassificações que determinam a origem da lesão. Um amplo leque de possibilidades que varia desde o achado de normalidade até carcinoma escamoso invasor pode ocorrer, não havendo, portanto, uma correlação direta entre o diagnóstico citológico e histológico (ELEUTÉRIO JUNIOR *et al.*, 2000).

Diante dos diversos estudos, são bastante diversificadas as opiniões em relação ao seguimento das pacientes com diagnóstico de ASCUS. As discussões baseiam-se nos procedimentos mais adequados a serem utilizados com o objetivo de impedir que uma lesão cervical evolua para estágios mais avançados, os quais resultam em tratamentos mais desconfortáveis à paciente.

Dentre os procedimentos são discutidos a repetição da citologia cervico-vaginal, a colposcopia, biópsia e teste de captura híbrida para HPV. Aspectos como sensibilidade, especificidade, comodidade à paciente, adesão ao tratamento e prevenção devem ser levados em conta quando se define um esquema de condutas a serem seguidas em relação às mulheres atendidas.

Diante das diversas opiniões em relação às atipias de significado indeterminado, é importante que se faça uma revisão da literatura a fim de uniformizar a linguagem entre os diversos profissionais da área de saúde. Assim como ocorre com os casos supervalorizados, deve-se preocupar com os casos subvalorizados, os quais, através da história natural da doença, podem evoluir para estágios mais graves, cujo seguimento pode trazer mais sofrimento e piores prognósticos às pacientes. Desta maneira, é interessante buscar novos conceitos e discutir sobre as novas qualificações das ASCUS.

Na rotina laboratorial, sabe-se que levantamentos estatísticos referentes aos diagnósticos de ASCUS são considerados importantes para a avaliação da qualidade dos exames realizados. Frente a tal afirmação, este estudo tem também a finalidade de discutir os dados obtidos no Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini (IPD), em relação as colposcópicas pertencentes ao Programa Siscolo no ano de 2005, com os resultados citados por outros autores. Além de tudo, juntamente com estes dados, pode-se fazer uma análise do perfil da região atendida pelo IPD sob o aspecto de porcentagem de retorno para realização da citologia de repetição, tempo gasto para o retorno e resultados obtidos de acordo com a faixa etária.

REVISÃO DA LITERATURA

Estatísticas

O câncer de colo do útero é o segundo mais comum entre

as mulheres no mundo, sendo responsável, anualmente, por cerca de 471.000 casos novos e pelo óbito de, aproximadamente, 230.000 mulheres por ano. A incidência por câncer de colo de útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta até atingir seu pico, geralmente na faixa de 45 a 49 anos. O maior índice dos casos novos (80%) ocorre em países em desenvolvimento, podendo ser o de maior número entre as mulheres em algumas regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Em países desenvolvidos, a sobrevida média das mulheres em cinco anos varia de 59 a 69%. Nos países em desenvolvimento, como os casos são encontrados em estágios mais avançados, a sobrevida média é próxima de 49% após cinco anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

No Brasil, esperam-se 19.260 novos casos de câncer de colo do útero em 2006, com um risco estimado de 20 casos / 100.000 mulheres. Na região sudeste, este corresponde ao terceiro tipo de câncer mais freqüente (20 / 100.000). Em Minas Gerais, o câncer de colo de útero corresponde ao quarto tipo mais freqüente (15 / 100.000), perdendo para o câncer de mama, câncer de traquéia, brônquio e pulmão e câncer de estômago (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

História natural do câncer de colo do útero e fatores de risco

A história natural do câncer de colo do útero envolve mudanças reversíveis no tecido cervical de um estado normal no qual nenhuma alteração é vista no epitélio escamoso, para estados variados de anormalidades celulares que conduzem ao câncer cervical (SCHLECHT *et al.*, 2003).

Normalmente, uma lesão intraepitelial de baixo grau pode progredir para uma lesão intraepitelial de alto grau e para carcinoma invasor da cérvix ou pode regredir a um estado normal (SCHLECHT *et al.*, 2003).

O conceito clássico de lesões pré-invasivas do colo uterino consiste em um grupo diverso de alterações, com curso de progressão lento para carcinoma invasor, iniciando pela neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grau 1, seguindo para NIC grau 2 e desta para NIC grau 3. As classificações baseiam-se na acentuação da atipia celular e da fração da espessura do epitélio cervical acometida (PEDROSA, 2003).

Diversos autores publicaram trabalhos que avaliaram a história natural das NIC, concluindo que a probabilidade de um epitélio atípico evoluir para neoplasia invasora é diretamente proporcional à severidade da atipia e que esta progressão é reversível, ocorrendo com freqüência a regressão das lesões para estágios anteriores. Como exemplo, Melnikow e colaboradores em 1998, citado por Pedrosa em 2003, publicaram um artigo que discute a evolução das lesões, conforme mostra a Tabela 1.

TABELA I
Evolução das alterações citológicas

| Citologia inicial | Identificação de HGSIL (%) | | Progressão para carcinoma invasor (%) | | Regressão para normal (%) |
|-------------------|----------------------------|----------|---------------------------------------|----------|---------------------------|
| | 06 meses | 24 meses | 06 meses | 24 meses | |
| ASCUS | 1,9 | 7,2 | 0,06 | 0,25 | 68,2 |
| LGSIL | 6,6 | 20,8 | 0,04 | 0,15 | 47,4 |
| HGSIL | 6,8 | 23,4 | 0,15 | 1,44 | 35,0 |

Fonte: Pedrosa, 2003

Está bem estabelecido que a infecção pelo HPV seja o principal fator responsável pelo desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical e de carcinoma invasor do colo uterino (PEDROSA, 2003). Schlecht *et al.* (2003) concluíram que lesões precursoras da cérvix persistem por muito mais tempo e progridem mais depressa em mulheres com infecção por HPV oncogênico que em mulheres com infecção por HPV não oncogênico ou com ausência de HPV.

O risco de câncer cervical também é influenciado pela presença de co-fatores como o fumo; esteróides sexuais; pelo estado imunológico da mulher; por características relacionadas à vida reprodutiva e ao comportamento sexual como idade no primeiro coito, número de parceiros, comportamento sexual do parceiro, número de gestações e partos. Alguns destes fatores estão relacionados ao risco de contaminação pelo HPV, enquanto outros se relacionam diretamente a carcinogênese (PEDROSA, 2003).

Classificação das alterações citológicas cervicais

A avaliação citológica de células do colo uterino e da vagina foi proposta por Papanicolaou e Traut em 1941 (PEDROSA, 2003). Estes publicaram a monografia com o título "Diagnóstico do câncer do colo uterino" que, pela primeira vez, introduziu uma classificação diagnóstica (PIRES *et al.*, 2006), conforme Tabela 2.

A proposta para a classificação de Papanicolaou apresentava problemas como a não utilização da nomenclatura de forma uniforme por diferentes laboratórios e citopatologia e a baixa correspondência com os achados histológicos, levando a revisões do sistema classificatório (PEDROSA, 2003). Outros sistemas foram propostos, conforme citado abaixo:

- Em 1953, James Reagan introduziu o termo displasia e carcinoma epidermóide "*in situ*" como lesões precursoras do carcinoma invasor;
- Em 1968, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publica uma nomenclatura histológica sobre tumores uterinos, a partir da qual foi criada uma classificação similar para citopatologia do colo uterino;
- Em 1967, Ralph Richart classifica as lesões intraepiteliais do colo uterino como NIC I, NIC II, NIC III e Carcinoma "*in situ*";
- Em 1990, Ralph Richart englobou no termo NIC III, o carcinoma "*in situ*", tendo em vista a similaridade no diagnóstico e tratamento das duas lesões;
- Em 1988, o National Cancer Institute (NCI), em Bethesda (EUA), promove um grupo de trabalho para desenvolver um sistema de descrição dos esfregaços de Papanicolaou, que representaria a interpretação citológica de um modo claro e relevante para o clínico (PEDROSA, 2003; SOLOMON e NAYAR, 2005).

Esta última categoria de classificação ficou conhecida como Sistema de Bethesda (TBS) e foi revisada em 1991 para estabelecer uma terminologia uniforme e unificar os relatórios de diagnósticos (APGAR e ZOSCHNICK, 2003). Foram introduzidos os critérios para avaliação da adequabilidade do material e as lesões intraepiteliais do colo do útero ficaram divididas em dois grupos: lesões de baixo grau e lesões de alto grau (PIRES *et al.*, 2006). O termo atipia escamosa de significado indeterminado foi criado pelo TBS, gerando discussões e abuso no uso do termo pelos citopatologistas (SOLOMON e NAYAR, 2005).

A principal vantagem do Sistema de Bethesda foi a distinção entre as alterações celulares benignas (infecciosas, reativas ou regenerativas) e as alterações atípicas (atípicas escamosas ou glandulares de significado indeterminado). O TBS foi elaborado visando à correlação entre a citologia e a histologia, facilitando a comunicação entre os citopatologistas, os clínicos e os pesquisadores através de uma padronização internacional (PEDROSA, 2003).

Após a realização de um seminário nacional em 1993, o Ministério da Saúde e a Sociedade Brasileira de Citopatologia por intermédio do Instituto Nacional do Câncer recomendaram a aplicação de uma nomenclatura que é utilizada no formulário padronizado nacionalmente para o programa Viva Mulher (PIRES *et al.*, 2006).

O Quadro 1 apresenta os principais sistemas classificatórios desenvolvidos e a correlação existente entre eles.

| Papanicolaou | OMS | Richart | Ministério da Saúde | Bethesda |
|--------------|------------------------------|------------------------------|--|--|
| Classe I | Normal | ----- | Dentro dos limites da normalidade | Normal |
| Classe II | Alterações benignas | ----- | Alterações reativas e / ou reparativas | Alterações celulares benignas |
| ----- | ----- | ----- | ASCUS/AGUS | ASCUS / AGUS |
| ----- | ----- | ----- | HPV | Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL) |
| Classe III | Displasia Leve | NIC I | NIC I | Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL) |
| | Displasia Moderada | NIC II | NIC II | |
| | Displasia Acentuada | NIC III | NIC III | |
| Classe IV | Carcinoma " <i>in situ</i> " | Carcinoma " <i>in situ</i> " | | |
| Classe V | Carcinoma escamoso invasor | Carcinoma escamoso invasor | Carcinoma escamoso invasor | Carcinoma escamoso invasor |
| | Adenocarcinoma | Adenocarcinoma | Adenocarcinoma | Adenocarcinoma |

Fonte: PIRES, 2006

QUADRO 1 – Correspondência entre as classificações em citopatologia

Atípicas escamosas de significado indeterminado

O termo células escamosas atípicas surgiu em 1988, através do Sistema de Bethesda, com a finalidade de facilitar o diagnóstico das alterações celulares que não se enquadram às características de processo reativo ou às características de neoplasia (APGAR e ZOSCHNICK, 2003; SOLOMON e NAYAR, 2005; PIRES *et al.*, 2006).

A presença do novo termo como possibilidade de diagnóstico acabou gerando muitas controvérsias e discussões, principalmente com relação ao abuso do uso da categoria ASCUS como escape para as dificuldades diagnósticas e à dificuldade de decidir que medidas de tratamento e / ou seguimento tomar com a paciente (SOLOMON e NAYAR, 2005). Para controlar o abuso dos diagnósticos de ASCUS, o NCI concluiu que o número destes casos deve ficar em torno de 5 % em relação à quantidade total de exames de um laboratório (SODHANI *et al.*, 2003; SOLOMON e NAYAR, 2005; PIRES *et al.*, 2006).

Como base no seguimento das pacientes, o NCI patrocinou um estudo clínico, o ASCUS / LSIL Triage Study (ALTS), para determinar o melhor tratamento possível para estas pacientes, comparando colposcopia imediata, triagem para colposcopia baseado em teste de captura híbrida para HPV e citologia e triagem apenas com citologia. Ficou concluído que as alterações citomorfológicas poderiam prever uma possível lesão intraepitelial, tendo como importante fator a presença de HPV de baixo ou alto risco, aumentando a sensibilidade para descobrir uma possível lesão mais avançada como o NIC III. (SOLOMON *et al.*, 2001; SHERMAN *et al.*, 2002; SOLOMON e NAYAR, 2005).

Em 1991, o Sistema de Bethesda foi revisto e foi acrescentada uma qualificação complementar das ASCUS de acordo com as alterações observadas: ASCUS favorecendo processo reativo (ASCUS-R) ou ASCUS favorecendo um processo neoplásico (ASCUS-N) (PIRES *et al.*, 2006; APGAR e ZOSCHNICK, 2003). Porém, nenhum consenso foi alcançado com relação às subcategorias e numerosos estudos mostraram que o uso destes qualificadores não era reprodutível (APGAR e ZOSCHNICK, 2003).

Em 2001, o Sistema de Bethesda foi novamente revisado, enfatizando a importância de se determinar o risco das atípicas escamosas em ser normal ou abrigar uma lesão intraepitelial escamosa. As atípicas escamosas ficaram divididas

em duas subcategorias: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas, onde não é possível excluir uma lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H) (APGAR e ZOSCHNICK, 2003; SOLOMON e NAYAR, 2005).

A interpretação das ASCUS requer que as células demonstrem três características essenciais:

- diferenciação escamosa;
- aumento da proporção da área do núcleo em relação ao citoplasma;
- hiper cromasia nuclear mínima e irregularidade na distribuição da cromatina ou da forma nuclear, podendo ocorrer binucleação (SOLOMON e NAYAR, 2005).

De acordo com as subcategorias das atipias escamosas, alguns padrões citopatológicos foram determinados para ajudar a definir uma atipia de significado indeterminado e uma atipia onde não se pode excluir uma HSIL, segundo Quadro 2 (SOLOMON e NAYAR, 2005; PIRES *et al.*, 2006).

| Tipos celulares classificados como ASC-US | Tipos celulares classificados como ASC-H |
|---|---|
| - células escamosas atípicas com citoplasma maduro do tipo célula intermediária | - células escamosas atípicas associadas com atrofia |
| - metaplasia escamosa madura atípica | - metaplasia escamosa imatura atípica |
| - células escamosas paracercatóticas atípicas | - células de reparo atípico |

QUADRO 2 – Padrões citopatológicos para diferenciar ASC-US e ASC-H

Um dos mais importantes critérios para suspeitar de uma lesão de alto grau é a diferenciação celular, ou seja, se ela é de um padrão mais profundo em relação ao epitélio cervical. As células escamosas atroficas, as metaplásicas imaturas e as de reparo atípico geralmente apresentam relação núcleo/citoplasmática mais aumentada, tamanho celular menor, cromatina um pouco mais hiper corada e irregular, que podem sugerir uma HSIL (SOLOMON e NAYAR, 2005).

A Nomenclatura Brasileira para laudos de citopatologia é baseada no Sistema de Bethesda e foi incorporada pelos laboratórios que prestam serviços ao programa do governo federal a partir de 1998, com a implantação do Programa Nacional de Controle do Câncer de Colo de Útero e Mama - Viva Mulher. O INCA e a Sociedade Brasileira de Citopatologia promoveram diversas discussões a respeito da Nomenclatura Brasileira, na qual em 2003 ficaram determinadas a atual nomenclatura utilizada e as condutas clínicas preconizadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Em relação às ASCUS, ficaram definidas duas subcategorias: possivelmente não neoplásicas e não se pode afastar lesão intraepitelial de alto grau. O objetivo foi identificar célula imatura que, por sua própria indiferenciação, podem representar maior risco de corresponder a lesões mais avançadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Uma nova classificação foi introduzida, a atipia de significado indeterminado de origem indefinida, destinada às situações na qual não se pode estabelecer com clareza a origem da célula atípica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Pinto *et al.* (2006) concluíram que esta categoria é um achado muito incomum e que uma cuidadosa revisão da lâmina, na maioria dos casos, resultará no encontro de características de atipias glandulares (mais provável) ou mesmo atipias escamosas (menos provável). A definição traz grande benefício para a paciente, uma vez que há condutas melhores estabelecidas para esses diagnósticos.

A conduta clínica para mulheres com diagnóstico de atipias escamosas varia de acordo com a presença ou não de risco de apresentar uma HSIL. As condutas preconizadas pelo

Programa Nacional de Controle de Câncer do Colo do Útero englobam a repetição do exame citopatológico, colposcopia e biópsia. A repetição do exame citopatológico possui baixa sensibilidade (67 a 85%) e não existe informação suficiente para definir o intervalo e o número de repetições. Esta conduta pode retardar o diagnóstico de uma lesão mais grave e a necessidade de visitas repetidas às unidades de saúde diminui a adesão da paciente, dificultando o seguimento. A colposcopia apresenta uma sensibilidade de 96% para identificar o tecido anormal, porém muitas pacientes consideram o procedimento desconfortável. A captura híbrida, apesar de não fazer parte dessas condutas preconizadas, é o procedimento de maior sensibilidade (83 a 100%), de forma que aponta a presença de HPV de baixo ou alto risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Segundo Souza *et al.* (2004), cerca de 70% das mulheres portadoras de esfregaço com diagnóstico de ASC (atipias escamosas) não possuem lesão cervical visível ao exame colposcópico; 20 a 40% terão uma lesão intraepitelial escamosa associada, sendo que em 5 a 15% será com a lesão de alto grau. E, embora seja raro, um carcinoma oculto pode estar presente em 0,1% das vezes.

Segundo Morin *et al.* (2001), a citologia de repetição juntamente com o teste de Captura Híbrida para HPV é suficiente para aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico de lesão escamosa, diminuindo o número de mulheres com ASC para colposcopia. Conforme o trabalho de Sherman *et al.* (2003), o teste de captura híbrida para HPV juntamente com a citologia convencional reduziria em 86% a incidência de câncer.

Após o estudo de 111 casos com diagnóstico de ASCUS através da colposcopia e biópsia dirigida, Lima *et al.* (2002), concluíram que é muito importante o papel exercido pela citologia e pela colposcopia integradas, um método complementando as limitações do outro, não negligenciando, quando necessário, a realização de biópsia. Acreditam que a colposcopia permanece como o meio mais efetivo na seleção de pacientes de alto risco para lesões intraepiteliais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo em dados arquivados de 975 pacientes com diagnóstico citológico positivo, cujos esfregaços haviam sido corados pela técnica de Papanicolaou e identificados por escrutínio, no período de janeiro a dezembro de 2005. Todos os casos diagnosticados como ASCUS foram acompanhados até junho de 2006 para avaliar se houve seguimento com a repetição da citologia e qual o tempo gasto para a paciente realizar novamente o exame. Os dados foram obtidos através dos arquivos registrados no programa elaborado pelo Datasus, na versão 3.01, fornecido pelo INCA para digitação dos laudos de citopatologia do Programa de Prevenção do Câncer do Colo de Útero. Os exames em estudo pertencem ao Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini (IPD), um laboratório situado em Varginha, no sul de Minas Gerais. Este realiza em média 6.000 colpocitologias por mês referente ao Programa Siscolo, sem contar as colpocitologias particulares ou atendidas por outros convênios.

O objetivo do estudo é comparar os dados apresentados pelo laboratório IPD com os dados descritos e recomendados pela literatura, assim como discutir sobre as novas qualificações da categoria ASCUS e o seguimento mais adequado diante delas.

No período em que ficou determinada a busca dos dados, a nova Nomenclatura Brasileira para os laudos citopatoló-

gicos ainda não estava em vigor. Apenas foi considerado o critério atípicas escamosas de significado indeterminado, sem definir se é possivelmente não neoplásica ou não se pode excluir uma lesão intraepitelial de alto grau, conforme consta na atual nomenclatura.

Os dados analisados nesse estudo foram baseados na relação do número de casos de ASCUS com o total de casos positivos, os resultados da citologia de repetição, a porcentagem de retorno da paciente para a realização da segunda citologia, o tempo gasto para que ocorresse este retorno e a relação com a faixa etária.

De acordo com o Ministério da Saúde, que preconiza o tempo de seis meses para a realização da citologia de repetição no caso do diagnóstico de ASCUS, a pesquisa dos dados de retorno foi realizada no período de janeiro de 2005 a junho de 2006, considerando o tempo de seis meses para os últimos meses do ano em questão.

RESULTADOS

De janeiro a dezembro de 2005 foram realizados 62.323 exames de citopatologia, totalizando 975 casos positivos. Dentre os casos positivos foram englobados os diagnósticos de ASCUS, LSIL, HSIL, carcinoma invasor, atípicas glandulares, adenocarcinomas e outras neoplasias malignas. Nesse período, o número total das ASCUS foram 197 casos, correspondente a 0,32% do total de exames realizados. A distribuição mensal destes casos em relação ao total de casos positivos e em relação ao total de lesões de baixo grau (640 casos durante o ano) se encontra na Figura 1. O número de LSIL se manteve aproximadamente três vezes o número de ASCUS durante os meses analisados.

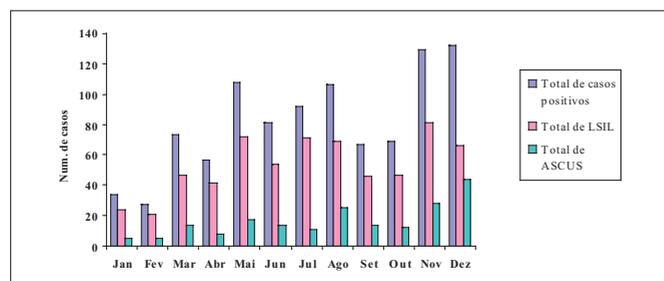


FIGURA 1 - Relação mensal entre casos positivos, ASCUS e LSIL

Após o levantamento dos dados, foram pesquisados os resultados obtidos na citologia de repetição das pacientes que retornaram até junho de 2006. O número de retorno obtido no período determinado foi de 105 pacientes, correspondendo a 53,3% do total de mulheres com diagnóstico de ASCUS. O número de pacientes que não retornou correspondeu a 46,7%.

Para a análise dos dados, a presença de inflamação, metaplasia escamosa e atrofia com inflamação foram classificadas como alterações reativas. A distribuição se encontra na Tabela 2.

TABELA II
Resultados da citologia de repetição após diagnóstico primário de ASCUS

| Resultados | Número de casos | Porcentagem |
|-----------------------------------|-----------------|--------------|
| Dentro dos limites da normalidade | 15 | 14,3 |
| Alterações reativas | 61 ¹ | 58,0 |
| ASCUS | 06 | 5,7 |
| LSIL | 15 ² | 14,3 |
| HSIL | 06 | 5,7 |
| AGUS | 01 | 1,0 |
| Insatisfatório | 01 | 1,0 |
| Total | 105 | 100,0 |

1 - Um resultado foi obtido através de biópsia e outro através de citologia particular, ou seja, fora do programa Siscolo;
2 - Quatro resultados de LSIL obtidos através de biópsia

A idade média das pacientes com diagnóstico de ASCUS foi de 47 anos, com intervalo de 15 a 79 anos. Foi feita uma distribuição das atípicas em relação à faixa etária, com intervalos de 10 anos, conforme Tabela 3.

TABELA III
Porcentagem de ASCUS de acordo com a faixa etária

| Idade | Total de casos | Porcentagem |
|--------------|----------------|--------------|
| Até 20 anos | 22 | 11,2 |
| 21 a 30 anos | 53 | 26,9 |
| 31 a 40 anos | 43 | 21,8 |
| 41 a 50 anos | 39 | 19,8 |
| 51 a 60 anos | 25 | 12,7 |
| 61 a 70 anos | 10 | 5,1 |
| 71 a 80 anos | 05 | 2,5 |
| Total | 197 | 100,0 |

Após a análise da faixa etária, os resultados da citologia de repetição foram distribuídos de acordo com as idades, conforme Tabela 4.

Tabela IV
Resultados da citologia de repetição em relação à idade

| Idade | DLN | Alterações reativas | ASCUS | LSIL | HSIL | AGUS | Insatisfatório |
|--------------|-----------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| Até 20 anos | * | 04 | 01 | 05 | * | * | * |
| 21 a 30 anos | 04 | 16 | * | 05 | 01 | 01 | * |
| 31 a 40 anos | 03 | 13 | 01 | * | 03 | * | * |
| 41 a 50 anos | 03 | 16 | 01 | 01 | 01 | * | 01 |
| 51 a 60 anos | 01 | 09 | 01 | 03 | 01 | * | * |
| 61 a 70 anos | 02 | 02 | 02 | 01 | * | * | * |
| 71 a 80 anos | 02 | 01 | * | * | * | * | * |
| Total | 15 | 61 | 06 | 15 | 06 | 01 | 01 |

* Ausência deste resultado nesta faixa etária no período avaliado

Como o único dado disponível de seguimento da paciente com ASCUS foi o retorno para a realização de nova citologia, o tempo gasto para que um novo exame fosse realizado foi distribuído segundo a Tabela 5. Houve um maior número de retornos entre quatro a seis meses após o diagnóstico de atípicas escamosas, como recomenda o Ministério da Saúde.

Tabela V
Tempo gasto para realização da citologia de repetição

| Tempo | Total de casos | Porcentagem |
|------------------|----------------|--------------|
| Até 03 meses | 27 | 25,7 |
| 04 a 06 meses | 47 | 44,8 |
| 07 a 12 meses | 26 | 24,7 |
| Mais de 12 meses | 05 | 4,8 |
| Total | 105 | 100,0 |

DISCUSSÃO

Como a categoria ASCUS gera inúmeras discussões a respeito do seu uso, diversos trabalhos apresentam a preocupação em controlar o número destes diagnósticos. Segundo Lima *et al.* (2002) e o NCI, a quantidade de resultados com ASCUS não deve representar mais que 5% de todas as amostras citológicas encaminhadas a um serviço de citopatologia. Foi citado ainda que estes casos não devem exceder duas a três vezes o volume de espécimes correspondentes a lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.

No laboratório IPD onde foi realizado o estudo, o número de

ASCUS correspondeu a 0,32% do total de exames realizados no período de 12 meses, mostrando um índice bem abaixo do máximo recomendado. Em relação ao total de LSIL, o número de ASCUS foi aproximadamente três vezes menor, representando ser condizente com o trabalho acima citado. O fato das porcentagens se apresentarem bem abaixo dos índices encontrados na literatura, pode estar relacionado com o perfil regional onde estão sendo realizadas as pesquisas. Segundo Pedrosa (2003), o protocolo mais recente desenvolvido pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP), em setembro de 2001, recomenda que o seguimento de mulheres que apresentam atipia de células escamosas seja baseado na subdivisão destas atipias em "significado indeterminado" (ASC-US) ou em "favorecendo lesão de alto grau" (ASC-H). Aquelas com ASC-US podem ser seguidas através da repetição de colpocitologia oncológica em um intervalo de 4 a 6 meses, até que dois exames consecutivos negativos para malignidade ou lesão intraepitelial sejam obtidos; ou através de colposcopia imediata; ou ainda, através da pesquisa de subtipos oncogênicos do HPV por técnica de hibridização. Já as mulheres com ASC-H devem ser imediatamente encaminhadas à colposcopia.

Como no ano de 2005 ainda não eram utilizadas as subcategorias das atipias escamosas nos laudos de citopatologia, apenas foi considerado o diagnóstico de ASCUS, cujo seguimento era baseado apenas na repetição da citologia após seis meses do primeiro resultado. A perda de seguimento ocorreu em 46,7% das mulheres em questão. Um elevado percentual das perdas (39,5%) também foi observado no trabalho de Pedrosa (2003), que abordou 223 mulheres quanto aos fatores de risco de desenvolver neoplasia e seguimento com repetição da citologia, colposcopia e biópsia.

Uma limitação do estudo diz respeito ao tempo de seguimento, que foi restrito a seis meses em relação ao último mês do ano de 2005. Pode ter ocorrido subestimação do percentual de retorno e de alterações intraepiteliais. Contudo, pode-se afirmar que o tempo para retornar dos casos não avaliados foi superior a seis meses, fugindo dos protocolos de seguimento. A maior parte dos resultados obtidos com a segunda citologia correspondeu às alterações reativas (58,0%), 14,3% foi de lesão de baixo grau e 5,7% de lesão de alto grau. Diante das diversas opiniões em relação a qual atitude tomar frente a mulheres com diagnóstico de ASCUS, vale ressaltar a importância de se usar as subcategorias das atipias escamosas no momento de decidir qual conduta clínica será utilizada.

Diante das novas classificações das atipias escamosas, alguns casos de ASCUS foram revistos para avaliar a evolução do diagnóstico após o tempo gasto para fazer a citologia de repetição. No caso onde o seguimento revelou NIC I e HPV, foi observado que as atipias escamosas se caracterizaram por apresentar aumento da relação núcleo/citoplasmática, leve aumento da hiper cromasia e ceratinização citoplasmática. Na citologia de repetição, foram observadas a presença de coilócitos, com binucleação, ceratinização, núcleos irregulares e cromatina grosseira (FIGURA 2).

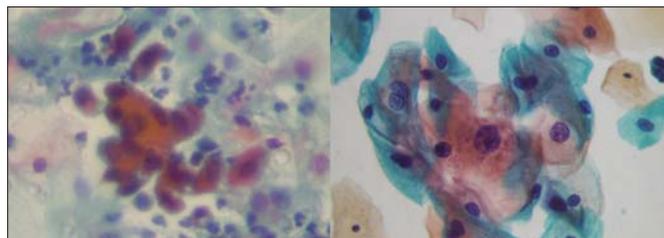


FIGURA 2 – Evolução do diagnóstico de ASCUS para NIC I / HPV

Nos casos, cujo seguimento revelou lesão de alto grau, foram evidenciadas atipias em células mais profundas, indicadas pela pequena quantidade de citoplasma, relação núcleo/citoplasmática mais aumentada e cromatina um pouco mais hiper corada. Na citologia de repetição, as células se apresentaram com padrão mais profundo, cromatina grosseira e hiper corada, pleomorfismo e irregularidade nuclear (FIGURA 3 e FIGURA 4).

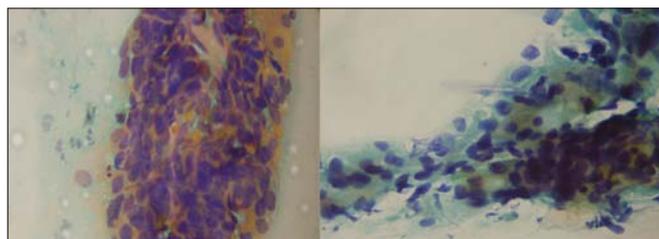


FIGURA 3 – Evolução do diagnóstico de ASCUS para lesão escamosa de alto grau

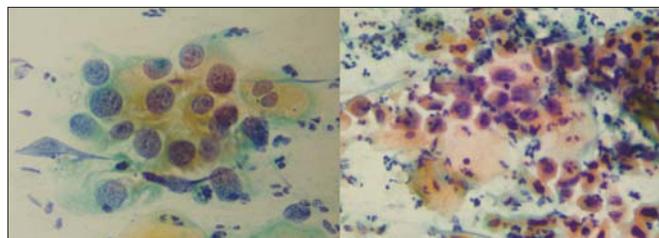


FIGURA 4 – Definição de lesão de alto grau após diagnóstico de ASCUS

Houve casos que a citologia de repetição demonstrou ausência de anormalidades. Inicialmente foram observados um pequeno aumento da relação núcleo/citoplasmática, cromatina levemente grosseira e ceratinização citoplasmática. A citologia de retorno demonstrou células escamosas intermediárias normais, livres de atipias (FIGURA 5). Estas ASCUS provavelmente foram originadas de um processo reativo. Nos três casos anteriores, as ASCUS poderiam ser indicadas como possivelmente neoplásicas, não descartando lesão de alto grau apenas nos dois últimos casos.

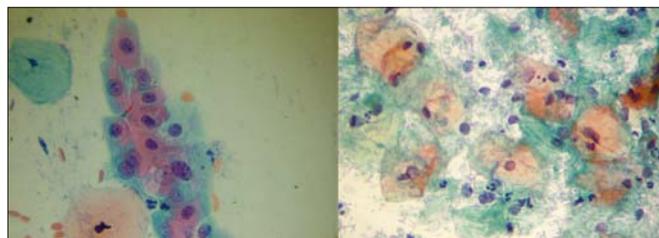


FIGURA 5 – Presença de normalidade após diagnóstico de ASCUS.

Os casos acima citados enfatizam a importância de citar as subcategorias das ASCUS, principalmente para ajudar a definir uma melhor conduta clínica diante de tais diagnósticos. Morin *et al.* (2000) fizeram associações de critérios citomorfológicos para avaliar se algumas características podem prever uma possível lesão intraepitelial. Concluíram que halo perinuclear e atipia nuclear moderada foram dois critérios que favoreciam NIC I na avaliação da biópsia correspondente. A presença de espaço claro perinuclear, hiper cromasia, anisocariose moderada e aumento do volume nuclear favoreciam o diagnóstico NIC II ou III na biópsia. A correlação cito-histológica das ASCUS foi investigada por Collins e colaboradores (1996), em Boston, pela comparação dos achados histológicos de material obtido do colo uterino, através de biópsia orientada pela colposcopia ou

curetagem endocervical de 304 mulheres apresentando ASCUS na citologia cérvico-vaginal. Considerando as ASCUS como um todo, os autores observaram 21,4% de NIC I e 8,8% de NIC II e NIC III. Os casos diagnosticados como ASCUS favorecendo alteração reativa apresentam proporção menor (10%) de lesão pré-neoplásica à histologia do que os casos de ASCUS favorecendo lesão intraepitelial (36%). Diante dos resultados, os autores enfatizam a importância de qualificar, quando possível, as atipias escamosas em ASCUS favorecendo processo reativo ou favorecendo lesão escamosa.

Muitas são as opiniões em relação às condutas clínicas preconizadas diante de alguma alteração intraepitelial escamosa. No trabalho de avaliação dos métodos empregados no Programa Nacional de Combate ao Câncer de Colo Uterino do Ministério da Saúde, Roberto Neto *et al.* (2001) avaliaram a citologia, a colposcopia e a histologia no rastreamento do câncer cervical. Concluíram que a colposcopia é um procedimento importante e indispensável para nortear as condutas terapêuticas frente a um resultado citológico alterado. E acreditam que esses exames sejam perfeitamente adequados à realidade brasileira, tanto pela sensibilidade e especificidade, quanto pelo custo.

Tuon *et al.* (2002) avaliaram a sensibilidade e especificidade dos exames citopatológico e colposcópico em relação ao exame histológico. Concluíram que a associação do método colposcópico ao citológico é eficaz na detecção das alterações neoplásicas do colo uterino, sendo a correlação citocolpo-histológica de fundamental importância na identificação das categorias de maior dificuldade diagnóstica, como nas lesões de baixo grau.

Pedrosa (2003) observou que no grupo de mulheres em que se realizou somente o controle citológico, foi identificado um percentual de 16,7% de alterações intraepiteliais, valor muito inferior ao detectado através da avaliação colposcópica (44,9%). Nota-se uma menor sensibilidade para o diagnóstico de lesões no seguimento citológico do que na avaliação colposcópica. Deve-se considerar que a conduta convencional de seguimento é baseada na realização de uma série de citologias repetidas e, não somente, na sensibilidade de uma única avaliação.

A utilização de testes de biologia molecular para a detecção do HPV vem sendo estudada como técnica adjuvante à colpocitologia na identificação de mulheres com maior risco de desenvolver lesão intraepitelial e câncer cervical. Em mulheres com ASCUS e LSIL, o papel do teste para HPV vem ganhando relevância, sobretudo após a divulgação dos resultados do ALTS, o estudo clínico dedicado à avaliação de estratégias de conduta clínica para mulheres com anormalidades citológicas leves (SANTOS *et al.*, 2004). Este recomendou a detecção dos subtipos de alto risco oncogênico do HPV para diferenciar as mulheres com maior probabilidade de apresentar alterações de NIC II ou NIC III à histologia (SOLOMON *et al.*, 2001; SHERMAN *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; SOLOMON e NAYAR, 2005).

Tena *et al.* (2005) falam que a associação da biologia molecular para detectar HPV de alto risco com a colpocitologia tem como objetivo evitar a prática de colposcopias desnecessárias, diminuir o número de visitas ao ginecologista e aumentar o tempo para que a paciente volte à unidade de saúde para fazer controle através da citopatologia. Assim como neste trabalho, Schlecht *et al.* (2003) acreditam que deve ser feito o teste para HPV e, em caso de ser de alto risco, encaminhar a paciente para colposcopia e eventual biópsia. A nossa realidade mostra que a detecção do HPV não se encontra disponível nas unidades de referência do Programa

de Controle do Câncer de Colo de Útero, inexistindo informações acerca do uso desta tecnologia na triagem das mulheres com probabilidade aumentada de desenvolver neoplasia cervical em nosso meio (SOLOMON e NAYAR, 2005). A idade média apresentada pelas pacientes desse estudo foi 47 anos, havendo predomínio de diagnósticos de ASCUS entre 21 a 30 anos. Após a citologia de repetição, observou-se que houve predomínio de LSIL em pacientes com idade inferior a 30 anos e HSIL em pacientes com 31 a 40 anos.

A literatura, de uma forma geral, demonstra menor incidência de alterações escamosas em mulheres com idade acima de 35 anos, pois parece existir maior resistência ao HPV ou aquisição de algum tipo de imunidade. Entre as mulheres na pós-menopausa, o percentual de neoplasia cervical observada após o resultado de ASCUS é pequeno, pois as modificações causadas por atrofia são, muitas vezes, classificadas como atipias indeterminadas (PEDROSA, 2003).

Em um trabalho realizado por Kobelin e colaboradores (1998), citado por Pedrosa (2003), foi concluído que a idade era o preditor mais importante para o diagnóstico histológico de NIC II ou NIC III em mulheres com citologia classificadas como ASCUS ou LSIL. A probabilidade de identificar estas alterações foi 2,9 vezes maior entre aquelas com idade igual ou superior a 35 anos.

Lousuebsakul e colaboradores (2000) descreveram que a proporção dos diagnósticos histológicos varia de acordo com a idade entre as mulheres que apresentam citologia com ASCUS, sendo que, 63,7% das NIC foram detectadas em mulheres com idade inferior a 25 anos, em um estudo cuja média etária foi de 38 anos.

Assim como em outros trabalhos, Roberto Neto *et al.* (2001) citam que o rastreamento deve ser mais freqüente em um grupo de mulheres jovens, em função do aumento na incidência de lesões de alto grau entre as pacientes com 20 a 34 anos de idade.

Conforme Tabela 5, a maior porcentagem das pacientes que realizaram a segunda citologia gastou de 04 a 06 meses para retornar. Mesmo que a porcentagem de retorno aumente à medida que o tempo passa, a maior parte das mulheres mostra que o protocolo do Ministério da Saúde está sendo seguido em algumas unidades de saúde no caso do diagnóstico de ASCUS.

CONCLUSÃO

A utilização e a interpretação das atipias escamosas de significado indeterminado se mostraram bastante diversificadas entre os autores citados. Os parâmetros subjetividade e reprodutibilidade são polêmicos quando se diz respeito às ASCUS, assim como a baixa relação cito-histológica.

Para diminuir os fatores que geram discordâncias, deve-se garantir a acuidade diagnóstica do teste de Papanicolaou com atividades de controle de qualidade, permitindo êxito na detecção precoce e no tratamento das lesões cervicais. A melhor cobertura desse exame entre mulheres em cada faixa etária (principalmente a de maior risco do ponto de vista epidemiológico), a periodicidade adequada na realização do exame citopatológico e o adequado seguimento terapêutico são atitudes que trazem bons resultados aos programas de prevenção do câncer de colo uterino.

Os resultados obtidos com a pesquisa dos dados no laboratório IPD se mostraram condizentes com os trabalhos citados. Seria interessante avaliar o perfil da região sobre diversos outros aspectos com a finalidade de obter mais parâmetros de comparação.

Quanto à melhor conduta a ser utilizada no seguimento à paciente, deve-se considerar quais procedimentos estão disponíveis e, dentre eles, deve ser usado o que oferece maior segurança de diagnóstico em relação à gravidade da lesão. As subcategorias das ASCUS se mostraram estatisticamente importantes ao predizer uma possível lesão escamosa em diversos trabalhos analisados.

A captura híbrida para HPV é considerada o teste de maior sensibilidade para detectar uma lesão cervical, sobretudo nos casos de difícil diagnóstico. Seria o seguimento de escolha se o seu custo não o impedisse de ser usado pelos programas de prevenção. Quando a atipia escamosa é classificada como possivelmente não neoplásica, ainda é de rotina realizar somente a citologia de repetição; a sensibilidade seria aumentada se fosse associada à colposcopia, reduzindo a chance de aparecer uma lesão mais grave posteriormente. Se o resultado for não se pode afastar lesão de alto grau, o recomendado é fazer uma biópsia colposcopicamente dirigida. Em todos os casos devem ser realizadas as citologias de repetição no sentido de prevenir recidivas ou o aparecimento de novas lesões.

Antes de discutir os diversos temas relacionados à colpocitologia, deve-se dar valor ao bem estar da paciente, garantindo que o sentido da prevenção do câncer do colo uterino atinja todas as mulheres que se enquadram aos programas de rastreamento.

REFERÊNCIAS

- APGAR, B. ZOSCHNICK, L. The 2001 Bethesda System Terminology. *American Family Physician*, Michigan, v.68, n.10, p. 1992-1998, nov. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Custo-efetividade no rastreamento do câncer cérvico-uterino no Brasil: um estudo exploratório. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 60p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à saúde. Instituto Nacional do Câncer. Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais e Condutas Clínicas Preconizadas. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 21p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 94p.
- COLLINS, L.C.; WANG, H.H.; ABU-JAWDEH, G.M. Qualifiers of Atypical squamous Cells of Undetermined Significance Help in Patient Management. *Modern Pathology*, Boston, v.9, n.6, p. 677-681, fev. 1996.
- ELEUTÉRIO JUNIOR, J.; CAVALCANTE, D.I.M.; DIAS, M.T.M.P.; ALVES, R.M.; QUEIROZ, G.C.; PROENÇA, A.R. Atipias de células Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS) – Estudo de 208 casos. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, Rio de Janeiro, v.22, n.31, p.135-139, abr. 2000.
- KOBELIN, M.H.; C.G.; BURKE, L.; LAVIN, P.; NILOFF, J.M.; KIM, Y.B. Incidence and predictors of cervical dysplasia in patients with minimally abnormal Papanicolaou smears. *Obstetrics and Gynecology*, v. 92, p.356-359, 1998 apud PEDROSA, M. L. Perfil Epidemiológico de Mulheres Portadoras de Atipias Escamosas de Significado Indeterminado Atendidas pelo Programa de Controle do Câncer de Colo Uterino no Município do Rio de Janeiro. 2003. 109f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- LIMA, D.N.O.; CAMARA, S.; MATTOS, M.G.G.; RAMALHO, R. Diagnóstico citológico de ASCUS: sua importância na conduta clínica. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v.38, n.1, p.45-49, jan. 2002.
- LOUSUEBSAKUL, V.; KNUTSEN, S.M.F.; GRAM, I.T.; AKIN, M.R.M. Clinical impact of atypical squamous cells of undetermined significance. A cytohistologic comparison. *Acta Cytol.*, California, v.44, n.1, p.23-30, jan.-fev.2000.
- MORIN, C.; BAIRATI, I.; BOUCHARD, C.; FORTIER, M.; ROY, M.; MOORE, L.; MEISELS, A. Cytologic predictors of cervical intraepithelial neoplasia in woman with an ASCUS Pap smear. *Acta Cytol*, Quebec, v.44, n.4, p. 576-586, jul./aug. 2000.
- MORIN, C.; BAIRATI, I.; BOUCHARD, C.; FORTIER, M.; ROY, M.; MOORE, L.; MEISELS, A. Managing atypical squamous cells of undetermined significance in Papanicolaou smears. *J. Reprod. Med.*, Quebec, v.46, n.9, p. 799-805, sep. 2001. Abstract.
- PEDROSA, M. L. Perfil Epidemiológico de Mulheres Portadoras de Atipias Escamosas de Significado Indeterminado Atendidas pelo Programa de Controle do Câncer de Colo Uterino no Município do Rio de Janeiro. 2003. 109f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- PINHO, A.A.; MATTOS, M.C.F.I. Validade da citologia cervicovaginal na de-

- tecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, v.38, n.3, p.225-231, jul. 2002.
- PINTO, A.P.; COLLAÇO, L.M.; MAIA, L.R.; SHIOKAWA, L.; TAVARES, T.G.; BEZERRA, K.; GONÇALVES, R.F. Investigaçao do valor da categoria diagnóstica de células epiteliais atípicas, de significação indeterminado, e origem indefinida da nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, Rio de Janeiro, v.42, n.2, p. 133-141, abr. 2006.
- PIRES, C.L.; ROCHA, D.B.; PEREIRA, E.M.A.; KÜLL, L.M.S.; et al. *Viva Mulher: Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama*. Belo Horizonte, 2006. 76p. Trabalho não publicado.
- ROBERTO NETO, A.; FOCCHI, J.C.L.R.; BARACAT, E.C. Avaliação dos Métodos Empregados no Programa Nacional de Combate ao Câncer do colo Uterino do Ministério da Saúde. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, Rio de Janeiro, v.23, n.4, p.209-215, mai. 2001.
- SANTOS, A.L.F.; DERCHAIN, S.F.M.; MARTINS, M.R.; SARIAN, L.O.Z.; MARTINEZ, E.Z.; SYRJÄNEN, K.J. Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. *São Paulo Medical Journal*, São Paulo, v.121, n.6, 2003.
- SANTOS, A.L.F.; DERCHAIN, S.F.M.; SARIAN, L.O.; CAMPOS, E.A.; SANTOS, M.R.; FONSECHI-CARVASAN, G.A. Resultados histológicos e detecção do HPV em mulheres com células escamosas atípicas de significado indeterminado e lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau na colposcopia oncológica. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, Rio de Janeiro, v.26, n.6, p. 457-462, jul. 2004.
- SCHLECHT, N.F.; PLATT, R.W.; DUARTE-FRANCO, E.; COSTA, M.C.; SOBRINHO, J.P.; PRADO, J.C.M.; FERENCZY, A.; ROHAN, T.E.; VILLA, L.L.; FRANCO, E.L. Human Papillomavirus Infection and Time to Progression and Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, v.95, n.17, p. 1336-1343, sep. 2003.
- SEBASTIAO, A.P.M.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D.L.H.; GARCIA, M.J.; CARVALHO, N.S.; COLLAÇO, L.M.; BLEGGI-TORRES, L.F. Estudo das atipias indeterminadas em relação à prevalência e ao percentual de discordância nos casos do Programa de Prevenção do Câncer Uterino do Paraná. *J. Bras. Patol. Med Lab*, Rio de Janeiro, v.40, n.6, p. 431-438, dez. 2004.
- SHERMAN, M.E.; WANG, S.S.; TARONE, R.; RICH, L.; SCHIFFMAN, M. Histopathologic Extent of Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 Lesions in the Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v.12, p. 372-379, apr. 2003.
- SHERMAN, M.E.; SCHIFFMAN, M.; COX, J.T. Effects of Age and Human Papilloma Viral Load on Colposcopy Triage: Data from the Randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance / Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *Journal of the National Cancer Institute*, Oxford, v. 94, n. 2, jan. 2002.
- SODHANI, P.; GUPTA, S.; SEHGAL, A.; SINGH, V.; KHAN, I.V.; MITRA, A.B. Atypical Squamous cells of Undetermined Significance: Is it Worthwhile to Quality them Further? *Indian Journal of Cancer*, New Delhi, v.40, n.1, p.23-26, jan./mar. 2003.
- SOLOMON, D.; NAYAR, R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal: definições, critérios e notas explicativas. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 192p.
- SOLOMON, D.; SCHIFFMAN, M.; TARONE, R. Comparison of Three Management Strategies for Patients with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results From a Randomized Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, Oxford, v.93, n. 4, p. 293-299, feb. 2001.
- SOUZA, J.H.K.; KALIL, I.V.; LEITE, J.M.; GEBER, S. Avaliação de lâminas de colpocitologia oncológica previamente diagnosticadas como ASCUS: comparação interensaio e interobservadores. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, Rio de Janeiro, v.26, n.3, p.233-240, abr. 2004.
- TENA, D.; GANIDO, N.; MENENDEZ, J.M.; DELGADO, J.J.; ROMANYK, J.; GONZALEZ, M.R.; ZAPICO, A.; BELTRAN, M. Utilidad de la detección del virus del papiloma humano de alto riesgo mediante Hybrid Capture II em mujeres com citologias anormales del cuello uterino. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Madrid*, v.23, n.08, p.474-478, oct. 2005.
- TUON, F.F.B.; BITTENCOURT, M.S.; PANICHI, M.A.; PINTO, A.P. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos exames citopatológico e colposcópico em relação ao exame histológico na identificação de lesões intra-epiteliais cervicais. *Rev. Assoc. Med. Bras*, São Paulo, v.48, n.2, p. 140-144, abr./jun. 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra Karen Shelen Bueno
Rua Santa Rita, 175 Catanduvas
Cep. 37006-200 Varginha - MG

Análise do retinol sérico em puérperas atendidas em uma maternidade pública de Natal/RN

Analysis of serum retinol in puerperal women at a public maternity in Natal, RN

Fernanda Barros Soares¹, Karla Danielly da Silva Ribeiro², Roberto Dimenstein^{3*}

RESUMO - A vitamina A é um micronutriente essencial para a saúde e está envolvida em processos biológicos, tais como a visão, o crescimento e a diferenciação celular. A hipovitaminose A pode causar repercussões sistêmicas que afetam estruturas epiteliais de diferentes órgãos, além dos olhos. A identificação precoce dos indivíduos em risco de desenvolver a deficiência de vitamina A deve ser uma preocupação dos profissionais de saúde, na tentativa de direcionamento dos programas governamentais de intervenção voltados para os grupos mais vulneráveis. O objetivo deste trabalho foi verificar o nível de retinol no soro de nutrizes atendidas na MEJC, Natal/RN. O sangue foi extraído segundo Nierenberg e Nann (1992) e analisados por CLAE. Dentre as nutrizes estudadas, a média da concentração de retinol no sangue foi de 38,4±11,0µg/dL, sendo que 7,5% corresponderam a uma concentração considerada marginal (10 – 20µg/dL), 82,5% satisfatório (20 – 50µg/dL), e 10% excessivo (50 – 100µg/dL). A WHO (1994) considera um quadro de indicativo de deficiência uma prevalência maior ou igual a 15% de concentração sérica de retinol menor que 20µg/dL, portanto as concentrações encontradas por este trabalho podem ser consideradas adequadas demonstrando uma aparente normalidade da média de retinol do soro.

PALAVRAS-CHAVE - Retinol sérico, Hipovitaminose A, Puérperas.

SUMMARY - Vitamin A is an essential micronutrient for biological processes such as vision and cellular growth and differentiation. The hypovitaminosis A affect the epithelial structures of various other organs besides the eyes. The early detection of individuals at risk for Vitamin A deficiency should be the concern of health professionals and direct governmental intervention programs to focus on the vulnerable groups. The objective of this study is to verify the retinol serum levels of nursing parturients at the MEJC, Natal, RN. Blood samples, extracted according to Nierenberg (1992), were analyzed by CLAE. The mean blood level of serum retinol concentration for the women studied was 38,4±11,0µg/dL; 7,5% of the concentrations were considered marginal (10 – 20µg/dL), 82,5% satisfactory (20 – 50µg/dL), and 10% excessive (50 – 100µg/dL). The WHO (1994) considers indicative of deficiency the prevalence higher or equal to 15% of serum retinol concentrations below 20µg/dL. The concentrations in this study, therefore, can be considered adequate, demonstrating an apparent normal mean for the serum retinol levels.

KEYWORDS - Serum retinol, Hypovitaminosis A, Puerperal women

INTRODUÇÃO

Vitamina A é o termo genérico que designa qualquer composto que possui atividade biológica de retinol, enquanto o termo "retinóides" inclui formas de vitamina A e os muitos análogos sintéticos de retinol, com ou sem atividade biológica (SHILS *et al.*, 2002). É um micronutriente essencial para a saúde e está envolvido em processos biologicamente importantes como o crescimento, o desenvolvimento fetal e a integridade do sistema imunológico (STOLTZFUS e UNDERWOOD, 1995).

A Hipovitaminose A é a deficiência de vitamina A que pode ser diagnosticada através do consumo dietético, indicadores bioquímicos ou clínicos, com repercussões sistêmicas que, dependendo do nível da deficiência, podem afetar estruturas epiteliais de diferentes órgãos, como também alterar as membranas de mucosas que revestem o nariz, a garganta, a traquéia e o trato gastrointestinal, além dos olhos, onde os efeitos são mais evidentes (GERMANO e CANNIATTI, 2004).

A necessidade de combater a deficiência de vitamina A ganhou uma nova dimensão nos últimos anos, ainda assim, os dados disponíveis sobre a prevalência da deficiência desta vitamina na região nordeste são esparsos (MARTINS *et al.*, 2004).

A dosagem de retinol sérico tem sido um dos testes bioquímicos mais utilizados no diagnóstico do estado nutricional de vitamina A (DINIZ e SANTOS, 2000), porém possui uma baixa sensibilidade nos casos de depleção moderada das

reservas hepáticas de vitamina A e processos infecciosos, mas tem-se revelado fidedigna em situações nas quais as concentrações de vitamina A estão muito baixas ou em excesso (COZZOLINO, 2005).

De acordo com Olson (1990), os níveis séricos de retinol podem ser classificados em: deficiente (< 10µg/dL); marginal (10 – 20µg/dL); satisfatório (20 – 50µg/dL); excessivo (50 – 100µg/dL) e tóxico (> 100µg/dL).

A identificação precoce dos indivíduos em risco de desenvolver a hipovitaminose A deve ser uma preocupação dos profissionais de saúde, na tentativa de direcionamento dos programas governamentais de intervenção voltadas para os grupos mais vulneráveis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o nível sérico de vitamina A de nutrizes atendidas na Maternidade Escola Januário Cicco, Natal/RN.

METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Participaram do estudo 40 nutrizes saudáveis atendidas na Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC), em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, no período de julho a dezembro de 2006. As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa das nutrizes, até 24 horas após o parto, no turno matutino, em um único momento, até atingir um volume de 5,0 ml. As amostras foram coletadas em tubo de polipropileno en-

Recebido em 23/02/2007

Aprovado em 15/03/2008

¹Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

²Graduanda do curso de Nutrição da Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brasil.

³Mestranda do curso de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Natal (RN), Brasil.

*Professor adjunto IV do Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brasil.

Os dados desse trabalho fazem parte do projeto de dissertação de mestrado de Karla Danielly da Silva Ribeiro, intitulado: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA DE VITAMINA A NO PÓS-PARTO IMEDIATO", do programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

volto por papel alumínio, para impedir a degradação da vitamina A pela ação da luz. Em seguida foram transportadas ao laboratório de Bioquímica da Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, e conservadas a 20°C até o momento das análises.

O sangue foi extraído segundo Nierenberg e Nann (1992), modificado de acordo com as condições laboratoriais, e o extrato hexânico foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio em banho-maria a 37°C. As amostras foram ressuspensas em 1,0 ml de etanol, em grau de pureza para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e agitados por um minuto. A concentração de retinol das amostras foi determinada por CLAE em Cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e Integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6 mm x 25 cm. O cromatograma evoluiu nas seguintes condições: fase móvel metanol 100% e fluxo 1,0 ml/min. A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do respectivo padrão. A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico (e 1%, 1 cm = 1780) em etanol absoluto e comprimento de onda de 325 nm (NIERENBERG e NANN, 1992).

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e para testar as diferenças entre as médias foi utilizado o Teste 't' de Student, considerando um nível de significância menor que 5% (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média de retinol encontrada no sangue das nutrizes foi de 35,8±10,4µg/dL (Gráfico 1), sendo que 7,5% corresponderam a uma concentração considerada marginal (10 – 20µg/dL), 82,5% satisfatório (20 – 50µg/dL), enquanto que 10% excessivo (50 – 100µg/dL). Entre os resultados não foi encontrada concentração considerada deficiente (< 10µg/dL) ou tóxica (> 100µg/dL) (Tabela 1).

Tanto a ingestão deficiente quanto excessiva de vitamina A estão associadas com defeitos congênitos (cérebro, olho, ouvido, aparelho geniturinário, coração e sistema vascular), dependendo de qual sistema está em fase de diferenciação no momento da exposição (BEITUNE *et al.*, 2003). A dosagem hepática de vitamina A é a melhor forma de avaliar o estado nutricional deste nutriente, pois ela é a determinação direta das reservas de vitamina A. Valores de 20µg/g de fígado indicam uma satisfatória reserva de vitamina A capaz de suprir todas as funções orgânicas desta vitamina e manter os níveis séricos adequados por pelo menos 3 meses em condições de baixa ingestão de vitamina A. Entretanto, a biópsia hepática não é um procedimento viável para ser implantado como rotina no uso de estudos populacionais. A dosagem de retinol sérico é uma forma prática efetiva de mensurar o estado nutricional deste nutriente, mesmo que o nível sérico não reflita a ingestão recente de vitamina A, pois somente em casos de deficiência ou excesso ocorrem alterações nos níveis plasmáticos. Porém, níveis de 30 a 50µg/dL de soro indicam reservas hepáticas adequadas de vitamina A, enquanto que valores abaixo podem indicar depleção das reservas hepáticas (SAUBERLICH *et al.*, 1984).

Ramalho *et al.* (2006), apesar de não utilizar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, encontraram uma concen-

tração média de retinol sérico de 1,60µmol/l (46µg/dL) e um percentual de 22% de nutrizes com indicativo de hipovitaminose A. Outros estudos do mesmo autor (RAMALHO *et al.*, 1999; RAMALHO *et al.*, 2001; RAMALHO *et al.*, 2002) confirmam a alta ocorrência da carência de vitamina A em puérperas. Rice *et al.* (2000) encontraram que 13% das puérperas de Bangladesh estavam com deficiência de vitamina A, quando utilizado o ponto de corte para retinol sérico de <1,05µmol/l (30µg/dL).

Com o objetivo de avaliar os níveis de retinol em mulheres que amamentam e mulheres que não amamentam, Pee *et al.* (1997) encontraram que no início de seu estudo 41% das mulheres apresentaram retinol sérico <0,70µmol/l (<20µg/dL), demonstrando um indicativo de hipovitaminose A.

A carência de vitamina A materna também altera a concentração deste nutriente no colostro e leite materno, que são considerados fontes concentradas de vitamina A de alta biodisponibilidade (ACCIOLY *et al.*, 2005). O conhecimento deste fato é de extrema relevância, dado que os níveis séricos de retinol dos lactentes guardam relação direta com sua dieta (ORTEGA *et al.*, 1997) e, inclusive, grande contingente de crianças dependem quase que exclusivamente do aleitamento materno nos primeiros seis meses de vida (STOLTZUS e UNDERWOOD, 1995).

De Pee e Dary (2002), baseados na recomendação do IVACG – International Vitamina Consultative Group e sugestão da World Health Organization (1994), passaram a considerar como indicativo de deficiência a prevalência maior ou igual a 15% de concentração sérica de retinol menor que 20µg/dL, além de recomendar que as análises deveriam ser realizadas pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Segundo a classificação utilizada neste estudo, verificou-se que a maior parcela da população tinha uma concentração de retinol satisfatória (20 – 50µg/dL) e apenas 7,5% das parturientes possuíam níveis marginais de retinol (10 – 20µg/dL). Considerando o indicativo de deficiência sugerido pela WHO (1994), pode-se afirmar que o grupo estudado possui níveis adequados de vitamina A.

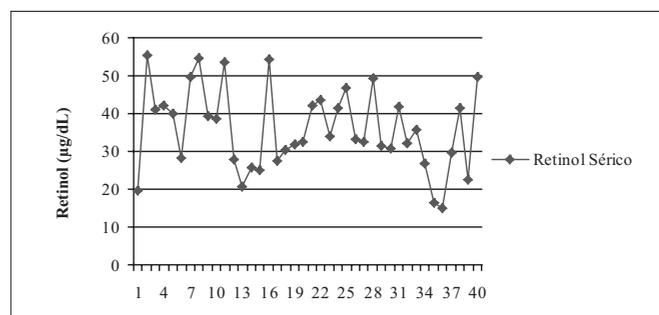


Gráfico 1: Distribuição da concentração de retinol no soro de lactentes (n=40) atendidas na Maternidade Escola Januário Cicco, Natal/RN.

TABELA I
Classificação de lactentes atendidas na Maternidade Escola Januário Cicco, Natal/RN, segundo a concentração de retinol sérico.

| CLASSIFICAÇÃO | Valor absoluto | Valor relativo (%) |
|-----------------------------|----------------|--------------------|
| Deficiente (< 10µg/dL) | 0 | 0 |
| Marginal (10 – 20µg/dL) | 3 | 7,5 |
| Satisfatório (20 – 50µg/dL) | 33 | 82,5 |
| Excessivo (50 – 100µg/dL) | 4 | 10,0 |
| Tóxico (> 100µg/dL) | 0 | 0 |
| TOTAL | 40 | 100 |

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Maternidade Escola Januário Cicco da UFRN, pela permissão para a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E. M. A. Nutrição em Obstetrícia e Pediatria. 3 Reimpressão Revisada e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2005.
- BEITUNE, P. EL; DUARTE, G.; QUINTANA, S. M.; FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; VANNUCCHI H. Hipovitaminose A: Cofator deletério para o homem. Rev Medic Ribeirão Preto, 36: 5-15 (2003).
- COZZOLINO, S. M. F. e Colaboradores. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1 ed. São Paulo: Editora Manole, 2005.
- DINIZ, A. S.; SANTOS, L. M. P. Hipovitaminose A e xeroftalmia. J pediatr. 76 (Supl. 3): S311-S322 (2000).
- GERMANO, R. M. A.; CANNIATTI, B. S. G. Vitamina A: importância na nutrição humana. J. Brazilian Soc. Food Nutr. 27: 55-68 (2004).
- MARTINS, M. C.; SANTOS, L. M. P.; ASSIS, A. M. O. Prevalência da hipovitaminose A em pré-escolares no estado de Sergipe, 1998. Rev Saúde Pública. 38(4): 537-542 (2004).
- NIERENBERG, D. W.; NANN, S. L. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. Am J Clin Nutr. 56: 417-26. (1992)
- OLSON, J. A. Vitamin A. In: Present Knowledge in Nutrition. 6th ed. (International life science institute nutritional foundation). 1990. p. 96-107.
- ORTEGA, R. M.; ANDRES, P.; MARTINEZ, R. M.; LOPEZ-SOBALER, A. M. Vitamin A status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: Influence on concentrations of vitamin A in breast milk. Am J Clin Nutr. 66(3):564-568 (1997).
- PEE, S. DE; YUNIAR, Y.; WEST, C. E.; MUHILAL. Evaluation of biochemical indicators of vitamin A status in breast-feeding and non-breast-feeding Indonesian women. Am J Clin Nutr. 66:160-167 (1997).
- PEE, S. DE; DARY, O. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: Serum re-

tinol and serum retinol binding protein. J Nutr., 132 (9): 2895S-2901S (2002). Supplement.

- RAMALHO, R. A.; ANJOS, L. A.; FLORES, H. Estado nutricional de vitamina A no binômio mãe/recém-nascido em duas maternidades no Rio de Janeiro, Brasil. Arch Latinoam Nutr. 49: 318-321. (1999).
- RAMALHO, R. A.; SAUNDERS, C.; PAIVA, F.; ACCIOLY, E.; CARDOSO, L. O. NATALIZI, D. Estado de vitamina A de puérperas e recém-nascidos e estado antropométrico materno. Rev Cienc Med PUCCAMP. 10: 5-10 (2001).
- RAMALHO, R. A.; FLORES, H.; SAUNDERS, C. Hipovitaminose A: Um problema de saúde pública no Brasil. Rev Panam Salud Pública. 12: 117-122 (2002).
- RAMALHO, R. A.; FLORES, H.; ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C. Associação entre deficiência de vitamina A e a situação sociodemográfica de mães e recém-nascidos. Rev Assoc Méd Bras. 52(3): 170-175 (2006).
- RICE, A. L.; STOLTZFUS, R. J.; FRANCISCO, A. DE; KJOLHEDE, C. L. Evaluation of serum retinol, the modified-relative-dose-response ratio, and breast-milk vitamin A as indicators of response to postpartum maternal vitamin A supplementation. Am J Clin Nutr. 71:799-806 (2000).
- SAUBERLICH, H. E.; SKALA, J. H.; DOWDY, R. P. Vitamins. In: Laboratory tests for the assessment of nutritional status. 7 ed. Florida: CRC Press, Boca-Raton, 1984; 4-13.
- SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. São Paulo: Editora Manole, 2002; 1: 325-350.
- STOLTZUS, R. J.; UNDERWOOD, B. A. Breastmilk vitamin A as an indicator to assess vitamin A status of women and infants. Bulletin of the world health organization, v. 5, n 73, 1995, pp. 703-711.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. United nations children's fund. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva: Switzerland, WHO, 1994.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Roberto Dimenstein
Avenida Praia de Genipabu 2100, apto. 1402, Noronha, Ponta Negra
CEP 59094-010, Natal, RN, Brasil.
Telefone: 0xx84-3219-3559;
E-mail: rdimen@uol.com.br



Sociedade
Brasileira de
Análises
Clínicas

SBAC

A SBAC facilita para você ir
ao maior congresso mundial
de Análises Clínicas.

Promoção de Aniversário

Inscrições a R\$ 400,00 até 31 de março.

Corra e aproveite!

Maiores informações: 21 2187-0800 - geral@sbac.org.br - www.sbac.org.br

IFCC WorldLab 2008

20th International Congress of Clinical Chemistry
35^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica



28 de setembro a 02 de outubro 2008
Fortaleza - CE - Brasil

Níveis de colesterol total versus fatores regionais de três cidades do Paraná*

Total cholesterol level versus regional factors on three cities of Paraná state

Dalton S. Melo; Edson C. Fréz; Maristeli C. R. Fréz; Germano A. Pascotto; Arthur E. Svidzinski; Terezinha Inez E. Svidzinski & Márcia R. Batista.

RESUMO - A hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares. Avaliamos os níveis de colesterol total em três cidades do Paraná Douradina, Cianorte e Guaíra. Douradina apresenta de um modo geral característica mais voltada para o cotidiano rural. Realidade diferente foi constatada em Cianorte, considerada hoje um pólo industrial. Guaíra é uma região preparada para o turismo e com grande atividade comercial. Foram analisadas amostras de 600 indivíduos, sendo 200 de cada localidade, distribuídos previamente em diferentes faixas etárias e gênero. Em Douradina observaram-se as menores taxas de colesterol ($186,9 \pm 2,9$ mg/dl), seguido por Cianorte ($203,1 \pm 1,4$ mg/dl) e Guaíra ($219,7 \pm 3,2$ mg/dl). Concluiu-se que houve uma variação de colesterol total nas diferentes cidades, mostrando que hábitos regionais influenciam nos níveis de colesterol total sérico.

PALAVRAS-CHAVE - colesterol, hipercolesterolemia, fatores de risco, estilo de vida.

SUMMARY - Hypercholesterolemia is the principal risk factor of cardiovascular disease. This study evaluated the total cholesterol level on three cities: Douradina, Cianorte and Guaíra - Paraná, Brazil. Douradina represents a rural city, different of Cianorte that is a great industrial city, and Guaíra is a trade center and turistic city. We assessed 600 samples of individuals, being 200 in each city, prior distributed in different age and gender. In Douradina, we observed the lower rates of cholesterol ($186,9 \pm 2,9$ mg/dl), followed for Cianorte ($203,1 \pm 1,4$ mg/dl) and Guaíra ($219,7 \pm 3,2$ mg/dl). We concluded that there was a variable rate on the total cholesterol level in different cities, showing that regional factors influence in the total cholesterol levels.

KEYWORDS - cholesterol, hypercholesterolemia, factors risk, life styles.

INTRODUÇÃO

Estudos têm mostrado que dietas ricas em gorduras estão correlacionadas com altas concentrações de colesterol no plasma e com maior incidência de doenças cardiovasculares. Analisando a população em geral verifica-se que o aumento da mortalidade se dá em função dos chamados "fatores de risco coronariano", dentre os quais destacam-se: hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão arterial, alcoolismo, sedentarismo, obesidade, gênero, faixa etária e estresse (Motta, 2003, Kim, 1997). Estudos de Chambers *et al.*, (2002) e Daviglus *et al.*, (2003) sugerem que os fatores de risco coronariano estão diretamente associado com a má qualidade de vida. Os benefícios de uma dieta adequada e a prática regular de exercícios também colaboram com a redução desses fatores (Lalonde, 2002). Segundo Schroder *et al.*, (2004) existe uma relação entre status sócio - econômico com fatores de risco coronariano, e os valores culturais correspondem a um fator muito importante que contribui para aumentar esse risco. Variáveis como idade, sexo, hipertensão, índice de massa corporal, nível educacional, fumo, história familiar de doenças cardiovasculares e história de diabetes foram consideradas estatisticamente significativas quando comparadas com a qualidade de vida, além disso, a diminuição na qualidade de vida pode ser um fator de risco para eventos ou complicações cardiovasculares (Li *et al.*, 2005).

A elevada concentração de colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos no plasma constituem os principais fatores de risco para o aparecimento da aterosclerose (Scanu *et al.*, 1979, Vieira, 1994). Vários estudos têm demonstrado a relação de níveis aumentados do colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade com o risco de desenvolvimento da doença (Gordon *et al.*, 1981, Grundy, 1995). O III Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias estabelece faixas de valores de colesterol total em indivíduos acima de vinte anos de idade, sendo o valor desejável abaixo de 200

mg/dl, valor limítrofe varia entre 200 e 239 mg/dl e alto a partir de 240 mg/dl (12).

Os níveis de colesterol plasmáticos variam conforme a idade e sexo: iniciam sua produção com o nascimento, mostrando leve depressão na adolescência e sofrendo nova elevação na idade adulta (Motta, 2003). As mulheres costumam apresentar menores níveis de colesterol, quando comparados a homens da mesma idade, talvez pelo efeito protetor dos estrógenos. Porém, no período da menopausa podem apresentar níveis maiores de colesterol total do que nas fases anteriores da sua vida (Motta, 2003).

Antecedentes familiares, distúrbios metabólicos ou má orientação dietética podem contribuir para alterações de um ou mais componentes lipídicos do sangue e aumentar o risco de doença coronariana.

Recentemente, vários métodos homogêneos têm sido desenvolvidos por diferentes fabricantes para a dosagem direta do colesterol, na expectativa de que sejam atendidos os critérios do National Cholesterol Education Program (NCEP) (1994) e as necessidades da comunidade médica na prevenção da doença arterial coronariana e do infarto do miocárdio.

O objetivo do presente trabalho foi determinar os níveis séricos de colesterol total em populações de três cidades do interior do Paraná e inferir os dados com fatores regionais, estilo de vida, faixa etária e gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas as determinações de colesterol total em soros de indivíduos atendidos em três Laboratórios de Análises Clínicas que funcionam em três cidades do interior do estado do Paraná, Brasil respectivamente: Laboratório Hemoclínico (Douradina-Pr), Laboratório Cialab (Cianorte-Pr) e Laboratório Biolab (Guaíra-Pr).

Cada laboratório separou uma alíquota de soro dos 200 primeiros pacientes atendidos em dezembro de 2004, com prescrição para dosagem do colesterol total sérico. Previa-

Recebido em 04/05/2006

Aprovado em 09/10/2007

*Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR e Departamento de Análises Clínicas, Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, PR.

mente havia sido feito uma classificação arbitrária conforme o gênero e a faixa etária: 20 a 30 anos, 31 a 40 anos, 41 a 50 anos, 51 a 60 anos e acima de 61 anos de modo a obter uma amostragem de 20 homens e 20 mulheres para cada faixa etária, totalizando 200 pacientes em cada uma das três localidades.

A execução dos exames seguiu a mesma conduta nos três laboratórios que determinaram a dosagem de colesterol total através da metodologia enzimática colorimétrica, empregando os reagentes da marca Labtest. Como critério de coleta foi recomendado aos pacientes um jejum prévio de 12 horas.

As dosagens de colesterol total dos 600 soros provenientes das três localidades foram repetidos pelo mesmo operador. Os resultados analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism® (Graphpad Software, inc.) versão 3.0 empregando teste t de Student e análise de variância (ANOVA) para comparações múltiplas, seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram determinados os valores de colesterol total em soros obtidos de pacientes provenientes de três localidades do Estado do Paraná: Douradina, Cianorte e Guaíra. Foram analisadas as determinações de colesterol total em soros de 200 pacientes de cada localidade e os dados foram agrupados e tomados em conjunto para efeito das análises estatísticas. Os dados gerais por localidade são apresentados na Fig. 1. Em Douradina observaram-se as menores taxas de colesterol total ($186,9 \pm 2,9$ mg/dl) seguido por Cianorte ($203,1 \pm 1,4$ mg/dl) e em Guaíra observaram-se os índices mais elevados desse estudo ($219,7 \pm 3,2$ mg/dl). Houve diferença estatisticamente significativa entre as três cidades independente da combinação: comparando os dados obtidos entre Douradina e Cianorte o valor de p foi $< 0,001$, entre Douradina e Guaíra o valor de p foi $< 0,001$ e entre Cianorte e Guaíra o valor de p foi $\leq 0,001$.

Quanto à distribuição, os níveis de colesterol total também foram diferentes entre as três localidades. A Fig. 2 mostra a distribuição Gaussiana, das 600 dosagens conforme a localidade. A maior variação ocorreu em Douradina de 97,60 a 344,0 mg/dl, distribuição semelhante foi registrada em Guaíra, porém com valores mais elevados (129,8 a 344,9 mg/dl), já entre os residentes de Cianorte apesar dos valores extremos apresentarem boa amplitude, entre 171,2 e 364,7 mg/dl, observou-se que grande parte dos resultados ficou concentrada próximo a 200 mg/dl, mostrando uma tendência atípica de distribuição homogênea.

A distribuição dos valores de colesterol total conforme o gênero e faixa etária dos pacientes são apresentados na tabela 1. Em Douradina a distribuição entre os gêneros foi relativamente semelhante, porém na faixa entre 41 e 50 anos os homens apresentaram níveis significativamente maiores que as mulheres ($p = 0,0268$). Nesta cidade, entre os indivíduos com mais de 50 anos observou-se inversão, as mulheres é que apresentaram níveis mais elevados. Por outro lado em Cianorte os homens apresentaram valores superiores em todas as faixas etárias, sendo que entre 31 e 40 anos e acima de 50 anos essa diferença foi estatisticamente significativa. Em Guaíra, a distribuição dos níveis de colesterol total por gênero também foi equivalente, exceto para a faixa de 31 a 40 anos que nos homens foi mais elevada ($p = 0,0048$).

TABELA I
Valores médios de colesterol total sérico (mg/dl) \pm EPM de 200 indivíduos da cidade de Douradina, Cianorte e Guaíra conforme a faixa etária e gênero.

| | Faixa etária (anos) | Média \pm EPM | | Valor de p |
|-----------|------------------------|--------------------|-------------------|------------|
| | | Homens | Mulheres | |
| Douradina | 20 – 30 | 160.2 \pm 8.06 | 171.5 \pm 4.93 | 0,2391 |
| | 31 – 40 | 173.3 \pm 6.90 | 168.0 \pm 6.47 | 0,5779 |
| | 41 – 50 | 221.7 \pm 12.42* | 187.1 \pm 8.46 | 0,0268 |
| | 51 – 60 | 193.6 \pm 7.69 | 201.3 \pm 8.90* | 0,5193 |
| | >61 | 185.0 \pm 9.05 | 207.3 \pm 9.91 | 0,1052 |
| Cianorte | 20 – 30 | 201.2 \pm 2.18 | 195.8 \pm 2.38 | 0,1031 |
| | 31 – 40 | 201.6 \pm 2.61 * | 192.7 \pm 2.73 | 0,0243 |
| | 41 – 50 | 220.4 \pm 9.72 * | 202.3 \pm 3.855 | 0,0927 |
| | 51 – 60 | 210.2 \pm 3.14 | 198.3 \pm 2.86 | 0,0078 |
| | >61 | 210.4 \pm 5.06 | 197.5 \pm 2.69 | 0,0304 |
| Guaíra | 20 – 30 | 195.2 \pm 7.05 | 199.8 \pm 9.01 | 0,6911 |
| | 31 – 40 | 233.8 \pm 9.25 * | 197.1 \pm 8.05 | 0,0048 |
| | 41 – 50 | 220.1 \pm 8.39 | 220.6 \pm 8.49 | 0,9655 |
| | 51 – 60 | 222.8 \pm 10.36 | 248.9 \pm 12.78 | 0,1206 |
| | >61 | 238.2 \pm 10.45 | 221.0 \pm 9.67 | 0,2363 |

*Estatisticamente diferente.

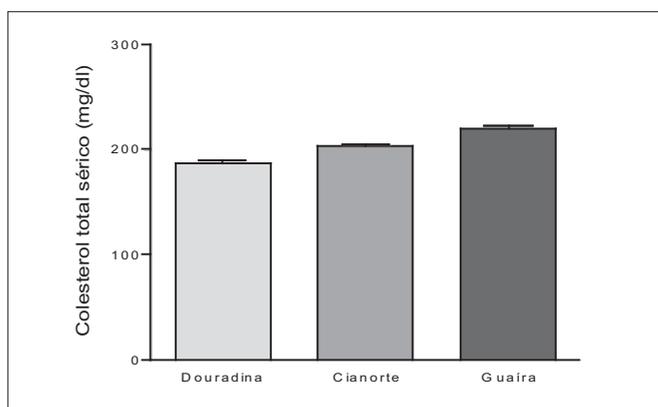


Figura 1 – Valores médios de colesterol total sérico (mg/dl) \pm erro padrão da média (EPM) de 200 indivíduos amostrados em cada uma das três localidades: Douradina ($186,9 \pm 2,9$), Cianorte ($203,1 \pm 1,4$) e Guaíra ($219,7 \pm 3,2$). Os dados obtidos entre Douradina e Cianorte o valor de p foi $< 0,001$, entre Douradina e Guaíra o valor de p foi $< 0,001$ e entre Cianorte e Guaíra o valor de p foi $\leq 0,001$.

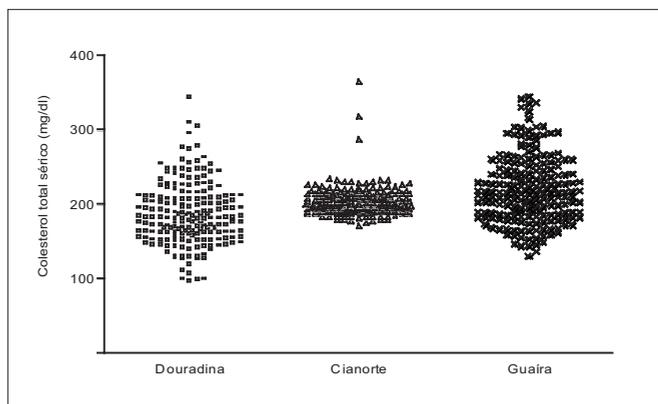


Figura 2 – Distribuição Gaussiana dos valores das 600 determinações de colesterol total nas três localidades do Estado do Paraná estudadas.

DISCUSSÃO

As doenças coronarianas são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade nos dias atuais. A hipercolesterolemia tem sido considerada um dos principais fa-

tores de risco (Lalonde *et al.*, 2002, Schronder, 2004). A dosagem de colesterol total é prática rotineira nos laboratórios clínicos visando, sobretudo prevenir problemas cardiovasculares ou se for o caso, contribuir no tratamento dos pacientes que já apresentaram as diversas morbidades atribuídas ao seu aumento.

Atualmente é grande o investimento em campanhas de conscientização e esclarecimento da população quanto à importância de manter os níveis de colesterol dentro da normalidade, contudo a definição de padrões normais é complicada tendo em vista as importantes variações decorrentes do estilo de vida das diferentes populações.

A faixa etária entre 41 e 50 anos nas três populações estudadas apresentou os valores mais elevados de colesterol o que está de acordo com Motta, (2003). Porém, em Guaíra o pico foi entre os 31 e 40 anos, faixa essa que mostrou diferença significativa quanto ao colesterol total entre os gêneros ($p = 0,0048$). Em relação ao gênero, de um modo geral, os homens tiveram índices mais elevados de colesterol total. Porém, uma avaliação mais detalhada permite observar que na cidade de Douradina as mulheres apresentaram tendência a hipercolesterolemia superior aos homens. Seria interessante levar em conta os hábitos de modo geral adotados pela população dessa localidade, com característica mais voltada para o cotidiano rural. Na região de Douradina são frequentes os grandes latifúndios e as informações demandam mais tempo para serem incorporadas ao estilo de vida. Portanto, é possível sugerir que essa tendência esteja associada ao sedentarismo como sugere Lalonde *et al.* (2002), comum principalmente em mulheres com idade superior a 50 anos que por falta de opção de atividades físicas mantêm-se, a maior parte do tempo, envolvidas em atividades domésticas que demandam muito menor gasto calórico. Além disso, nessa faixa etária ocorre o déficit de estrógenos, o que está em acordo com Motta (2003). Já aos homens, a quem cabe as atribuições do labor da agropecuária, com a oportunidade de desempenhar atividade física mais intensa, os valores de colesterol encontram-se inferiores a 200 mg/dl. Exceção para a faixa entre 41 e 50 anos única em que as taxas de colesterol foram mais elevadas nos homens. Essa idade coincide com a de maior risco de doenças coronarianas, mais frequentes no gênero masculino.

Realidade diferente foi constatada em Cianorte, considerada hoje um pólo industrial, com grande força de trabalho concentrada na indústria do vestuário. É intrigante a distribuição dos valores de colesterol dos pacientes provenientes dessa localidade, que excetuando três indivíduos os quais apresentaram concentrações elevadas, todos os demais mantiveram-se em torno dos valores considerados normais com tendência a uma elevação. Este é um perfil pouco típico, e é provável que a causa dessa performance seja a própria condição desses trabalhadores que na sua maioria desempenham ocupações de caráter sedentário, típica dos operários industriários. É possível que os resultados ligeiramente acima da média e distribuídos de forma homogênea estejam relacionada ao sedentarismo. Já em Guaíra foram observados níveis mais elevados quando comparados com as taxas encontradas entre os pacientes das outras duas localidades, Guaíra está localizada no oeste do Paraná e, é representada por uma população que tem o hábito de consumir muito peixe, mas pelo fato de ser uma região preparada para o turismo e sua fronteira com o Paraguai, a população tornou-se sedentária devido suas atividades comerciais, que não requerem esforços físicos, tais como são necessários na agricultura e pecuária.

A análise estatística mostrou que em Douradina e Guaíra variações significativas da média do colesterol total entre os gêneros ocorreram em apenas uma faixa etária. Em Cianorte, tais variações foram encontradas em quatro das cinco faixas etárias.

Em Cianorte, os homens apresentaram aumento do colesterol total em todas as faixas etárias. Já em Guaíra apenas as pessoas entre 21 e 30 anos não atingiram índices elevados de colesterol total em Douradina apenas indivíduos entre 41 a 50 anos tiveram aumento do colesterol total.

A atividade física mais ou menos intensa, associada à alimentação da população residente nessas localidades, pode juntos ter contribuído para esses resultados apresentados de forma bastante diferenciada entre si conforme cita Lalonde *et al.* (2002).

Esses dados, além de servir como indicadores da qualidade de vida das pessoas e alerta sugerindo mudança para hábitos saudáveis, indica também a delicadeza quanto à adoção de valores normais. É interessante notar que as taxas médias dos níveis de colesterol das três cidades situam-se bem perto do valor máximo apregoado. Sendo assim, a interpretação visando inferir fatores de risco para doenças coronarianas precisa ser feita com muito cuidado e levar em conta além da idade e gênero do paciente também alguns hábitos quanto ao estilo de vida como alimentação e atividade física.

Os resultados apresentados confirmam a tendência para hipercolesterolemia com o aumento da idade, tanto no gênero masculino quanto no feminino, e que fatores como sedentarismo, hábitos alimentares e menopausa parecem contribuir com o aumento do colesterol. Foi também observado neste estudo que embora sejam localidades de um mesmo Estado, existe variação do nível de colesterol, mostrando que fatores regionais podem influenciar nos níveis de colesterol total sérico.

REFERÊNCIAS

1. - Chambers BA, Guo SS, Siervogel R, Hall G, Chumlea WC. Cumulative effects of cardiovascular disease risk factors on quality of life. *J Nutr Health Aging*; 6: 179 – 84, 2002.
2. - Daviglius ML, et al. Favorable cardiovascular risk profile in middle age and health – related quality of life in older age. *Arch Intern Med*; 163: 2460, 2003.
3. - Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease and death. The Framingham Study. *Arch Intern Med*; 141: 1128 – 1130, 1981.
4. - Grundy SM. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin Chem*; 41: 139 – 146, 1995.
5. - Kim JQ, et al. National cholesterol treatment guidelines in Korean population – setting – up the cutpoints for high blood cholesterol. *J Korean Med Sci*; 12: 17 – 22, 1997.
6. - Lalonde L, et al. Comparing the benefits of diet and exercise in the treatment of dyslipidemia. *Prev Med*; 35: 16 – 24, 2002.
7. - Li W, et al. Hypertension and health – related quality of life: an epidemiological study in patients attending hospital clinics in China. *J Hypertens*; 23: 1667 – 76, 2005.
8. - Motta V. Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003.
9. - NCEP. National Cholesterol Education Program. Second report of the expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation*; 89: 1329-1345, 1994.
10. - Rondó WJ. Prevenção: A medicina do século XXI. São Paulo: Editora Tecnopress, 1996.
11. - SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Resumo das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*; 77: 1 – 48, 2001.
12. - Scanu AM, Wissler RW, Getz GS. The biochemistry of atherosclerosis. New York: M.Dekker, 1979.
13. - Schroder H, Rohlfes I, Schmelz EM, Marrugat J, REGICOR investigators. Relationship of socioeconomic status with cardiovascular risk factors and lifestyle in a Mediterranean population. *Eur J Nutr*; 43: 77 – 85, 2004.
14. - Vieira EC. Doenças nutricionais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Márcia Regina Batista
Laboratório de Bioquímica Clínica – UEM
Avenida Colombo, 5790
CEP:87020-900, Maringá, PR, Brasil.
Telefone: (44) 32614801
E-mail: mrbatista@uem.br

Prevalência e Perfil de Susceptibilidade antimicrobiana em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), isoladas de pacientes do Hospital Universitário/UEL*

Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Klebsiella pneumoniae* producing of Extended Spectrum β -lactamases Enzyme, isolated from patient of University Hospital/ UEL

Angelo Augusto Chiachia Pasta¹; Fernando Henrique Arthico Fração²; Gerusa Luciana Gomes Magalhães³; Regina Mariuza Borsato Quesada⁴

RESUMO - As infecções hospitalares são as mais freqüentes complicações do tratamento médico nas UTI, enfermarias e ambulatórios. As bactérias da família Enterobacteriaceae especialmente *Klebsiella pneumoniae*, vêm ganhando importância nos últimos anos devido a maior participação nas infecções graves e resistência seletiva aos antimicrobianos, principalmente as produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL). O objetivo deste estudo foi descrever a prevalência, produção e distribuição de ESBL, assim como o perfil de susceptibilidade das cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes do Hospital Universitário de Londrina. O presente estudo mostrou que 465 (40,0%) das 1164 amostras de *K. pneumoniae* foram produtoras de ESBL, no período de Janeiro de 2002 a Dezembro de 2006. Os materiais biológicos com maior número desses isolados foram ponta de cateter (86,8%) e sangue (46,4%), enquanto que a Unidade Masculina apresentou maior prevalência desse patógeno. Observou-se, também, um aumento gradativo na ocorrência de ESBL nos isolados ambulatoriais. Em relação ao perfil de susceptibilidade apresentado pelas cepas de *K. pneumoniae* estudadas, somente amicacina mostrou menor índice de resistência, tanto para os isolados ESBL – negativos quanto positivos.

PALAVRAS-CHAVE - *K. pneumoniae*, Antimicrobianos, Resistência.

SUMMARY - The nosocomial infections are the most frequent complication of the medical handling in the Intensive Care Unit (ICU), nursing and outpatient clinics. Bacterials of the familie Enterobacteriaceae, specialy *K. Pneumoniae*, have become important in the last years due to a great participation in complicated infections and to selected resistance to the antimicrobial, mainly the extended-spectrum-Beta-lactamase (ESBL) producers. The aim of this study was to describe the prevalence, production and distribution of ESBL, as well as the susceptibily profile of the *K. Pneumoniae* strains, isolated from clinical samples of patients interned in the Hospital Universitário de Londrina. The present study showed that 465 (40%) of the 1164 positive samples of *K.pneumoniae* were ESBL producers, in the period of January of 2002 to December of 2006. The samples with most number of isolated ESBL (+) were catheters tip (86,8%) and blood (46,4%). Regarding the profile of resistance, it was observed that the *K. Pneumoniae* strains isolated were resistant to barely al of the antimicrobial, with exception of the carbapenem imipenem.

KEYWORDS - *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobials, resistant

INTRODUÇÃO

Bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae representam importante causa de infecções do trato urinário, sepses, abscessos abdominais e pneumonias nosocomiais (PATERSON, 2006). Dentro da família, *Klebsiella pneumoniae* destaca-se como patógeno oportunista responsável por surtos nosocomiais, sendo geralmente associado à elevada morbi-letalidade (VERNET *et al.*, 1995). Além disso, a espécie tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública nas últimas décadas, dada à emergência de resistência antimicrobiana devido, principalmente, à pressão seletiva proporcionada pelo aumento expressivo na utilização de agentes antimicrobianos em unidades de terapia intensiva (UTI), além de outros setores hospitalares especializados (FONTANA *et al.*, 2002). Não obstante a existência de grande variedade de mecanismos, a produção de beta-lactamases representa o principal fator de resistência das bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos beta-lactâmicos. Esses microrganismos apresentam genes plasmidiais que codificam a produção de betalactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1, enzimas que catalisam a hidrólise do anel betalactâmico, impossibilitando sua atividade antimicrobiana e conferindo resistência

intrínseca à ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina e cefalosporinas de primeira geração (LIVERMORE, 2003); (SOUSA JUNIOR *et al.*, 2004).

Entre as Enterobacteriaceae também ocorre resistência às cefalosporinas de amplo espectro, proporcionada pela produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) (DÜ BOIS *et al.*, 1995). Tais enzimas são predominantemente derivadas de TEM e SHV; no entanto, algumas enzimas dos tipos OXA e CTX-M também mostram atividades contra esses antimicrobianos (BRADFORD, 2001).

A mudança no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *K.pneumoniae*, assim como a existência de relatos crescentes de surtos hospitalares causados por esses agentes justificam a monitoração deste patógeno no ambiente nosocomial. Contudo, tanto a variação no espectro dessas enzimas, quanto na velocidade com que degradam os diferentes beta-lactâmicos faz com que a padronização de um teste de sensibilidade *in vitro* para detecção fenotípica de cepas produtoras de ESBL seja dificultada (RANDEGGER, 2001); (REIS, 1998).

Assim sendo, a identificação inadequada desses microrganismos mostra importantes implicações na terapia antimicrobiana e controle da infecção (OPLUSTIL *et al.*, 2001). Tal

Recebido em 23/04/2008

Aprovado em 08/05/2008

Prêmio Newprov

*Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Londrina/PR

¹Bioquímico Especialista em Infecção Hospitalar - Universidade Estadual de Londrina/PR

²Acadêmico do Curso de Farmácia - Universidade Estadual de Londrina/PR

³Acadêmica de Farmácia, Instituto de Ensino Superior de Londrina/PR

⁴Docente de Microbiologia Clínica, Departamento Análises Clínicas e Toxicológicas, CCS - UEL/PR

fato pode prolongar a permanência do paciente no hospital, ou mesmo aumentar a morbi-mortalidade, uma vez que os pacientes podem não ser tratados adequadamente (DAOUD; HAKIME, 2003). Por isso, é recomendado reportar resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos de amplo espectro, para qualquer microrganismo em que a produção de ESBL seja confirmada, independente dos resultados obtidos nos testes *in vitro*, de acordo com o estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Dessa forma, o conhecimento da prevalência e perfil de susceptibilidade dessas bactérias multiresistentes assume importância crucial para a instauração de medidas, visando aperfeiçoar a terapêutica, reduzir a frequência dos patógenos, bem como a ocorrência de surtos nosocomiais.

O presente estudo teve como objetivos descrever a prevalência, a produção e a distribuição de ESBL, assim como relatar o perfil de resistência das cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes ambulatoriais e internados no Hospital Universitário de Londrina - Pr.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados Bacterianos. Realizou-se estudo retrospectivo das culturas microbiológicas positivas para *K. pneumoniae* isoladas de pacientes ambulatoriais e internados no Hospital Universitário (HU), da Universidade Estadual de Londrina (UEL) - Paraná. Foram pesquisadas 1164 culturas de diferentes materiais biológicos e procedentes de diversas unidades hospitalares, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2006. Incluiu-se no estudo apenas a primeira amostra de cada paciente; exceto nos casos em que foram isoladas, no mesmo paciente, cepas produtoras e não produtoras de ESBL. O isolamento das bactérias foi realizado através dos meios de cultura padronizados para cada tipo de amostra. A identificação, assim como a antibiotipagem das cepas de *K. pneumoniae* foram realizadas por automação, através do sistema *MicroScan-WalkAway®* (DADE BEHRING).

Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.

Utilizou-se método quantitativo automatizado de microdiluição (CLSI), e os resultados foram expressos de acordo com critérios recomendados pelo CLSI. Para tanto, avaliou-se o perfil de susceptibilidade das cepas de *K. pneumoniae* aos agentes antimicrobianos de uso clínico rotineiro, sendo que as drogas utilizadas variaram de acordo com o material biológico investigado.

Detecção da Produção de ESBL.

As amostras foram previamente avaliadas quanto à produção de ESBL pelo método fenotípico, baseado em testes de triagem por concentração mínima inibitória (MIC). Foi realizado um segundo método para incrementar os dados da automação, através do teste de comparação com discos (Oxoid®), conforme representado na Figura 1. O teste de triagem avaliou a sensibilidade a cefopodoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, enquanto que o método adicional comparou os halos de inibição para ceftazidima e cefotaxima, com e sem associação ao ácido clavulânico. Foram consideradas produtoras de ESBL amostras de *K.pneumoniae* em que se obteve as diferenças entre as zonas de inibição maior ou igual a 5mm entre o disco de cefalosporina combinado e o correspondente não combinado (CARTER *et al.*, 2000).

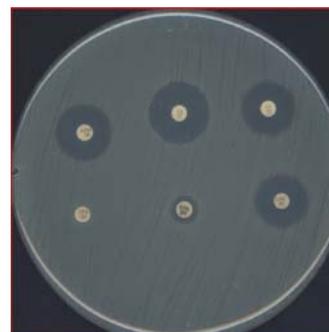


Figura 1 - Figura ilustrativa do método de comparação entre discos de antimicrobianos beta-lactâmicos associados ou não ao ácido clavulânico, demonstrando prova positiva para produção de ESBL por *K. pneumoniae*.

(CTX = cefotaxima (30ug/ml); CAZ= ceftazidima (30ug/ml); CPD= cefopodoxima (30ug/ml); CD01= cefopodoxima + ácido clavulânico (30/10ug/ml); CD02= ceftazidima + ácido clavulânico (30/10ug/ml); CD03= cefotaxima + ácido clavulânico (30/10ug/ml)) (Figura produzida no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Londrina)

RESULTADOS

No período de janeiro de 2002 a dezembro de 2006, foram obtidos 1164 isolados clínicos de *K. pneumoniae* procedentes de pacientes ambulatoriais e internados no HU. Destes, 465 (40,0%) dos isolados mostraram-se produtores de ESBL. Dentre os materiais biológicos investigados, urina, secreções e sangue foram de onde mais se isolou *K.pneumoniae*, com 769 (66,1%), 184 (15,8%) e 97 (8,3%) casos, respectivamente. Contudo, observou-se maior ocorrência de cepas produtoras de ESBL oriundas de pontas de cateteres, com 33 (86,8%) dos isolados, seguidas pelas amostras de sangue, com 45 (46,4%) dos casos, conforme está demonstrado na Tabela 1.

A frequência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL obtidas de pacientes ambulatoriais e confrontadas com cepas de pacientes internados nas enfermarias do HU está reproduzida no Gráfico 1. Observou-se que 25,8% dos isolados ambulatoriais e 65,8% dos isolados procedentes de enfermarias apresentaram a maior frequência de cepas ESBL - positivas nos anos de 2005 e 2004, respectivamente.

TABELA I

Distribuição dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL em diferentes materiais clínicos.

| Materiais Biológicos | <i>K.pneumoniae</i> ESBL – negativas | | <i>K.pneumoniae</i> ESBL - positivas | |
|----------------------|--------------------------------------|------|--------------------------------------|------|
| | Nº | (%) | Nº | (%) |
| Urina | 769 | 66,0 | 290 | 37,7 |
| Sangue | 97 | 8,3 | 45 | 46,4 |
| Secreções | 184 | 15,8 | 71 | 38,6 |
| Ponta cateter | 38 | 3,3 | 33 | 86,8 |
| Outros | 76 | 6,5 | 26 | 34,2 |
| Total | 1164 | 100 | 465 | 40,0 |

Nº – número; (%) - percentual

DISCUSSÃO

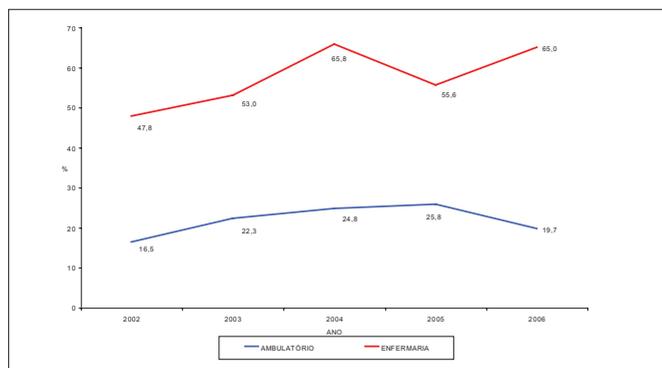


Gráfico 1 - Evolução da frequência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de pacientes ambulatoriais e de enfermarias do HU, no período de 2002 a 2006.

Quando se questionou de quais Unidades Hospitalares provinham as cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de pacientes internados, demonstrou-se que a Unidade Masculina detinha 111 (34,0%) dos casos, seguida pela Unidade Feminina e UTI com 81 e 80 isolados, respectivamente. Tais dados estão apresentados no Gráfico 2. Enquanto a Tabela 2 mostra o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelas cepas de *K. pneumoniae* analisadas.

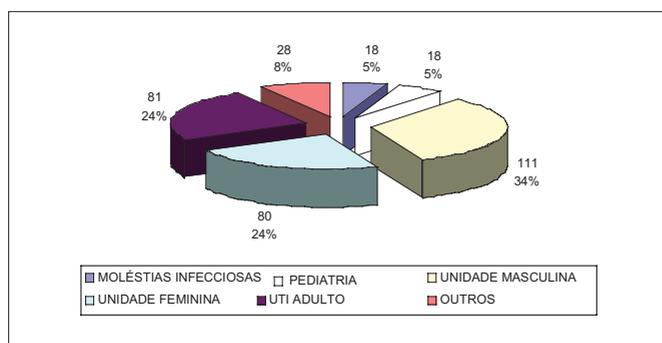


Gráfico 2 - Distribuição de *K. pneumoniae* produtores de ESBL procedentes das diferentes Unidades de Internação do HU

TABELA II
Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *K. pneumoniae* produtores e não produtores de beta-lactamases de espectro estendido.

| Antibióticos | <i>K. pneumoniae</i> ESBL -positivo | | | <i>K. pneumoniae</i> ESBL -negativo | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-----|------|-------------------------------------|-----|------|
| | Nº | R | (%) | Nº | R | (%) |
| Inibidores de beta-lactamases | | | | | | |
| Ampicilina/sulbactam | 363 | 352 | 97,0 | 497 | 109 | 21,9 |
| Piperacilina/tazobactam | 422 | 324 | 76,8 | 587 | 63 | 10,7 |
| Carbapenêmico | | | | | | |
| Imipenem | 462 | 0 | 0 | 691 | 0 | 0 |
| Aminoglicosídeos | | | | | | |
| Amicacina | 461 | 251 | 54,4 | 696 | 47 | 6,7 |
| Gentamicina | 459 | 400 | 87,1 | 693 | 84 | 12,1 |
| Fluoroquinolonas | | | | | | |
| Ciprofloxacino | 450 | 370 | 82,2 | 688 | 96 | 13,9 |
| Levofloxacino | 238 | 203 | 85,3 | 356 | 49 | 13,8 |
| Norfloxacino | 69 | 52 | 75,4 | 130 | 20 | 15,4 |
| Outros | | | | | | |
| Sulfametoxazol/ trimetoprim | 456 | 384 | 84,2 | 688 | 147 | 21,4 |
| Nitrofurantoina | 263 | 243 | 92,4 | 451 | 292 | 64,7 |

Nº - número de isolados de *K.pneumoniae* testados; R - número

O total de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL obtidas de pacientes ambulatoriais e das unidades de enfermaria do Hospital Universitário de Londrina foi de 465, representando 40,0% dos isolados. Dentre os sítios anatômicos, identificou-se o trato urinário como a topografia mais acometida com 769 (66,0%) casos. Contudo, observou-se maior ocorrência de cepas que expressaram o fenótipo ESBL em isolados de cateter 33 (86,8%) e sangue 45 (46,4%), obtidos de pacientes de enfermaria. Neste sentido, estudo apresentado por Tonkic, Barisic e Punda-Polic (2005), demonstrou que o trato urinário é o sítio mais frequentemente associado a infecções por *K.pneumoniae*, apresentando também maior ocorrência de cepas produtoras de ESBL (47,1%).

A prevalência de Enterobacteriaceae produtora de ESBL tem sido estudada em diversos países (FREITAS *et al.*, 2003); (GOOSSENS *et al.* GRABEIN, 2005); (KOLAR *et al.*, 2006), mostrando variações significativas entre as regiões e hospitais analisados. Por exemplo, na Alemanha, um estudo realizado em 1999 demonstrou prevalência de cepas ESBL inferior a 1%, entre isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* obtidos em 11 hospitais (STOBBERING *et al.*, 1999). Por outro lado, a prevalência de cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL (40,0%) isoladas no HU mostrou-se similar aos observados na França (BRANGER *et al.*, 1998), China (YU *et al.*, 2002) e Líbano (DAOUD *et al.* HAKIME, 2003), assim como em outras localidades do Brasil (FREITAS *et al.*, 2003). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram ainda, com o estudo realizado na Croácia em 2002, que revelou percentagem de 36,8% para esses microrganismos (TONKIC *et al.*, 2005).

Do total de isolados que expressaram o fenótipo ESBL, no presente estudo, 336 (72,3%) procederam das enfermarias, sendo a Unidade Masculina o setor com maior prevalência (34,0%). Tais resultados diferem dos observados por Conte e colaboradores (2005) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde a maior ocorrência de produtores de ESBL foi em isolados de UTI (51,8%) e de enfermaria de Clínica Cirúrgica (37%), enquanto que Winokur e colaboradores (2001) demonstraram que a prevalência desses isolados variou consideravelmente entre os diferentes setores do hospital. Nesse estudo, conforme Gráfico 2, evidencia-se um aumento gradativo na ocorrência dessas cepas até o ano de 2004, quando a frequência manteve-se constante, sugerindo até o presente momento um caráter endêmico desse patógeno no hospital. Embora produtores de ESBL sejam prevalentes em ambientes hospitalares, já existem evidências de sua emergência e disseminação à comunidade (PITOUT *et al.*, 2005). O presente estudo revelou essa tendência, pois 129 (27,7%) isolados foram obtidos de pacientes ambulatoriais, demonstrando o progressivo aumento de *K. pneumoniae* ESBL-positivo no período analisado, conforme Gráfico 1.

Uma vez que a expressão da resistência depende da quantidade da enzima presente e da afinidade desta pelo substrato, é importante a escolha dos antimicrobianos adequados para os testes de sensibilidade, que variam com o tipo de enzima predominante (BRADFORD, 2001); (MACKENZIE *et al.* 2002).

Dessa maneira, Freitas e colaboradores (2003) obtiveram resultados distintos na detecção do fenótipo ESBL produzido por *K.pneumoniae* quando compararam métodos de triagem e testes confirmatórios, sendo que taxas superiores a 70,0% foram conseguidas com o método de triagem por Kirby-Bauer e taxas de 33,0% a 40,0% com os métodos confirmatórios. Tais resultados corroboram com os dados

obtidos na presente pesquisa, na qual foi observado o fenótipo ESBL em 40,0% das cepas.

Tendo em vista que as ESBL têm sua ação hidrolítica bloqueada por inibidores de betalactamases tais como, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (OPLUSTIL *et al.*, 2001), somente 98 (23,2%) e 11 (3,0%) das amostras de *K. pneumoniae* ESBL-positivo foram sensíveis a piperacilina/tazobactam e ampicilina/sulbactam, respectivamente. O fato indicou, como já demonstrado em outros estudos (ROLAND *et al.*, 2000); (SADER *et al.*, 2001), que esses compostos não apresentam boa atividade *in vitro* contra amostras produtoras de ESBL.

O tratamento de escolha para bactérias produtoras de ESBL consiste dos carbapenens (BUSH, 2001), os quais são betalactâmicos resistentes à inativação enzimática. Contudo, resistência a essa classe de antimicrobianos entre membros da família Enterobacteriaceae já tem sido relatada na literatura (BRATU *et al.*, 2005); (SHIROTO *et al.*, 2005).

Em *K. pneumoniae*, a resistência aos carbapenens depende da expressão de beta-lactamases das classes A e AmpC, além de mecanismos de defeito na permeabilidade da membrana (GOOTZ, 2006). Com base nisso foi descrito o envolvimento de duas principais proteínas de membrana externa, *OmpK35* e *OmpK36* (HERNANDEZ-ALES *et al.*, 1999) as quais apresentam um importante papel na penetração do antibiótico dentro da célula (KACZMAREK *et al.*, 2006).

No presente estudo, os antibióticos da classe dos carbapenens mostraram elevada atividade contra isolados produtores da enzima, sendo o imipenem o mais ativo (100%), seguido pelo ertapenem (85,7%). Em relação ao meropenem, o número de cepas analisadas não foi representativo, devendo-se aprofundar a investigação e incrementar o número de análises. Esses resultados condizem com os obtidos por Kifer e colaboradores (2006), que demonstraram 100% de susceptibilidade das cepas de *K. pneumoniae* ao imipenem e meropenem, comparado a 96,1% de atividade do ertapenem. Além disso, os dados obtidos nesse estudo estão de acordo com os apresentados por Livermore e colaboradores (2003) e Jacoby e pesquisadores (2004), os quais descreveram perda de sensibilidade mais pronunciada para ertapenem, na maioria das cepas de *K. pneumoniae* analisadas.

Microrganismos produtores de ESBL são tipicamente resistentes a múltiplas drogas. Os genes para produção dessa enzima são freqüentemente localizados em plasmídeos que podem ser transferidos entre diferentes espécies, disseminando a resistência (GALANI *et al.*, 2002). Tais plasmídeos podem conter genes de resistência contra outros agentes antimicrobianos, e são altamente estáveis em bactérias multirresistentes, limitando as opções terapêuticas (KIZIRGIL *et al.*, 2005). Os resultados obtidos com esse estudo refletem essa característica, dado que as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL apresentaram, também, altas taxas de resistência cruzada com outras classes de antibióticos.

Neste sentido observou-se que a amicacina apresentou o menor índice de resistência (54,4%) entre os aminoglicosídeos analisados. Dentre as fluoroquinolonas, o norfloxacino apresentou-se com 75,4% de resistência, que embora bastante elevada, foi o melhor índice de atividade contra as amostras ESBL-positivas dentro da classe. Enquanto que para as amostras ESBL-negativas, o nível de resistência frente aos mesmos antimicrobianos foi de apenas 6,7% e 15,4%, respectivamente. O elevado nível de resistência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL frente aos antimicrobianos amicacina e norfloxacino observado neste trabalho, pode refletir uma tendência nacional justificada pelo maior uso destas drogas como tratamento empírico em hospitais brasileiros

(TAVARES, 2001). Contudo, alguns trabalhos nacionais observaram resistência de apenas 16,3% para amicacina em pacientes internados e apenas 4,3% em ambulatoriais para cepas de *K. pneumoniae* (OPLUSTIL *et al.*, 2001).

Altas taxas de resistência a outras classes de antibióticos também foram evidenciadas neste estudo, tais como Nitrofurantoína com 92,4% de resistência, sendo a droga com menor atividade, tanto para *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, quanto para amostras negativas, seguido por sulfametoxazol/trimetoprim com 84,2% de resistência. Tais resultados divergem do estudo realizado por Oplustil e colaboradores (2001), em que demonstraram resistência de 39,3% das cepas para o sulfametoxazol/trimetoprim de pacientes internados e 20,7% para ambulatoriais.

A análise dos resultados obtidos no presente estudo não permite estender as conclusões aos demais hospitais do município de Londrina, tendo-se em vista que a incidência de ESBL varia entre as regiões, e mesmo entre hospitais da mesma região. No entanto, permite reafirmar a importância da realização de estudos epidemiológicos locais com a finalidade de melhorar a detecção desses microrganismos multirresistentes. O emprego de técnicas laboratoriais padronizadas e eficazes para a detecção de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, assim como a vigilância epidemiológica constante quanto a prevalência de fenótipos multirresistentes desse microrganismo, associada a um controle rigoroso na utilização de antimicrobianos poderá inibir ou limitar o aparecimento dessas cepas e evitar a perda gradativa de antibióticos potentes do arsenal terapêutico.

REFERÊNCIAS

1. BRADFORD, P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.*, 2001; 14: 933-51.
2. BRANGER, C.; LESIMPLE, A.L.; BRUNEAU, B.; BERRY, P.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a university hospital. *J Med Microbiol.*, 1998; 47: 201-9.
3. BRATU, S.; LANDMAN, D.; HAAG, R.; RECCO, R.; ERAMO, A.; MAQSOOD, A.; QUALE, J. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med.*, 2005; 165:1430 -1435
4. BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.*, 2001; 32: 1085-1089.
5. CARTER, M.W.; OAKTON, K.J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* with the oxid combination disk method. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (11), p. 4228 - 4232, 2000.
6. CONTE, V.D.; WOLLHEIM, C. ; COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGERAY, S.; SCHREINER, F.J.; GUERRA, I.M.F. Estudo dos isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp produtores de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL). In: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2005, Caxias do Sul, RS.
7. CORMICAN, M.G.; MARSHAL, S.A.; JONES, R.N. Detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing strains by Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.*, 1996; 34: 1880-4.
8. DAOUD, Z.; HAKIME, N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. *Rev Esp Quimioterap.*, 2003; 16: 233-238.
9. DU BOIS, S.K.; MARRIOT, M.S.; AMYES, S.G. TEM- and SHV- derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother.*, 1995; 35: 7-22.
10. FONTANA, R.; LO, C.G.; GIACOBONE, E.; ROMERO, E.; CIPRIANI, P.; SESA, R.; FRANCHINO, L. Resistance surveillance in Italy: four-year results from the MYSTIC. *Pro. J. Chemother.*, 2002; 14: 323-331.

11. FREITAS, A.L.P.; MACHADO, D.P.; SOARES, F.S.C.; BARTH, A.L. Extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. *Braz J Microbiol.*, 2003; 34: 344-348.
12. GALANI, I. et al. Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. *Clin Microbiol Infect.*, v. 8, p. 579-588, 2002.
13. GOOSSENS, H.; GRABAIN, B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diag Microbiol Infect Dis.*, 2005; 53: 257-264.
14. GOOTZ, T.D. The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochemic Pharma.*, 2006; 71: 1073-1084.
15. HERNANDEZ-ALES, S.; CONEJO, M.; PASCUAL, A.; TOMAS, J.M.; BENE-DI, V.J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol.*, 1999; 145: 673-679.
16. JACOBY, G.A.; MILLS, D.M.; CHOW, N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2004; 48: 3203-6.
17. KACZMAREK, F. M.; DIB-HAJJ, F.; SHANG, W.; GOOTZ, T. D. High-Level Carbapenem Resistance Is Due to the Combination of blaACT-1 B-Lactamase Production, Porin OmpK35/36 Insertional Inactivation, and Down-Regulation of Phosphate Transport Porin PhoE. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2006, p. 3396-3406, Vol. 50, No 10.
18. KIFFER, C.R.V.; KUTI, J.L.; EAGYE, K.J.; MENDES, C.; NICOLAU, D.P. Pharmacodynamic profiling of imipenem, meropenem and ertapenem against clinical isolates of extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Brazil. *Inter J Antimicrob Agents.*, 2006; 28: 340-344.
19. KIZIRGIL, A.; DEMIRDAG, K.; OZDEN, M.; BULUT, Y.; YAKUPOGULLARI, Y.; TORAMAN, Z.A. In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* blood isolates. *Microbiology Research.*, 2005; 160: 135-140.
20. KOLAR, M.; LATAL, T.; CERMAK, P.; BARTONIKOVA, N.; CHMELAROVA, E.; SAUER, P.; KESSELOVA, M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. *Inter J Antimicrob Agents.*, 2006; 28: 49-53.
21. LIVERMORE, D.M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiology Rev.*, 1995; 8: 557-584.
22. LIVERMORE, D.M.; SEFTON, A.M.; SCOTT, G.M. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother.*, 2003; 52: 331-44.
23. MACKENZIE, F. M.; MILLER, C. A.; GOULD, I. M. Comparison of screening methods for TEM and SHV derived extended-spectrum β -lactamase detection. *Clin Microbiol Infect.*, 2002; 8: 715-724.
24. MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCOAL, A.; JACOBY, G.P. Quinolone resistance from transferable plasmid. *Lancet*, 1998; 351: 797-799.
25. MENDES, C.; KIFFER, C.; SEGURA, A.; RIBEIRO, J.; TURNER, P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. *Braz J Infect Dis.*, 2004; 8(1): 109-111.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Wayne (PA), 1997. Approved Standard, M7-A4.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement. Document M100-S12. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: global informational supplement M100- S14. NCCLS, 2004.
29. OPLUSTIL, C. P.; NUNES, R.; MENDES, C. Multicenter Evaluation of Resistance Patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from Clinical Specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. *Braz. Jour. Infect. Dis.* 2001;5(1):8-12.
30. PATERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Americ J Med.*, 2006; 119(6A): S20-S28.
31. PITOUT, J.D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K.B.; POIREL, L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.*, 2005; 56: 52-59.
32. RAHAL, J.J. Extended-spectrum β -lactamase: how big is the problem? *Clinic Microbiol Infect.*, 2000; 6: 2-6.
33. RANDEGGER, C. C. et al. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2001; 45: 1730-1736.
34. REIS, A. Avaliação da acurácia do teste de adição de clavulanato em disco para a detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL). *J Bras Patol.*, 1998; 34: 85-92.
35. ROLAND, R.K.; MENDES, R.E.; SILBERT, S.; et al. In vitro antimicrobial activity of piperacillin/tazobactam in comparison with other broad-spectrum β -lactams. *Braz Journal Infect Dis.*, 2000; 4: 226-35.
36. SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results from Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz Journal Infect Dis.*, 2001; 5(4): 200-214.
37. SHIROTO, K.; ISHII, Y.; KIMURA, S.; ALBA, J.; WATANABE, K.; MATSUSHIMA, Y.; YAMAGUCHI, K. Metallo- β -lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. *J. Microbiol.*, 2005, 54, 1065-1070.
38. SOUSA JUNIOR, M.A.; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO G. C., Betalactamase de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. *NewsLab – edição 63 – 2004.*
39. STOBBERINGH, E.E.; ARENDS, J.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A. et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Dutch hospitals. *Infection* 1999; 27: 348-54.
40. TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos. 3a Edição. São Paulo: Atheneu, 2001.
41. TONKIC, M.; BARISIC, I.G.; PUNDA-POLIC, V. Prevalence and antimicrobial resistance of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. *Internat. Microbiol.*, 2005; 8: 119-124.
42. VERNET, V.; PHILIPPON, A.; MADOULET, C.; VISTELLE, R.; JAUSSAUD, R.; CHIPPAUX, C. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* blood culture isolates. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995; 130: 51-57.
43. YU, Y.; ZHOU, W.; CHEN, Y.; DING, Y.; MA, Y. Epidemiological and antibiotic resistant study on extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Zhejiang Province. *Chin Med J (Engl.)*, 2002; 115: 1479-1482.
44. WINOKUR, P., L., CANTON, R., CASELLAS, J., M., LEGAKIS, N. Variations in the prevalence of strains expressing and extend-spectrum-beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (suppl 2): S94-S103.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Hospital Universitário de Londrina
 Av. Robert Koch, 60 Vila Operaria
 CEP. 86038 440 Londrina/Paraná
 E-mail: reginaquesada@yahoo.com.br
 Tel.: (43) 33712346/ (43) 33712200

Controle de qualidade laboratorial pré-analítico: avaliação de solicitações médicas de exames bioquímicos no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

Pre-analytical laboratory quality control: evaluation of medical requests for biochemical laboratory exams in the University of Campinas State University Hospital, Sao Paulo, Brazil

Livia Maria Dias Freire¹; Fábio Lima Sodré²; Rogério Antônio de Oliveira³;
Lúcia Nassi Castilho⁴ & Eliana Cotta de Faria⁵

RESUMO - O sistema de Saúde Pública no Brasil passa por uma séria crise financeira e esta realidade deve ser compreendida pelos profissionais que atuam nele para que se possa otimizar recursos humanos e materiais. Este estudo é o resultado do interesse no conhecimento da distribuição de solicitações de exames bioquímicos entre as Enfermarias e Ambulatórios, e entre exames com resultados alterados e não alterados, em um hospital estadual público universitário. Analisou-se todos os resultados de 29 parâmetros bioquímicos mais solicitados e gerados durante um mês pela Seção de Bioquímica Clínica, um total de 80.126 testes, sendo 28.502 de enfermarias (E) e 51.624 de ambulatórios (A). A frequência média de resultados alterados nas enfermarias foi maior (44%) que nos ambulatórios (30%), como esperado. Observando-se as frequências entre E e A, 28,6% (8 dos 28 parâmetros) foram semelhantes. Nas E frequências semelhantes entre alterados e não alterados ocorreram em 48% (14 entre 29) dos parâmetros mas nos A ocorreram semelhança em 11,7% (3 de 28) dos parâmetros. Ambos os resultados médios de não alterados de E (56%) e (70%) de A, refletindo provavelmente um excesso de solicitações de exames das duas origens. Há necessidade de um balanço entre solicitações de exames bem indicadas e seu adequado uso em hospitais escola, visando sempre, a melhor qualidade do diagnóstico clínico-laboratorial e tratamento dos pacientes, mas sem perder de vista a meta do menor custo/benefício para a manutenção da saúde financeira da instituição.

PALAVRAS-CHAVE - Exames laboratoriais bioquímicos; distribuição dos testes em um hospital; solicitação médica de exames.

SUMMARY - The Public Health system in Brazil is under a serious financial crisis and this reality must be understood by the professionals who act in the health system to optimize the human resources and materials available. To know the distribution of results of biochemical tests from Infirmaries (I) and out-patient wards (O) and the frequency of altered and non-altered results in a State University Hospital. All results of the 30 most requested biochemical laboratory tests were collected during one month, totalizing 80126 tests, 28502 from infirmaries (I) and 51624 outpatient wards (O). As expected, the average frequencies of all altered results in I was higher (44%) than in O (30%), but surprisingly the frequencies between I and O were similar in 28,6%, 8 out of the 28. In the I there were similar frequencies between altered and non altered exams in 48% (14 in 29) of the results; in the O, 11,7% (3 de 28) of the results were similar. The non-altered results, 56% in I and 70% in A were probably due to an exceeding number of requested exams from both origins. Since this is a teaching Hospital this reality should reach equilibrium between the correctly requested tests and their adequate use for diagnosing and treating patients, but keeping in mind always the cost/benefits of the institution.

KEYWORDS - biochemical laboratory exams; distribution of exams in a hospital; medical requests for exams.

INTRODUÇÃO

O sistema de Saúde Pública no Brasil passa por uma séria crise financeira advinda, principalmente, do aumento da demanda de procedimentos não acompanhada por proporcional verba ministerial. Vale destacar o aumento de custos, principalmente, associados a procedimentos médicos dependentes de tecnologia de alta complexidade. O Hospital das Clínicas (HC) Unicamp é um Hospital Universitário Estadual com características de atendimento 3^{ário} e 4^{ário}, incluído em um sistema hierarquizado e referenciado de Saúde e mantido pelo Sistema Unificado de Saúde. Tem função assistencial, de ensino além de pesquisa aplicada. É um pólo de referência no atendimento médico hospitalar do interior do Estado de São Paulo. A seção de Bioquímica Clínica é responsável por 60% da rotina laboratorial da Divisão de Patologia Clínica. Para tal, realiza em média 100.000 exames por mês, cerca de 43% de enfermarias e 57% de ambulatórios, com os seus setores de urgência e de gasometria funcionando 24h por dia. As distribuições de valores determinados por testes bioquímicos em amostras biológicas apresentam alta variabilidade porque contêm fontes de variação pré-analítica biológica

ca e fisiopatológica, além de variações analíticas e pós-analíticas (1). A Seção Bioquímica Clínica possui sistemas de controle da qualidade bem estabelecidos e rigorosos para garantir a excelente qualidade final de seus resultados. Foi instalado há um ano na Seção, um sistema analítico químico de automação modular, com interfaciamento com os computadores do HC, para entrada da amostras e os pedidos e a saída dos resultados após seguidos os critérios estabelecidos de controle da qualidade (5) garantindo excelente *performance* analítica dos exames. A comunicação próxima entre o laboratório e os clínicos, tão necessária em um hospital escola, se tornou muito facilitada. A literatura identifica, através das evidências obtidas em meta-análises e revisões frequentes, melhorias na utilização clínica e na interpretação dos resultados dos exames (2,3). Esta realidade deve ser bem compreendida pelos profissionais que atuam no sistema de saúde, para que possam colaborar de forma significativa e modificá-la favoravelmente, racionalizando os pedidos de exames laboratoriais complementares e otimizando a utilização dos recursos financeiros, para se atingir um consenso comum efetivo entre a administração do hospital e o laboratório com conseqüente maiores benefícios aos pacientes. Este estudo é resultado da preocupação constante dos profissionais da Seção de Bioquímica Clínica em oferecer a melhor qualidade a seus clientes.

Recebido em 22/02/2007

Aprovado em 22/02/2008

¹acadêmica medicina, Unicamp; ²pós-graduando medicina, Unicamp; ³doutorando estatística, USP;

⁴MSc, PhD, docente, Unicamp; ⁵MD, MS, PhD, docente, Unicamp

*Departamento de Patologia Clínica e Seção de Bioquímica Clínica da Divisão de Patologia Clínica/ Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

Foi objetivo o mapeamento de 80.126 resultados de 30 exames laboratoriais entre os mais solicitados e realizados na Seção de Bioquímica Clínica durante um mês. Determinou-se tanto a distribuição das solicitações médicas quanto a comparou-se enfermarias e ambulatorios e resultados alterados e não alterados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para mapear o perfil das solicitações de exames bioquímicos e a sua adequação ao sistema de saúde, analisamos retrospectivamente resultados dos exames solicitados à Seção de Bioquímica Clínica, oriundos das enfermarias (E) ou dos ambulatorios (A) do HC e de outros centros que compõem o complexo HC (CAISM, Hemocentro, Gastrocentro).

Avaliou-se a adequação de tais solicitações por um período de 30 dias, no mês como de outubro de 2005, aleatoriamente escolhido. Foram analisados todos os resultados dos parâmetros bioquímicos, 80.126 testes, sendo 28.502 de enfermarias e 51.624 de ambulatorios.

As análises foram realizadas em soro ou plasma, em equipamento de automação Hitachi 917 e com reagentes Roche®. Utilizaram-se métodos colorimétricos e enzimáticos para glicose, uréia, creatinina, aminotransferases, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, colesterol, triglicérides; para HDL-colesterol e LDL-colesterol métodos homogêneos; para sódio e potássio, o de eletrodo íon sensível; para a eletroforese de proteínas em agarose utilizou-se o sistema REP (Helena Laboratories) e para as drogas métodos imunométricos em sistema AxSYM (Abbot).

Os resultados dos exames foram classificados em blocos funcionais clínicos: 1- Metabolismo de lipídios e glicídios; 2- Perfil Renal e eletrolítico; 3- Perfil Hepático; 4- Perfil Iônico; 5- Perfil Cardíaco; 6- Enzimas; 7- Drogas e classificados como alterados (A) ou não alterados (NA) em relação aos limites de referência estabelecidos na Seção de Bioquímica Clínica, corrigidos por sexo e idade. O número de exames solicitados por paciente foi estimado em ambulatorios e enfermarias a partir do número de identificação do paciente.

Os resultados foram classificados utilizando-se intervalos de referência estabelecidos pela Seção de Bioquímica Clínica, de acordo com a literatura especializada, como alterados (acima ou abaixo dos limites de referência) ou não alterados (dentro dos limites de referência).

Os valores de referência estabelecidos pela Seção de Bioquímica Clínica são: Colesterol (COL): de 2 a 19 anos: \leq 170 mg/dL, \geq 20 anos: \leq 200 mg/dL; HDL-colesterol: \leq 10 anos: Desejável \geq 40 mg/dL, 10 a 19 anos: Desejável \geq 35 mg/dL, Adulto: Desejável \geq 40 mg/dL; Triglicérides (TG): \leq 10 anos: Desejável \leq 100 mg/dL, de 10 a 19 anos: Desejável \leq 130 mg/dL, \geq 20 anos: Desejável \leq 150 mg/dL; LDL-colesterol: Ótimo: \leq 100 mg/dL; Creatinina (CR): 0 a 3 dias: 0,3 a 1,0 mg/dL, 5 dias a 12 anos: 0,4 a 1,1 mg/dL, Adulto: Homem: até 1,3 mg/dL Mulher: até 1,1 mg/dL, >que 50 anos: até 1,4 mg/dL; Uréia (U): Criança: até 47 mg/dL, Adulto: até 49 mg/dL, > 65 anos: até 70 mg/dL; Potássio (K): RN: 3,6 a 6,1 mEq/L, Lactente: 3,6 a 5,8 mEq/L, Criança: 3,1 a 5,1 mEq/L, Adulto: 3,3 a 5,1 mEq/L, Sódio (Na): RN: 132 a 147 mEq/L, Lactente: 129 a 143 mEq/L, Criança: 132 a 145 mEq/L, Adulto: 133 a 145 mEq/L, Aspartato amino transferase (AST): Lactente: até 76 U/L, 1 a 3 anos: até 47 U/L, 4 a 6 anos: até 35 U/L, 7 a 12 anos: até 46 U/L, 13 a 17 anos: Homem: até 28 U/L, Mulher: até 24 U/L, Adulto: Homem: até 37 U/L, Mulher: até 31 U/L; Alanina amino transferase (ALT): Lactente: até 55 U/L, 1 a 3 anos: até 38 U/L, 4 a 6 anos: até 28 U/L, 7 a 12 anos: até 38 U/L, 13 a 17 anos: Homem: até 26 U/L, Mulher: até 23 U/L, Adulto: Homem: até 40 U/L, Mulher: até 35 U/L; Gama glutamil transferase (GGT): Mulher: 9 a 35 U/L Homem: 9 a 40 U/L; Fosfatase alcalina (FALC): Até 12 anos: até 300 U/L, 13 a 17 anos: Homem: até 390 U/L, Mulher: até 187 U/L, Adulto: Homem: até 40 - 129 U/L, Mulher: até 35 - 104 U/L; Glicose (GLI): RN 1 dia: 40 a 60 mg/dL, RN após 1 dia: 50 a 80 mg/dL, Cri-

ança: 60 a 109 mg/dL, Adulto: 70 a 100 mg/dL; Ácido úrico (URAC): Mulher: 2,4 a 5,7 mg/dL, Homem: 3,4 a 7,0 mg/dL, Criança: 2,0 a 5,5 mg/dL; Bilirrubinas direta (BD): : até 0,2 mg/dL; Bilirrubina Indireta(BI): Criança: até 1,2 mg/dL, Adulto: até 0,8 mg/dL; Bilirrubina Total (BT): Criança: até 1,4 mg/dL, Adulto: até 1,0 mg/dL, Proteínas totais (PROT): RN: 4,6 a 6,8 g/dL, Lactente: 4,8 a 7,6 g/dL, Criança: 6,0 a 8,0 g/dL, Adulto: 6,6 a 8,7 g/dL; Albumina (ALB.): RN: 2,8 a 4,4, Criança: 3,8 a 5,4, Adulto: 3,4 a 4,8; Cálcio (Ca): RN: 0 a 10 dias: 7,6 a 10,4 mg/dL, 11 dias a 2 anos: 9,0 a 11,0 mg/dL, 2 anos a 12 anos: 8,8 a 10,8 mg/dL Adulto: 8,6 a 10,2 mg/dL, Magnésio (Mg): RN: 1,20 a 1,80 mEq/L, 5 meses a 6 anos: 1,42 a 1,88 mEq/L, 6 a 12 anos: 1,39 a 1,74 mEq/L, 12 a 20 anos: 1,35 a 1,77 mEq/L, Adulto: 1,30 a 2,10 mEq/L, Fósforo (P): RN: 4,5 a 9,0 mg/dL, Lactente: 4,5 a 6,7 mg/dL, Criança: 4,5 a 5,5 mg/dL, Adulto: 2,7 a 4,5 mg/dL; Creatinaquinase (CK): RN: 10 a 200 U/L, Adulto: Homem: até 170 U/L, Mulher: até 145 U/L, Creatinaquinase fração MB (CK-MB): até 24 U/L, Lipase (LIP): Adulto: Até 59 U/L; Amilase (Amil.): Inferior a 100 U/L; Vancomicina (VANCO.): Nível Tóxico: > 90 μ g/mL; Carbamazepina (CARBA): Nível Tóxico: > 15 μ g/mL, Amicacina (AMICA) Nível Tóxico: Pico: > 30 μ g/ml e Fenobarbital (FENO): Nível Tóxico: > 35 μ g/mL.

Utilizou-se o teste qui-quadrado, com nível de significância de 5%, para comparar as frequências entre A e NA e entre E e A.

RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Na tabela 1 podem ser observados que os exames mais prevalentes foram a U e CR nas E e nos A, e os menos prevalentes AMICA nas E e FENO nos A.

TABELA I

Distribuição e comparação entre resultados de exames alterados e não alterados solicitados nas enfermarias e nos ambulatorios do hc/unicamp

| ANALITOS | ENFERMIARIAS | | | AMBULATORIOS | | | |
|----------|--------------|----------|---------------|--------------|----------|---------------|---------------|
| | A (%) | NA (%) | valor p1 | A (%) | NA (%) | valor p2 | valor p3 |
| 1- COL | 33(64) | 67(64) | 0,006 | 42(2023) | 58(2023) | \leq 0,0001 | 0,951 |
| HDL-COL | 50(60) | 50(60) | 0 | 28(1745) | 72(1745) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| TG | 42(64) | 58(64) | 0,2 | 40(1996) | 60(1996) | \leq 0,0001 | 0,704 |
| LDL-COL | 58(66) | 42(66) | 0,193 | 76(1871) | 24(1871) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| GLI | 44(1022) | 56(1022) | 0 | 29(2788) | 71(2788) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| 2- CR | 31(4230) | 69(4230) | \leq 0,0001 | 23(3518) | 77(3518) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| U | 34(4231) | 66(4231) | \leq 0,0001 | 20(3482) | 80(3482) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| K | 17(4082) | 83(4082) | \leq 0,0001 | 12(2829) | 88(2829) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| Na | 23(4041) | 77(4041) | \leq 0,0001 | 4(2802) | 96(2802) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| AC. U | 57(91) | 43(91) | 0,181 | 48(858) | 52(858) | 0,241 | \leq 0,089 |
| 3- AST | 43(904) | 57(904) | 0 | 27(2640) | 73(2640) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| ALT | 48(1013) | 52(1013) | 0,202 | 30(2637) | 70(2637) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| GGT | 75(720) | 25(720) | \leq 0,0001 | 47(2894) | 53(2894) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| FALC | 97(722) | 3(722) | \leq 0,0001 | 96(2858) | 4(2858) | \leq 0,0001 | 0,284 |
| BD | 56(642) | 44(642) | \leq 0,0002 | 38(1012) | 62(1012) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| BI | 29(642) | 71(642) | \leq 0,0001 | 23(1008) | 77(1008) | \leq 0,0001 | \leq 0,007 |
| BT | 51(642) | 49(642) | 0,612 | 32(1014) | 68(1014) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| Prot. T | 75(210) | 25(210) | \leq 0,0001 | 24(260) | 76(260) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| ALB | 70(30) | 30(30) | 0,028 | 24(256) | 76(256) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| 4- Ca | 35(784) | 65(784) | \leq 0,0001 | 27(497) | 73(497) | \leq 0,0001 | 0,004 |
| Mg | 28(256) | 72(256) | \leq 0,0001 | 14(237) | 86(237) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| P | 35(270) | 65(270) | \leq 0,0001 | 34(648) | 66(648) | \leq 0,0001 | 0,774 |
| 5- CK | 50(248) | 50(248) | 0 | 26(269) | 74(269) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| CK-MB | 39(148) | 61(148) | \leq 0,007 | 4(15) | 96(15) | 0 | 0,951 |
| 6- LIP | 32(25) | 68(25) | \leq 0,071 | 18(17) | 82(17) | \leq 0,008 | 0,476 |
| AMIL | 49(188) | 51(188) | 0,783 | 26(360) | 74(360) | \leq 0,0001 | \leq 0,0001 |
| 7- VANCO | 80(46) | 20(46) | 0 | 100(2) | --- | --- | 1 |
| CARBA | --- | --- | --- | 5(21) | 95(21) | 0 | 0,954 |
| AMICA | 20(10) | 80(10) | \leq 0,047 | --- | --- | --- | --- |
| FENO | 5(18) | 95(18) | 0 | 9(11) | 91(11) | 0,006 | 1 |

A. = % alterados; NA. = % de não alterados; () = número de exames; blocos funcionais de exames: 1- Metabolismo de lipídios e glicídios; 2- Perfil Renal e eletrolítico; 3- Perfil Hepático; 4- Perfil Cardíaco; 5- Enzimas; 6- Drogas; 7- Teste Qui-quadrado: valor p1= compara resultados alterados com os não alterados das enfermarias; valor p2= compara resultados alterados com os não alterados dos ambulatorios; valor p3= compara resultados alterados das enfermarias com alterados dos ambulatorios

Como esperado a frequência total de resultados alterados nas E foi igual a 44% (28.502 enfermarias) e 1,5 vezes mais alta do que nos ambulatórios, igual a 30% (51.624 de ambulatório). Entretanto observando-se as frequências de alterados entre E e A 28,6% (8 dos 28 parâmetros) estas foram surpreendentemente semelhantes para Col, TG, Ac. U, F ALC, P, CK-MB, LIP, VANCO, CARBA e FENO.

Nas E as frequências semelhantes entre alterados e não alterados ocorreram inesperadamente em 48% (14 entre 29) dos parâmetros, (HDL-Col, TG, LDL-Col, Gli, Ac. Ú, AST, ALT, BT, CK, AMI, VANCO, AMICA, FENO), diferentemente dos A onde ocorreu semelhança em apenas 11,7% (3 de 28) dos testes, (Ac. Ú, CK-MB e CARBA).

Salientam-se as altas frequências médias observadas de resultados de exames não alterados, 56% entre E e 70% em A, que refletiram provavelmente um excesso de solicitações de ambas as origens. Também, exames com frequências iguais entre alterados e não alterados e igual de alterados nas E e A sugerem a ocorrência de um número de solicitações excessivo.

Observando-se o sódio, este esteve fora dos limites de referência em apenas 4% de 2802 exames/mês. Em outro extremo, exames como a fosfatase alcalina apresentaram alta proporção de resultados alterados: 97% nas enfermarias e 96% nos ambulatórios. Ainda chamaram, a atenção exames com distribuição mais equilibrada entre alterados e não alterados com uma média de alterados de cerca de 40% e de não alterados de 60% tais como a glicose nas enfermarias e o colesterol e a gama-glutamyltransferase nos ambulatórios.

Outro dado desta análise que também surpreende é o número de testes/paciente/ mês que foi igual a 120 (80123/650). Também, foi a igualdade entre enfermarias e ambulatórios no número de solicitações médicas por paciente/dia que foi igual a 6 testes.

DISCUSSÃO

Estudos retrospectivos como este que são econômicos e avaliam as solicitações médicas hospitalares de exames laboratoriais mais prevalentes, podem ser utilizados no controle de gastos hospitalares desnecessários.

Gostaríamos de ressaltar que além da discrepância de solicitações o número de exames total solicitado é muito alto e vários médicos utilizam o menu de exames de urgência da Seção de Bioquímica Clínica para solicitar exames de rotina. Estes resultados reforçam a importância de uma educação médica continuada para o conhecimento sobre a indicação, a solicitação e a interpretação de testes como a sua capacidade diagnóstica, a necessidade de checagem dos resultados anteriores do paciente e o fundamental conhecimento de seu custo/benefício. O uso do código internacional de doenças (CID) pode corrigir muitos erros de solicitação e permite que se monitore este processo.

Estes resultados também realçam a importância do papel primordial dos profissionais do laboratório clínico que na sua interação com o corpo clínico do hospital propiciam discussões continuadas que poderão desonerar o sistema de saúde pública.

Salientou-se um ponto importante. Os profissionais e usuários do laboratório neste hospital devem atingir um ponto de equilíbrio na balança entre as solicitações adequadas e

baseadas em evidências diagnósticas e o uso correto dos resultados para o diagnóstico do paciente exigindo impecável qualidade do teste.

Entretanto, frequentemente, os exames solicitados desnecessariamente segundo a história clínica e o(s) diagnóstico(s) do paciente, podem ter fins didáticos e justificados, quando originados de um hospital escola, onde uma grande população discente exerce atividades de formação profissional (4). Mas, quando tal fato for necessário, a tomada de consciência pelos solicitantes alunos, médicos e docentes deve existir e estar justificada pelos docentes responsáveis.

CONCLUSÃO

Para que a grande maioria dos pacientes tenha do Hospital de Clínicas da Unicamp a melhor qualidade de diagnóstico e tratamento, os profissionais da saúde nele inseridos não poderão nunca perder de vista as metas do custo/benefício reduzido, para a manutenção da adequada saúde financeira do hospital facilitando o seu crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às Sras. Carmem Lucia Mansano do Centro de Processamento de Dados do HC e Mirian Danelon pelo excelente apoio técnico e à equipe da Seção de Bioquímica Clínica do HC/Unicamp pela qualidade, fundamental na realização do diagnóstico laboratorial.

REFERÊNCIAS

- 1-Burtis, C.A.; Ashwood, E.R.; Bruns, D.E. Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Missouri, St. Louis. Elsevier Saunders, 2006
- 2- Kawai, T. Evidence-based laboratory medicine--a new trend in laboratory medicine. Rinsho Byori, v. 48, n. 3, 191-9, 2000.
- 3- Mc Queen, M. J. Evidence-based medicine: its application to laboratory medicine. Ther drug monit, v.22, n. 1, p. 1-9, 2000.
- 4- Brenites-Bribiesca, L. Is evidence based medicine a new paradigm in medical teaching? Gac Med Mex, v. 140, Suppl 1, p. 31-6, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Eliana Cotta de Faria, MD, MS, PhD.

Departamento de Patologia Clínica - Universidade Estadual de Campinas

Rua Tessália Vieira de Camargo,126; Barão Geraldo

CEP 13.083-775 Campinas - SP

Endereço eletrônico: cotta@fcm.unicamp.br

Telefone: (19) 3521-7064 Fax: (19) 3521-9434

Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de β -lactamases do tipo AMP-C em isolados clínicos de Santa Maria – RS*

Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* AMP-C β -lactamases in clinical isolates of Santa Maria-RS

Ana Paula Mortari, Éder Moraes Saucedo, Renata da Silva Pereira, Marta Duarte,
Bruno Stefanello Vizzotto & Roberto Christ Vianna Santos

RESUMO - Os mecanismos de resistência bacteriana são complexos e variados. Por isto, a importância do profissional do laboratório de Microbiologia proporcionar informações claras ao clínico, reportando corretamente os resultados, para que o tratamento seja eficaz e o mais seguro possível, evitando-se assim, a falha terapêutica e a resistência microbiana. As β -lactamases são enzimas que catalizam a hidrólise de ligações carbono-nitrogênio, separando a base do substrato inativando os antimicrobianos β -lactâmicos acarretando em falha terapêutica. Neste trabalho analisou-se 90 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de isolados clínicos de Santa Maria-RS. Empregou-se a técnica de disco difusão (Kirby-Bauer), com aproximação dos discos de Cefoxitina e Cefotaxima, onde 31 cepas (34,4%) apresentaram positividade *in vitro* para a produção de β -lactamases do tipo Amp-C. As cepas do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *Providencia* sp., *Serratia marcescens*) apresentam resistência à Cefoxitina no antibiograma e não necessitariam de testes especiais para a detecção, uma vez que a enzima é produzida de forma constitutiva. Porém, alguns isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, devido à produção de Amp-C em pequenas quantidades, podem apresentar sensibilidade *in vitro* à Cefoxitina, mas *in vivo* este antimicrobiano não terá ação ou sua ação será reduzida, ocasionando falha terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE - Resistência bacteriana, β -lactamases do tipo Amp-C, *Pseudomonas aeruginosa*, Santa Maria-RS

SUMMARY - The mechanisms of bacterial resistance are complex and varied. Therefore, it is important that microbiology laboratory professionals provide clear information to the physician, so that the treatment be efficient and as safe as possible to avoid microbial resistance. β -lactamases are enzymes that catalyze the hydrolysis of carbon-nitrogen bonds, which separates the base from the substrate and inactivates the β -lactamic agents, leading to the treatment's failure. In this study, 90 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from Santa Maria-RS. Disk diffusion (Kirby-Bauer) with Cefoxitin and Cefotaxime was used, where 31 (34.4%) presented a positive result *in vitro* for Amp-C β -lactamases. Strains of the CESP group (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *Providencia* sp., *Serratia marcescens*) presented resistance to Cefoxitin and did not need special tests for detection, as the enzyme is produced in a constitutive form. However, some isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, due to the production of Amp-C in small quantities, can present sensibility to Cefoxitin *in vitro*, but *in vivo* this antimicrobial agent will not have action or will present reduced action, causing therapeutic failure.

KEYWORDS - Bacterial resistance, Amp-C β -lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*, Santa Maria-RS

INTRODUÇÃO

O tratamento das infecções bacterianas é realizado com maior segurança e eficácia, se for baseado no resultado da cultura microbiológica e complementada com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, de amostras representativas do foco infeccioso. Em alguns casos, o clínico necessita iniciar o tratamento antes que os resultados do laboratório estejam disponíveis. Esta situação é denominada *terapia empírica* (BURTON e ENGELKIRK, 1998).

Nesta circunstância, a seleção de um determinado antimicrobiano deve se basear na experiência prévia sobre os tipos causadores da infecção e sua sensibilidade. Selecionar um medicamento dessa forma é limitado pelo surgimento de resistência bacteriana, que varia com a região geográfica, o tempo e extensão de uso de cada antimicrobiano (KONEMANN, 2001). A escolha da terapêutica empírica é extremamente importante, pois uma evolução clínica desfavorável poderá ocorrer se a terapêutica antimicrobiana adequada for retardada. Vários critérios podem ser utilizados para facilitar a escolha da terapêutica antimicrobiana empírica. O reconhecimento dos patógenos mais prováveis parece ser um dos principais fatores, porém os resultados do perfil de resistência e de testes adicionais de detecção da produção de β -lactamases por estes patógenos devem ser obtidos através de estudos de vigilância locais e regionais e considerados na escolha da terapêutica antimicrobiana empírica.

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos é decorrente da produção de β -lactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando, assim, a sua atividade antimicrobiana (LIVERMORE, 1995). Qualquer antimicrobiano ou grupos de antimicrobianos β -lactâmicos podem ser inativados por essas enzimas. Os testes para detecção de resistência devem ser realizados em microrganismos isolados de amostras clínicas representativas de um processo infeccioso, no qual a sensibilidade aos antimicrobianos não é previsível. Sendo assim, a avaliação da resistência aos antimicrobianos é uma das principais e mais importantes funções do Laboratório de Microbiologia Clínica (OPLUSTIL, 2004). As cepas produtoras de β -lactamase do tipo Amp-C são denominadas cromossômicas e plasmidial. Espécies do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp, *Serratia marcescens* e *Providencia* sp.) e *Pseudomonas aeruginosa* são produtoras de β -lactamases induzíveis (Amp-C). As cepas produtoras de Amp-C induzíveis podem, eventualmente, expressar sensibilidade no antibiograma, enquanto cepas mutantes expressam resistência. A expressão de sensibilidade ou resistência, *in vitro*, depende da concentração enzimática (ROSSI E ANDREAZZI, 2005).

Os isolados deste grupo, ao serem expostos a um agente indutor, geralmente um β -lactâmico, desreprimem o agente AmpC e a bactéria começa a produzir quantidades elevadas de Amp-C (OPLUSTIL, 2004). Estas enzimas têm a

Recebido em 15/03/2007

Aprovado em 10/03/2008

*Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Universitário Franciscano – UNIFRA

particularidade de expressar-se habitualmente em níveis baixos (estado induzível) e incrementar suas sínteses na presença de determinados antimicrobianos β -lactâmicos (fenômeno de indução). A expressão permanente do nível elevado de enzima (estado desreprimido), que determina resistência das cefalosporinas de terceira geração, se produz por mutações nos genes reguladores. Estes mutantes podem selecionar-se durante o tratamento com determinados antibióticos β -lactâmicos (RODRIGUEZ *et al*, 2001).

Quando o indutor é removido, a produção de β -lactamase AmpC retorna aos níveis basais e o organismo pode recuperar a sensibilidade (ROSSI E ANDREAZZI, 2005), porém, algumas células continuam a produzir a enzima em concentrações elevadas, de forma constante, mesmo na ausência do indutor (OPLUSTIL, 2004).

Este estudo teve como objetivo detectar β -lactamases do tipo Amp-C e determinar sua prevalência em isolados clínicos de amostras provenientes de Santa Maria-RS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Após identificação dos microrganismos, através de métodos de automação e determinados seu perfil de resistência, 90 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Clínica do Curso de Farmácia da UNIFRA, para a detecção da produção de Amp-C. As amostras foram coletadas com swabs, identificadas e transportadas em meio de cultura de transporte (Stuart). Em seguida, os swabs foram retirados do meio de cultura de transporte e inoculados em meio de cultura Ágar MacConkey e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Decorrido o tempo necessário de incubação, foram preparadas suspensões bacterianas em solução fisiológica estéril até se obter turvação de 0,5 na escala MacFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, onde, com auxílio de swab estéril embebido na suspensão, foi semeado, na superfície de placas contendo o meio de cultura Agar Mueller Hinton. Posteriormente, foram adicionados discos de papel impregnados de antimicrobianos (Cefotaxima e Cefoxitina - Laborclin) com auxílio de uma pinça flambada e resfriada a uma distância de 20 mm entre os discos.

O resultado foi considerado positivo quando observado um achatamento do halo da cefotaxima e considerado negativo quando não houve achatamento do halo.

Os materiais biológicos que restaram de outros procedimentos e que habitualmente seriam descartados, mas ainda podendo ser utilizado na pesquisa são de uso permitido, desde que o pesquisador não tenha acesso a qualquer forma de identificação do indivíduo doador, sendo assim possível a utilização do material sem o consentimento informado (FRANCISCONI, 2003). As amostras apenas foram utilizadas para os objetivos do trabalho e, após análises, foram imediatamente desprezadas. Houve o comprometimento ao sigilo através da assinatura de um Termo de Confidenciabilidade.

RESULTADOS

As amostras foram provenientes de diferentes sítios infecciosos, como pode ser visto na tabela 1.

TABELA I
Freqüência das amostras analisadas.

| Amostra | Freqüência | % |
|---------------------------|------------|------|
| Secreção traqueal | 32 | 35,3 |
| Escarro | 12 | 13,2 |
| Urina | 12 | 13,2 |
| Fezes | 9 | 10 |
| Lavado brônquico alveolar | 8 | 9,6 |
| Lesões cutâneas | 10 | 11,1 |
| Outros | 7 | 7,6 |
| Total | 90 | 100 |

Observou-se que das 90 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* analisadas e enviadas ao Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Universitario Franciscano, 31 (34,4%) apresentaram positividade *in vitro* para a produção de β -lactamases do tipo Amp-C (Tabela 2).

TABELA II
Relação da freqüência do sítio das amostras positivas

| Amostra | Freqüência | % Amp-C |
|------------------------|------------|---------|
| Secreção traqueal | 10 | 11,1 |
| Escarro | 3 | 3,3 |
| Urina | 5 | 5,6 |
| Fezes | 5 | 5,6 |
| Lavado bronco-alveolar | 2 | 2,2 |
| Lesões cutânea | 3 | 3,3 |
| Outros | 3 | 3,3 |
| Total | 31 | 34,4 |

DISCUSSÃO

A emergência de cepas com variáveis e crescentes níveis de resistência aos antimicrobianos tem se tornado motivo de preocupação; por isso, vários estudos estão sendo realizados com o intuito de caracterizar a resistência e estabelecer fatores de risco para sua ocorrência. O fenômeno é complexo e têm múltiplas causas, algumas já bem determinadas, outras ainda a serem esclarecidas. Dentre os fenômenos que estão definitivamente vinculados à emergência de resistência está o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos (BERQUÓ *et al*, 2004).

As taxas de resistência à cefotaxima e à cefalosporinas de terceira geração em geral, entre bacilos Gram-negativos são 18,6% na China e 19% no Japão. Isso ocorre devido provavelmente à produção de β -lactamases do tipo Amp-C e o uso inadequado de antimicrobianos (ZHANG *et al*, 2001). O fenômeno da resistência bacteriana é um problema global e bem conhecido nos ambientes hospitalares; entretanto, os microrganismos responsáveis por infecções tipicamente de comunidade começaram a mostrar crescentes níveis de resistências. (KUNIN, 1993).

Em um estudo da vigilância nosocomial em infecções sanguíneas conduzido em 1995 até 1996 nos Estados Unidos, como parte do programa do SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance*), descre-

veu-se o perfil da sensibilidade antimicrobiana das espécies de Enterobacteriaceae (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, e *S. narcescens*) capazes de produzir β -lactamase do tipo Amp-C. Em 12 meses de estudos foram analisadas 4725 amostras, onde 30,0% foram resistentes a cefotaxima (PFALLER *et al*, 1997).

A Organização Mundial da Saúde (WHO/OMS) já demonstrou sua preocupação com o tema em seu relatório de grupo de trabalho sobre resistência antimicrobiana, em seu encontro de 1983. Desde então, várias iniciativas têm surgido com o intuito de avaliar e controlar a emergência da resistência em todo o mundo (BERQUÓ *et al*, 2004).

No Brasil, estudos feitos na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – Ceará em 2002, das 14 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram resistência total a cefotaxima, ampicilina, tetraciclinas. Há uma seleção cada vez maior de cepas expressando resistência (MENEZES *et al*, 2004). Em espécies como *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp. e *Pseudomonas* sp., as β -lactamases são normalmente produzidas em pequenas quantidades, porém a produção pode aumentar significativamente quando os organismos são expostos a alguns β -lactâmicos (SADER *et al*, 1998). A administração intensiva de antimicrobianos, comum em ambiente hospitalar, tem sido relacionado com resistência bacteriana a estes medicamentos (MARTINEZ *et al*, 1996). A automedicação é um fenômeno potencialmente nocivo à saúde individual e coletiva, pois nenhum medicamento é inócuo ao organismo e o uso indevido pode acarretar diversas conseqüências com a resistência bacteriana, hipersensibilidade entre outras (VILARINO, 1998).

Embora não haja correspondência perfeita entre o resultado do teste *in vitro* a antimicrobianos e a eficácia terapêutica *in vivo*, o antibiograma é um dos principais norteadores do uso desses fármacos na prática médica. Considerando as dificuldades terapêuticas trazidas pela resistência bacteriana, é fundamental preservar a vida útil de alguns antimicrobianos, restringindo seu emprego a casos com indicação clínica, microbiológica ou farmacológica especial ou, ainda, quando não existe outra opção anti-infecciosa (MARTINEZ *et al*, 1996).

Existe grande dificuldade por parte do laboratório clínico em abordar esse tipo de resistência, por ser induzível, ou seja, a produção da β -lactamase somente ocorrerá após a introdução terapêutica antimicrobiana. Na prática, a avaliação do teste de sensibilidade do microrganismo antes do início da terapia mostra sensibilidade à maioria dos β -lactâmicos, e, quando o paciente fizer uso de um β -lactâmico, a resistência irá se expressar com possibilidade de falha terapêutica (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

O estudo mostrou um número elevado de cepas que hiperproduzem β -lactamases Amp-C, caracterizando uma exposição do paciente a um β -lactâmico, a cepa poderá apresentar-se resistente, o que ocorre em pacientes já tratados ou que se contaminaram com uma cepa que sofreu exposição anterior (infecção hospitalar). O uso isolado de cefalosporinas de segunda e terceira geração deve ser desencorajado para o tratamento, especialmente de infecções com alto inóculo bacteriano, como pneumonias, bacteremias de origem desconhecida e abscessos, mesmo que no antibiograma seja demonstrada sensibilidade.

A produção de β -lactamases é um mecanismo extremamente importante e prevalente de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. O desenvolvimento de novos medicamentos tem se direcionado para o desenho de compostos mais estáveis a hidrólise por essas enzimas. É importante ressaltar que o uso indiscriminado ou inadequado de novos antimicrobianos pode favorecer o aumento mais rápido da taxa de resistência, não somente aos antimicrobianos de amplo espectro como

também aos antimicrobianos relacionados estruturalmente, dificultando ainda mais o combate às bactérias multirresistentes. Espera-se que os resultados obtidos fundamentem as decisões no âmbito da área médica, no sentido de introduzir mudanças na rotina de exames incluindo o teste para a detecção de β -lactamases do tipo Amp-C.

CONCLUSÃO

Com a metodologia empregada para a detecção de β -lactamases do tipo Amp-C (método de disco difusão de Kirby Bauer, utilizando a aproximação dos discos de cefotaxima e cefoxitina) demonstrou-se que em 34,4% das amostras (31/90) houve achatamento do halo, caracterizando a positividade para β -lactamases do tipo Amp-C. Portanto, nesta situação o laudo do antibiograma deveria ser liberado com uma nota de rodapé informando que a cepa é produtora de β -lactamase induzível, em que a terapia com penicilinas de amplo espectro, associadas ou não aos inibidores de β -lactamase, monobactams e cefalosporinas de 1° a 3° gerações, está associada a falha terapêutica (ROSSI E ANDREAZZI, 2005).

REFERÊNCIAS

- BERQUÓ, L. S.; BARROS, A. J. D.; LIMA, R. C. L.; BERTOLDI, A. D. Use of antimicrobial drugs in an urban population. *Rev. Saúde Pública*, 38(2): 239-246, 2004.
- BURTON, Gwendolyn R. W.; ENGELKIRK, Paul G. *Microbiologia para as ciências da saúde*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan , 1998.
- FRANCISCONI Carlos Fernando, GOLDIM, José Roberto. Termo de Consentimento Informado para Pesquisa Auxílio para a sua Estruturação. Porto Alegre (RS): UFRGS, 2003. Disponível em: <http://www.ufrg.br/bioetica/cons-pesq.htm>. Acesso em 30.09.2006.
- KONEMAN, Elmer W., ALLEN, Stephen, JANDA, William M. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- KUNIN, C. Resistance to antimicrobial drugs- a worldwide calamity . *Ann Int Med* 118:557-61. 1993.
- LIVERMORE, D.M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol Rev.*, v. 8: 557-84, 1995.
- MARTINEZ, R.; GIRONI, R. H. A. R.; SANTOS, V. R. Bacterial susceptibility to antimicrobial drugs used in medical practice – Ribeirão Preto – SP – 1994. *Medicina*, Ribeirão Preto, 29: 278-284, abr/set. 1996.
- MENEZES, E. A.; MACEDO, F. V. V.; CUNHA, F. A.; ANDRADE M. S. S.; & ROCHA, M. V. A. P.; Infection and antimicrobials profile resistance from Nonfermentative Gram Negative Bacilli isolated in the Patological Clinic Laboratory Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia, Fortaleza, Ceará. *Rev Brasileira de Análises Clin.* v. 36(4), p. 209-212, 2004.
- OPLUSTIL, C. P.; *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004.
- PFALLER, M. A.; JONES R.N.; MARSHALL S.A.; COFFMAN S.L.; HOLLIS R.J.; EDMOND M.B.; WENZEL R.P. Inducible Amp-C β -Lactamase producing Gram-negative bacilli from blood stream infections: frequency, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology in a National Surveillance Program (SCOPE). *Diagn Microbiol Infect Dis* 28: 211 – 219, 1997.
- RODRÍGUEZ, J. A. G.; CABACHO, A.; PLANES, A. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2001.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana. Interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.
- SADER, H.S.; MENDES C.M.F.; MONTELLI^ª; SAMPAIO, J.; SEGURA^ªJ.; KESSELRING G.L.F.; COSTA L.; RIBEIRO J.E.F.; MAMIZUKA E.; MIMIÇA I. Atividade antimicrobiana *in vitro* da cefiproma em comparação com outros β -lactâmicos de amplo espectro contra 804 amostras clínicas de nove hospitais brasileiros. *Rev. Ass. Méd. Brasil*, 44 (4): 283-288, 1998.
- VILARINO, J. F.; Soares I.C.; Silveira C.M.; Rödel, P.P.; Bortoli R.; Lemos R.R. Perfil da automedicação em município do Sul do Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 32(1): 43-49, 1998.
- ZHANG, Y. L., LI, J. T, ZHAO, M. W. Detection of Amp C in *Enterobacter cloacae* in China. *J of Antimicrob Agents*, 18: 365-371, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Professor Roberto Christ Vianna Santos
Centro Universitário Franciscano – UNIFRA
Laboratório de Microbiologia Clínica
Rua dos Andradas, 1614, Prédio 4 – Sala 115-B
Cep: 97010-032 Santa Maria - RS
Fone: (55)3220-1200

Avaliação da taxa de isolamento de micoplasmas do trato urogenital por um método comercial em comparação com meios de cultura produzidos no próprio laboratório

Assessing the rate of isolation of mycoplasma treatment of urogenital by a business method in compared with media culture produced in itself laboratory

Eduardo M. Dalmarco, Solange L. Blatt, Caio M. M. de Cordova

RESUMO - Este trabalho procurou avaliar a taxa de isolamento de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum/U. parvum* em amostras de conteúdo vaginal de 84 mulheres atendidas em um laboratório de análises clínica de Blumenau – SC, por dois meios de cultura de procedência diferentes. Os resultados demonstraram 50,0 % de positividade para *Ureaplasma urealyticum/U. parvum* e 20,24% de positividade para *Mycoplasma hominis* por cultura em meio feito em nosso laboratório ($P < 0,0001$) e 16,67% de positividade para *U. urealyticum* e 8,33% de positividade para *M. hominis* por cultura em meio comercial ($P < 0,0001$). As amostras que foram cultivadas por meio próprio e obtiveram resultado positivo foram também analisadas por diluições seriadas para identificar a quantidade destes microrganismos expresso em C.C.U. (*color changing units*). Os resultados demonstraram que 52,94% destas amostras apresentaram C.C.U. maior que 10^4 para *M. hominis* e 42,86% apresentaram C.C.U. maior que 10^3 para *U. urealyticum*, sendo estes os níveis considerados clinicamente significativos para que a presença destes microrganismos seja implicada na etiologia dos sintomas. No presente trabalho discutiu-se as possíveis causas desta diferença de positividade entre os dois métodos utilizados.

PALAVRAS-CHAVE - micoplasma, ureaplasma, DST, gestantes

SUMMARY - The aim of this work was to evaluate the positivity rate of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum/U. parvum* infection in vaginal content samples of 84 women who attended a clinical laboratory in Blumenau – SC, Brazil, through two distinct culture methods. Our results showed a positivity rate of 50.0 % for *Ureaplasma urealyticum/U. parvum* and 20.24% for *Mycoplasma hominis* by culture with medium produced in our laboratory ($P < 0,0001$), and a positivity of 16.67% for *U. urealyticum* and 8.33% for *M. hominis* with a commercial culture media ($P < 0,0001$). Samples that showed mollicute growth in our laboratory-produced media were also analyzed through serial dilutions to quantify the bacterial load in C.C.U. (*color changing units*). Our results showed that 52.94% of these samples had more than 10^4 C.C.U. of *M. hominis*, and 42.86% had more than 10^3 C.C.U. for *U. urealyticum/parvum*, which are the levels considered clinically significant to input to these microorganisms the etiology of the symptoms. In this paper we discuss the possible causes for the difference observed among the mollicutes prevalence with the two methods used.

KEYWORDS - mycoplasma, ureaplasma, STD, pregnancy

INTRODUÇÃO

A incidência de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) teve um declínio na década de 1980 e no início da década de 1990, refletindo as mudanças no comportamento sexual em resposta a epidemia da infecção pelo HIV. Mas, esta tendência não foi mantida e, a partir de 1994, observou-se a reincidência das patologias de transmissão sexual. Gravidez, nascimento a termo e fertilidade são afetadas pela presença de DTS, tornando-se fundamental a investigação de microrganismos como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Cândida sp*, *Trichomonas vaginalis*, e os micoplasmas ou mollicutes (4).

Duas espécies de mollicutes merecem destaque nas infecções do trato genital: *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, adquiridas principalmente por contato sexual. Ambas têm sido encontradas tanto no homem quanto na mulher em infecções do trato genitourinário inferior. *Ureaplasma urealyticum* é responsável por casos de uretrite não gonocócica e vaginose bacteriana. Foi associado à febre pós-parto, corioamnionite e baixo peso ao nascimento. *U. urealyticum* era classicamente dividido em 14 sorotipos e estes agrupados em dois sorogrupos (13). Atualmente, encontra-se definida uma nova espécie: *U. parvum*, que engloba os sorotipos que pertenciam ao sorogrupo 1, microbiologicamente indistinguível da espécie *U. urealyticum* (2). *Mycoplasma hominis* é uma das causas de uretrite não gonocócica e vaginose bacteriana, associado à febre pós-aborto e pós-parto (3). Também é uma causa incomum de

bacteremia (8), artrite (9), peritonite (7), meningite (11,15), feridas infectadas (5), osteomielite e outras infecções pouco usuais (6,16).

Mc Cormack e colaboradores demonstraram que as taxas de colonização por *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* em homens variava de zero a 13% e de 3% a 56%, respectivamente. Dados similares em mulheres demonstraram que as taxas de colonização vaginal por *M. hominis* e *U. urealyticum* variavam de zero a 31% e de 8,5% a 77,5%, respectivamente, segundo a idade, raça, experiência sexual e nível sócio econômico (4).

A cultura dos micoplasmas é um procedimento microbiológico razoavelmente simples, entretanto, alguns cuidados devem ser tomados. A coleta do material deve ser feita em sítio adequado (fundo do saco posterior), pois trata-se de uma região com baixa tensão de oxigênio, propícia para o crescimento destes microrganismos. Tem-se observado alguns laboratórios coletando amostras para cultura de micoplasmas do endocervice do colo uterino. Outro aspecto delicado são os próprios meios de cultura que, para apresentar uma taxa de isolamento adequada, devem ser preparados com componentes que aumentam significativamente o seu custo de produção, fazendo com que realmente os meios comerciais tenham um preço bastante elevado. Temos observado também que alguns laboratórios, na tentativa de diminuir estes custos, têm realizado as culturas com adaptações dos métodos e proporção inóculo/meio de cultura, de maneira empírica, fora das recomendações dos fabricantes. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a taxa

Recebido em 28/03/2007

Aprovado em 18/03/2008

Universidade Regional de Blumenau – FURB, Departamento de Ciências Farmacêuticas

de isolamento de micoplasmas e ureaplasmas em mulheres atendidas em um Laboratório de Análises Clínicas, por um método comercial, utilizando os procedimentos rotineiros estabelecidos nesse laboratório, em comparação com a cultura em meios produzidos em nosso laboratório de pesquisa na universidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Foram coletadas amostras de conteúdo vaginal de mulheres atendidas em um laboratório de análises clínicas do município, por raspado do fundo do saco posterior, com auxílio de swab estéril. As amostras foram mantidas em 2 mL de meio de transporte A3xb, produzido no Laboratório de Análises Clínicas de nossa Universidade, para cultura imediata de micoplasmas (12). Do mesmo sítio, foi coletada uma amostra adicional, mantida no meio de transporte comercial fornecido pelo fabricante (NewProv, Curitiba, PR), para cultura no laboratório privado.

Cultura de micoplasmas:

a) Meio próprio: As amostras obtidas no referido laboratório e mantidas em meio de transporte foram cultivadas de acordo com Taylor-Robinson (12), com algumas modificações, no Laboratório de Análises Clínicas da universidade. Foram inoculados 0,1 mL de amostra no meio sólido A7, e 0,5 mL de amostra em 2,0 mL de meio líquido U10 e de meio líquido de Arginina (MLA), com incubação em condições de 2-3% de CO₂ por até sete dias a 37 °C. As amostras foram quantificadas pelo método de microtitulação (12), em seus respectivos meios líquidos. As culturas que não apresentaram crescimento em após 7 dias de cultivo foram consideradas negativas (1).

b) Meio Comercial: Da mesma forma, as amostras em meio de transporte comercial foram inoculadas nos respectivos meios de cultura (NewProv, Curitiba-PR), de acordo com o procedimento padronizado no laboratório privado.

Análise estatística: Para as análises de significância estatística, foi utilizado o programa Microsoft Excel (Microsoft), e o Teste do chi quadrado, com o auxílio do programa GraphPad InStat™ (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Foram analisadas 84 amostras de pacientes do sexo feminino, atendidas no período de julho a novembro de 2004, através de dois métodos de cultura, sendo que os microrganismos foram identificados inicialmente pela morfologia colônias em meio sólido, conforme a figura 1.

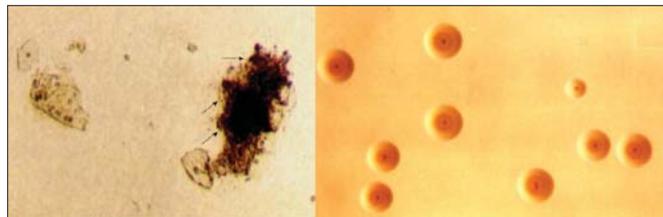


Figura 1 - Colônias de *Ureaplasma urealyticum* (esquerda) e *Mycoplasma hominis* (direita) isoladas de amostras de conteúdo vaginal em meio sólido A7, observadas ao microscópio ótico em aumento de 400 x.

Do total de amostras analisadas, 8,33% apresentaram resultado positivo para *M. hominis* pelo método comercial,

enquanto que 20,24% das amostras tiveram resultado positivo método próprio ($P < 0,0001$). Com relação à presença de *U. urealyticum*, 16,67% das amostras apresentaram resultado positivo pelo método comercial, enquanto que 50% foram positivas pelo método próprio ($P < 0,0001$, figura 2).

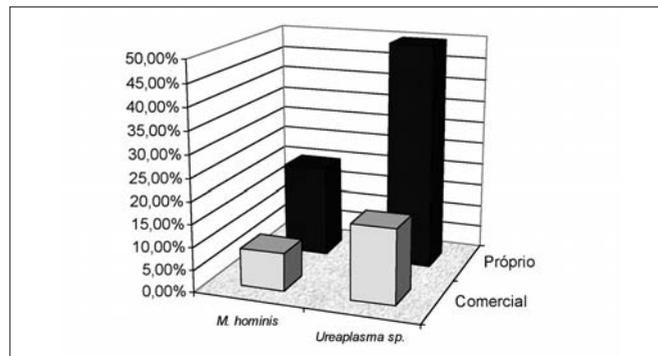


Figura 2 - Representação gráfica da comparação da positividade da cultura para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma sp.* com o método comercial e com o método próprio.

Das amostras analisadas pelo método próprio, que apresentaram resultado positivo para *M. hominis*, 52,94% apresentaram número de microrganismos expresso em CCU (*color changing units*) por mililitro, maior do que 10⁴, e 47,06% das amostras analisadas apresentaram número de microrganismos menor que 10⁴ CCU/mL. Das amostras que apresentaram resultado positivo para ureaplasma, analisadas pelo método próprio, 42,86% apresentaram o número de microrganismos maior que 10³ CCU/mL e 57,14% das amostras analisadas apresentaram o número de microrganismos menor que 10³ CCU/mL (figura 3).

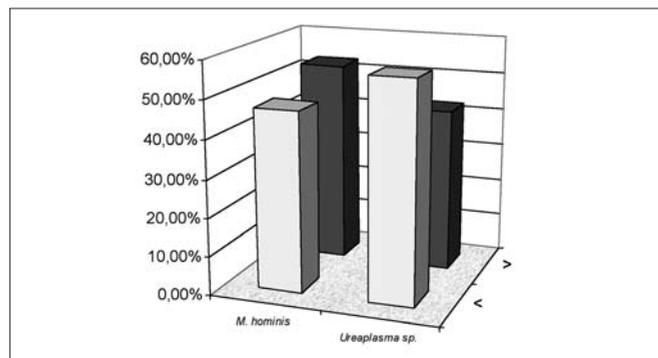


Figura 3 - Representação gráfica do número de microrganismos presentes na cultura para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma sp.* pelo método próprio, maior ou igual que 10⁴ CCU/mL (>) ou menor que 10⁴ CCU/mL (<) para *M. hominis*, e maior ou igual que 10³ CCU/mL (>) ou menor que 10³ CCU/mL (<) para *Ureaplasma sp.*

Comparando as amostras positivas para *U. urealyticum*, 34,53% apresentaram resultado positivo pelo método próprio e negativo pelo método comercial, dentre estas 51,73% apresentaram um resultado quantitativo maior que 10³ CCU/mL. Fazendo a mesma comparação com amostras positivas para *M. hominis*, 14% das amostras analisadas apresentaram resultado positivo pelo método próprio e negativo pelo método comercial, sendo que destas 54,55% apresentaram resultado quantitativo maior do que 10⁴ CCU/mL.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, observamos que as amostras analisadas pelo método próprio obtiveram resul-

REFERÊNCIAS

tados positivos para ambos microrganismos referidos, superiores aos das amostras analisadas pelo método comercial, indicando maior eficiência do método próprio. Estes resultados são estatisticamente significativos ($P < 0,0001$).

Uma das explicações para estes resultados poderia ser a dificuldade técnica da produção dos meios de cultura, como por exemplo, uso de quantidade insuficiente de certos componentes, conservação inadequada das matérias primas utilizadas na produção ou, mesmo, controle da qualidade ineficaz das matérias primas e/ou do meio de cultura após a produção.

Os micoplasmas e ureaplasmas necessitam de extrato de levedura fresco para o crescimento, pois precisam de precursores de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, e compostos altamente instáveis como NAD e FAD, sendo incapazes de produzi-los. O soro de cavalo utilizado também é um fator que pode causar interferência na qualidade do meio, e deve ser testado em culturas de células para a detecção de eventuais inibidores de crescimento dos microrganismos, como, por exemplo, anticorpos (10). Os mollicutes são muito sensíveis a inibidores presentes em determinados lotes de soro de cavalo, no extrato de levedura e no próprio meio base (14), o que poderia justificar o não crescimento destes microrganismos através do método comercial.

Entretanto, vale ressaltar que, em virtude do alto custo da aquisição dos meios comerciais, já prontos para uso, o laboratório que realizava as culturas testadas no presente estudo utilizava, empiricamente, a metade do meio líquido preconizado pelo fabricante para cada cultura (1 mL dos 2 mL recomendados).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a incidência de *U. Urealyticum* foi de importante significado clínico, pois 50% das amostras analisadas pelo método próprio apresentaram resultado positivo. Este resultado é semelhante aos de outros estudos realizados com as mesmas características, que gira em torno de 60% de mulheres portadoras deste microrganismo. Além disso, 52,94% das amostras analisadas apresentaram resultado superior a 10^3 CCU/mL, o que é considerado infecção significativa.

A incidência de *M. hominis* foi de 20,24% do total das amostras analisadas, o que foi semelhante a de outros estudos, onde esta incidência gira em torno de 30%. Além disto, 52,54% das amostras que apresentaram resultado positivo pelo método próprio para este microrganismo demonstraram resultado superior a 10^4 CCU/mL, o que pode ser considerado como infecção clinicamente significativa por *M. hominis*.

Como se pode notar, o desempenho de diferentes métodos pode influir significativamente na taxa de isolamento dos micoplasmas, patógenos de importância clínica indiscutível atualmente. Cerca de metade das pacientes que procuraram o laboratório privado para a realização de cultura para micoplasmas tinham níveis de infecção clinicamente significativos.

Eventualmente, na tentativa de diminuir os custos, alguns laboratórios podem implantar modificações empíricas nas técnicas, que podem até apresentar certa lógica. Entretanto, este estudo comprova que tais modificações devem ser testadas de maneira adequada, em comparação com procedimentos estabelecidos. Procedimentos não padronizados podem prejudicar sobremaneira a qualidade da cultura para micoplasmas, especialmente os testes quantitativos, que o referido laboratório não realiza em função do custo dos meios comerciais. Em comunicação posterior, o laboratório informou que havia aumentado o volume de amostra e meio de cultura utilizado, de acordo com as orientações do fabricante, e que taxa de isolamento de micoplasmas, anteriormente em nível bastante baixo, aparentemente tinha apresentado um aumento perceptível.

1. Cordova, C. M.; Blanchard, A. e Cunha, R. A. Higher prevalence of urogenital mycoplasmas in human immunodeficiency virus-positive patients as compared to patients with other sexually transmitted diseases. *J Clin Lab Anal* 14: 246-53, 2000.
2. Glass, J. I.; Lefkowitz, E. J.; Glass, J. S.; Heiner, C. R.; Chen, E. Y. e Cassell, G. H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407: 757-62, 2000.
3. Koch, A.; Bilina, A.; Teodorowicz, L. e Stary, A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. *Wien Klin Wochenschr* 109: 584-9, 1997.
4. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C. e Winn Jr, W. C. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5 ed Philadelphia: Lippincott, 1997.
5. Levi, N.; Prag, J.; Jensen, J. S.; Schroeder, T. V. e Lorenzen, J. E. Surgical infections with *Mycoplasma*: a brief review. *J R Coll Surg Edinb* 42: 107-9, 1997.
6. McMahon, D. K.; Dummer, J. S.; Pasculle, A. W. e Cassell, G. Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults. *Am J Med* 89: 275-81, 1990.
7. Miettinen, A. *Mycoplasma hominis* in patients with pelvic inflammatory disease. *Isr J Med Sci* 23: 713-6, 1987.
8. Pedraza Aviles, A. G. e Ortiz Zaragoza, M. C. Symptomatic bacteriuria due to *Ureaplasma* and *Mycoplasma* in adults. *Rev Latinoam Microbiol* 40: 9-13, 1998.
9. Poggio, T. V.; Orlando, N.; Galanternik, L. e Grinstein, S. Microbiology of acute arthropathies among children in Argentina: *Mycoplasma pneumoniae* and *hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Infect Dis J* 17: 304-8, 1998.
10. Sethi, K. K. e Brandis, H. Killing of mycoplasmas by the antibodies to foreign antigens acquired by the organisms from the growth medium. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 157: 113-9, 1972.
11. Sethi, S.; Sharma, M.; Narang, A. e Aggrawal, P. B. Isolation pattern and clinical outcome of genital mycoplasma in neonates from a tertiary care neonatal unit. *J Trop Pediatr* 45: 143-5, 1999.
12. Taylor-Robinson, D. Diagnosis of sexually transmitted diseases. In: TULLY, J. G. e RAZIN, S., eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol. 2. San Diego: Academic Press, p. 225-36, 1996.
13. Taylor-Robinson, D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clin Infect Dis* 23: 671-82, 1996.
14. Tully, J. G.; Taylor-Robinson, D.; Rose, D. L.; Furr, P. M. e Hawkins, D. A. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycoplasma hominis* from the human urogenital tract. *Sex Transm Dis* 10: 256-60, 1983.
15. Wolthers, K. C.; Kornelisse, R. F.; Platenkamp, G. J.; Schuurman-Van Der Lem, M. I.; van der Schee, C.; Hartwig, N. G. e Verduin, C. M. A case of *Mycoplasma hominis* meningo-encephalitis in a full-term infant: rapid recovery after start of treatment with ciprofloxacin. *Eur J Pediatr* 162: 514-6, 2003.
16. Zheng, X.; Olson, D. A.; Tully, J. G.; Watson, H. L.; Cassell, G. H.; Gustafson, D. R.; Svien, K. A. e Smith, T. F. Isolation of *Mycoplasma hominis* from a brain abscess. *J Clin Microbiol* 35: 992-4, 1997.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Dr. Caio M. M. de Cordova
FURB, Departamento de Ciências Farmacêuticas
Rua Antônio da Veiga 140, Campus III
CEP 89010-971, Blumenau-SC, Brasil.
E-mail: cmcordova@furb.br

Variantes estruturais da hemoglobina: estudo sobre prevalência em militares

Structural variants of hemoglobin: study about prevalence in military

Zama Messala Luna da Silveira¹, Elisângela Nascimento da Silva¹, Neussana Kellen de Araújo Medeiros Torreão¹, Isabelle Medeiros Bezerra² & Tereza Maria Dantas de Medeiros³

RESUMO - As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças de caráter genético caracterizadas pela síntese de cadeias polipeptídicas estruturalmente anormais ou diminuição da síntese de uma ou mais cadeias de globina. Dentre as variantes estruturais da hemoglobina, ou hemoglobinas anormais, as mais comuns são as hemoglobinas S e C resultantes da substituição de um único aminoácido na cadeia polipeptídica beta. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a prevalência de hemoglobinas anormais em militares. No período de março a junho de 2005, foram analisadas 418 amostras de sangue de militares de ambos os sexos, integrantes de três unidades militares da cidade de Natal, Rio Grande do Norte. O diagnóstico foi realizado mediante a realização de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e pH ácido e teste de solubilidade. A prevalência de variantes estruturais de hemoglobina foi de 3,11 %, sendo 2,63 % para o traço falciforme (Hb AS) e 0,48 % para o genótipo AC. Não foram detectados indivíduos homocigotos para nenhum dos tipos de hemoglobinas variantes. Os resultados obtidos mostram a necessidade de triagem para detecção de hemoglobinas anormais em nossa população, permitindo a identificação dos portadores dessas alterações genéticas.

PALAVRAS-CHAVE - hemoglobina S, hemoglobina C, traço falciforme

SUMMARY - Hemoglobinopathies are a genetic diseases group, characterized by either reduced synthesis of one or more normal globin chains or the synthesis of a structurally abnormal globin chain. Among the hemoglobin structural variants, the most common are the S and C hemoglobin, resulting from an amino acid substitution in beta chain. The present study had as main objective to evaluate the abnormal hemoglobins prevalence in military. Since March to June of 2005, 418 military blood samples of both sexes, from three military units of Natal, Rio Grande do Norte were analyzed. The diagnosis was accomplished by hemoglobin electrophoresis in alkaline pH and acid pH use and solubility test. Structural hemoglobin variants prevalence was 3,11 %, in which 2,63 % presented the sickle cell trait (Hb AS) and 0,48 % present hemoglobin C trait (Hb AC). Homozygous were not detected for any hemoglobins variant types. The obtained results indicate the importance of screening for abnormal hemoglobin detection which allow the identification of individuals with genetic alterations.

KEYWORDS - hemoglobin S, hemoglobin C, sickle cell trait

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças de caráter genético caracterizadas pela síntese de cadeias polipeptídicas estruturalmente anormais (variantes estruturais da hemoglobina) ou diminuição da síntese de uma ou mais cadeias de globina (talassemias) (Old, 2003). Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial é portadora dos diferentes distúrbios hereditários da hemoglobina, tornando-os as doenças monogênicas humanas mais comuns (Weatherall, 2001).

As hemoglobinas anormais, ou variantes estruturais da hemoglobina, em sua maioria, resultam da substituição de um único aminoácido nas cadeias alfa ou beta. Geralmente não causam alterações perceptíveis, mas podem modificar a estabilidade ou a funcionalidade da hemoglobina, levando a condições clínicas importantes (Weatherall & Clegg, 2001). Cerca de 750 variantes estruturais da hemoglobina já foram descritas, onde mais de 75% dessas variantes resultam da substituição de um único aminoácido por outro nas cadeias alfa ou beta da hemoglobina. Outras variantes resultam das trocas de bases nos genes das cadeias γ ou δ , e existem também variantes mais raras que cursam com uma produção de cadeias de globina híbridas, cadeias alongadas devido a inserções ou mutações de terminação, cadeias encurtadas devido a deleções, ou cadeias com dupla substituição de aminoácidos (Weatherall & Clegg, 1999).

As duas hemoglobinas variantes mais freqüentes na população brasileira, são as hemoglobinas S e C, ambas de origem africana, evidenciando a intensa participação do ne-

gro africano na composição populacional brasileira (Naoum, 1997; Salzano & Tondo, 1982). Esse fato é bem caracterizado nos estudos de prevalência de hemoglobinopatias realizados em diferentes regiões do Brasil (Brandelise *et al.*, 2004; Hutz & Salzano, 1983; Lobo *et al.*, 2003; Naoum *et al.*, 1987; Tavares-Neto *et al.*, 1986).

Os homocigotos para a hemoglobina S (Hb SS), apresentam uma anemia hemolítica crônica conhecida como anemia falciforme. A anemia hemolítica é causada por propriedades anormais da Hb S e/ou por crises sucessivas de falcização que levam a uma irreversibilidade da membrana da hemácia e destruição eritrocitária. A lesão tecidual é principalmente produzida por hipóxia resultante da obstrução dos vasos sanguíneos pelo acúmulo de hemácias falcizadas (Beutler, 1995).

Nos heterocigotos (Hb AS), portadores do traço falciforme, a Hb S representa cerca de 25 a 45% da hemoglobina total. Geralmente assintomáticos e não apresentando anemia, estes indivíduos, podem em determinadas circunstâncias tais como hipóxia, acidose, desidratação e vasoconstrição apresentar complicações graves, até mesmo fatais (Charache, 1988; Platt *et al.*, 1994).

Os heterocigotos para hemoglobina C (Hb AC) são assintomáticos e, por isso, a sua detecção torna-se importante apenas para fins de aconselhamento genético, uma vez que os homocigotos CC e os heterocigotos SC e Hb C/talassemia beta manifestam anemia (Beutler, 1995).

Nesse estudo os autores se propõem avaliar a prevalência de hemoglobinas anormais em militares.

Recebido em 05/11/2007
Aprovado em 03/03/2008

Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

¹Concluinte do Curso de Farmácia - Habilitação Farmacêutico Bioquímico Analista Clínico, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

²Tenente Farmacêutica - Laboratório de Análises Clínicas do Esquadrão de Saúde da Base Aérea de Natal

³Professor Adjunto da disciplina Hematologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

No período de março a junho de 2005, foram analisadas 418 amostras de sangue de militares de ambos os sexos, integrantes de três unidades militares da cidade de Natal, Rio Grande do Norte. A população estudada foi classificada segundo critérios étnicos em branco, pardo e negro considerando cor da pele, textura do cabelo, formato do nariz e lábios. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa e distribuídas em tubos de ensaio contendo anticoagulante (EDTA) na proporção de 1mg/mL de sangue. Após o preparo do hemolisado com solução de saponina a 1% todas as amostras foram submetidas à eletroforese em acetato de celulose utilizando tampão Tris-EDTA-borato pH 8,5. As amostras que apresentaram migração eletroforética semelhante à Hb C em pH alcalino foram submetidas à eletroforese em gel de ágar utilizando tampão citrato pH 5,9 para confirmação. O reconhecimento das hemoglobinas foi feito mediante o emprego de padrões eletroforéticos conhecidos analisados simultaneamente (Dacie & Lewis, 1995).

As amostras que apresentaram comportamento semelhante à Hb S na eletroforese em pH alcalino foram submetidas ao teste de solubilidade em papel de filtro (Magalhães & Arashiro, 1977).

A análise estatística dos dados foi realizada mediante cálculo do percentual das variáveis analisadas.

RESULTADOS

Do total de 418 amostras analisadas, 13 (3,11 %) possuíam o genótipo para hemoglobinas anormais, sendo que 11 (2,63 %) apresentaram o traço falciforme (Hb AS) e 2 (0,48 %) tinham o traço para hemoglobina C (Hb AC). Não foram detectados indivíduos homocigotos para nenhum dos tipos de variantes estruturais da hemoglobina (Tabela 1 e Figuras 1 e 2).

Na população estudada, 231 indivíduos eram de cor branca, 148 de cor parda e 39 eram de etnia negra. Observou-se maior prevalência de hemoglobinas anormais nos indivíduos de cor negra (5,13%), seguida pelos de cor parda (4,73%). O genótipo mais freqüente foi o AS, sendo encontrado numa prevalência de 1,73%, 4,05% e 2,56% entre os brancos, pardos e negros, respectivamente. Por outro lado, o genótipo AC foi mais prevalente nos indivíduos de cor negra (Tabela 1).

Entre os 418 militares estudados, 219 eram naturais do Rio Grande do Norte e 199 eram provenientes de outros Estados da Federação Brasileira. Observou-se uma prevalência de 2,28 % de hemoglobinas anormais entre os militares naturais do Rio Grande do Norte. Em relação aos militares naturais de outros estados, 8 possuíam hemoglobinas anormais, perfazendo uma prevalência de 4,02% (Tabela 2).

TABELA I

Prevalência de hemoglobinas anormais em 418 militares estudados conforme o grupo étnico

| Grupo étnico | Número de amostras analisadas | Genótipo | | | | Total | |
|--------------|-------------------------------|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------|
| | | AS | | AC | | N | % |
| | | N | % | N | % | N | % |
| Branco | 231 | 4 | 1,73 | 0 | 0 | 4 | 1,73 |
| Pardo | 148 | 6 | 4,05 | 1 | 0,68 | 7 | 4,73 |
| Negro | 39 | 1 | 2,56 | 1 | 2,56 | 2 | 5,13 |
| Total | 418 | 11 | 2,63 | 2 | 0,48 | 13 | 3,11 |

TABELA II

Prevalência de hemoglobinas anormais em 418 militares estudados conforme a naturalidade

| Naturalidade | Número de amostras analisadas | Genótipo | | | | Total | |
|---------------------|-------------------------------|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------|
| | | AS | | AC | | N | % |
| | | N | % | N | % | N | % |
| Rio Grande do Norte | 219 | 4 | 1,83 | 1 | 0,46 | 5 | 2,28 |
| Outros Estados | 199 | 7 | 3,52 | 1 | 0,50 | 8 | 4,02 |
| Total | 418 | 11 | 2,63 | 2 | 0,48 | 13 | 3,11 |

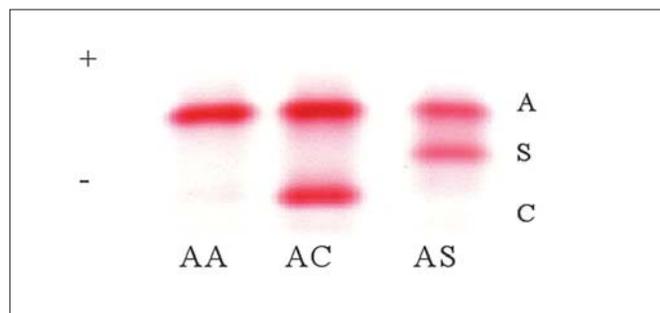


Figura 1 - Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH 8,5

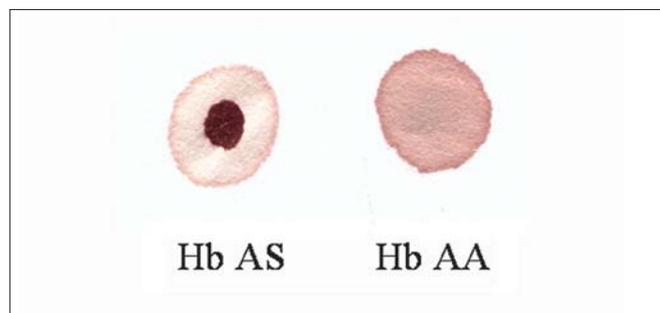


Figura 2 - Teste de solubilidade em papel de filtro

DISCUSSÃO

Os tipos de variantes de hemoglobinas são diretamente relacionados com a origem racial da população estudada e seu grau de miscigenação. Sabe-se que a formação da população brasileira ocorreu devido a uma intensa inter-relação entre as 3 raças principais: brancos oriundos de povos europeus, principalmente portugueses; negros africanos provenientes principalmente da Costa da Mina e de Angola; nativos indígenas (Naoum & Naoum, 2004).

Na população estudada as prevalências de 2,63% e 0,48% observadas para os genótipos AS e AC, respectivamente, são coerentes com os dados publicados por diversos autores no Brasil que afirmam ser a hemoglobina S, a hemoglobina anormal mais prevalente no país, seguida da hemoglobina C (Brandelise *et al.*, 2004; Lobo *et al.*, 2003).

A ocorrência das hemoglobinas S e C está diretamente relacionada à ascendência africana na população brasileira, assim como o traço talassêmico beta é mais freqüente em indivíduos que descendem de povos originários das regiões banhadas pelo mar Mediterrâneo (Tavares-Neto *et al.*, 1986). Existem hoje no Brasil milhões de heterocigotos dos genes da hemoglobina S (heterocigotos AS), da hemoglobina C (heterocigotos AC) e da talassemia beta (traço talassêmico beta). A prevalência média de heterocigotos AS é de 2 %, valor que sobe a cerca de 6 a 10 % entre afro-descendentes. A prevalência de heterocigotos AC também é significativa entre estes últimos, com valores entre 1 e 3 %. Já os heterocigotos pa-

ra a talassemia beta perfazem cerca de 1 a 6 % dos euro-descendentes do Sul e do Sudeste (Ramalho *et al.*, 2003).

Estudos realizados em diversas regiões brasileiras evidenciam uma prevalência de hemoglobinas anormais variando de 1,2 % a 9,3 % (Araújo *et al.*, 2004; Brandelise *et al.*, 2004; Daudt *et al.*, 2002; Lobo *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 1992; Naoum *et al.*, 1987; Ramalho, 1976; Ramalho *et al.*, 1976; Tavares-Neto *et al.*, 1986).

No presente estudo, entre os 219 militares naturais do estado do Rio Grande do Norte observou-se uma prevalência de hemoglobinas anormais de 2,28 % sendo 1,83 % e 0,46% para os genótipos AS e AC, respectivamente. Em relação aos 119 militares naturais de outros estados da Federação Brasileira, observou-se uma prevalência de 4,02 % representada pelos genótipos AS (3,52 %) e AC (0,50 %).

O genótipo SS não foi encontrado dentre os 418 indivíduos estudados, bem como outros genótipos, tais como doenças Hb SC e Hb CC, que levam a uma condição clínica importante. Isto se deve ao fato de que a população estudada composta por militares deve, impreterivelmente, encontrar-se em perfeito estado de saúde para ser admitido na corporação.

O genótipo AS, bem como o AC, determinam a condição de portador assintomático. É de suma importância a detecção destes indivíduos portadores devido à possibilidade de transmissão hereditária desses genes anormais. A interação entre esses genótipos, pode dar origem a novos heterozigotos ou a homozigotos, que conferem ao indivíduo condições clínicas muitas vezes graves, que tanto podem incapacitá-lo para o trabalho como levar ao óbito prematuramente.

A importância da detecção de indivíduos heterozigotos está no fato de que eles podem vir a ser submetidos a situações que desencadeiem quadros clínicos transitórios, mas que podem ser importantes.

As crises de falcização são geralmente transitórias e sem maiores seqüelas, porém, em determinadas condições podem levar à morte súbita. Jones *et al.* (1970), relataram o caso de militares do exército norte americano, portadores do traço falciforme que, submetidos a esforços físicos intensos numa base localizada a cerca de 1.300 metros de altitude acima do nível do mar, sofreram colapso com óbito ocorrendo em alguns minutos ou a pouco mais de 24 horas após o episódio.

Em outro estudo, foi observado que indivíduos AS provenientes de regiões de baixas altitudes, ao se deslocarem para localidades de altitudes de 1.609 metros acima do nível do mar ou mais, onde a disponibilidade de oxigênio diminui, apresentaram síndrome esplênica, caracterizada por dor severa na região do baço, dentro de 48 horas após a chegada (Lane & Githens, 1985).

Os resultados obtidos neste estudo ressaltam a necessidade de triagem para investigação de hemoglobinas anormais em nossa população. Após o diagnóstico, deve ser realizado um trabalho adequado de orientação para conscientizar esses indivíduos não só dos cuidados individuais, mas em termos de aconselhamento genético uma vez que a detecção dos portadores destas alterações genéticas é de importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos.

AGRADECIMENTOS

Ao Coronel Cláudio Christian Bezerril da Silva, Comandante do Corpo de Bombeiros Militares do Rio Grande do Norte, ao Coronel Nelson Luís Foggiatto Silveira, Comandante do Esquadrão de Saúde da Base Aérea de Natal e ao Tenente-Coronel Paulo Sérgio Iglessias, Diretor do Hospital de Guaranição de Natal por viabilizarem a obtenção das amostras.

REFERÊNCIAS

- Araújo, M.C.P.E., Serafim, E.S.S., Castro Jr., W.A.P., Medeiros, T.M.D. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 20(1):109-118, 2004.
- Beutler, E. The sickle diseases and related disorders. In: Beutler, E., Lichman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J. *Williams hematology*. 5. Ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 1995. p. 616-650.
- Brandelise, S., Pinheiro, V., Gabetta, C.S., Hambleton, I., Serjeant, B., Serjeant, G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. *Clin Lab. Haematol.*, 26:15-19, 2004.
- Charache, S. Sudden death in sickle trait. *Am. J. Med.*, 84:459-461, 1988.
- Dacie, J.V., Lewis, S.M. *Practical Haematology*. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- Daudt, L.E., Sechmaister, D., Portal, L., Camargo Neto, E., Silva, M.L.R., Giugliani, R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Publica*, 18(3):833-841, 2002.
- Hutz, M.H., Salzano, F.M. Sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brasil: demographic, clinical and laboratorial data. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 16:219-226, 1983.
- Jones, S.R., Binder, R.A., Donowho Jr, E.M. Sudden death in sickle cell trait. *N. Engl. J. Med.*, 282(6):323-325, 1970.
- Lanes, P.A., Githens, J.H. Splenic syndrome at mountain altitudes in sickle cell trait: its occurrence in nonblack persons. *J. Am. Med. Assoc.*, 253(15):2251-2254, 1985.
- Lobo, C.L.C., Bueno, L.M., Moura, P., Ogeda, L.L., Castilho, S., Carvalho, S.M.F. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro. *Rev. Panam. Salud Publica*, 3(2/3):154-159, 2003.
- Magalhães, E., Arashiro, D.N. Um método simples para visualização da hemoglobina S em testes de solubilidade. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 13:133-134, 1977.
- Medeiros, T.M.D., Abreu, A., Albuquerque, L.M.M., Lins, M.R.S. Hemoglobinas anormais e deficiência de glicose-6- fosfato desidrogenase em Natal , RN. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 28:43-48, 1992.
- Naoum, P.C. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997.
- Naoum, P.C., Alvares Filho, F., Domingos, C.R.B., Ferrari, F., Moreira, H.W., Sampaio, Z.A. Maziero, P.A., Castilho, E.M. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 23(3):68-79, 1987.
- Naoum, P.C., Naoum, F.A. *Doença das células falciformes*. São Paulo: Sarvier, 2004.
- Old, J.M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Reviews*, 17:43-53, 2003.
- Platt, O.S., Brambilla, D.J., Rosse, W.F., Milner, P.F., Castro, O., Steinberg, M.H. et al. Mortality in sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.*, 330:1639-1644, 1994.
- Ramalho, A.S., Jorge, R.N., Oliveira, J.A., Pereira, D.A. Hemoglobina S em recém-nascidos brasileiros. *J. Pediatr.*, 41:22-26, 1976.
- Ramalho, A.S. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. *Rev. Ass. Méd. Bras.*, 22(12):467-468, 1976.
- Ramalho, A.S., Magna L.A., Paiva-E-Silva, R.B. A Portaria no 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 19(4):1195-1199, 2003.
- Salzano, F.M., Tondo, C.V. Hemoglobin types in Brazilian populations. *Hemoglobin*, 6:85, 1982.
- Tavares-Neto, J., Naoum, P.C., Adorno, J., Azevedo, P., Brito, F., Caldas, M., Couto, M., Costa, K., Martinelli, C., Gonzalez, A., Assad, A., Mortoza, L., Reis, F., Silva, M.M.C., Silva, P., Vieira, M. Hemoglobinopatias no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Soc. Brasil. Medic. Trop.*, 19(1):13-19, 1986.
- Weatherall, D.J., Clegg, J.B. Genetic disorders of hemoglobin. *Semin. Hematol.*, 36(4):24-37, 1999.
- Weatherall, D.J., Clegg, J.B. Inherited haemoglobin Disorders: an increasing global health problem. *Bull. World Health Org.*, 79(8):704-712, 2001.
- Weatherall, D.J. Phenotype-Genotype Relationships in monogenic disease: Lessons from the Thalassaemias. *Nature Reviews*, 2:245-255, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Rua Gal. Cordeiro de Farias s/n - 1º andar
CEP 59010-180 Natal RN
Fone: (84)3215-4231/3215-4226
e-mail: tdantas@ufrnet.br

Estudo comparativo dos diagnósticos de vaginose bacteriana pelas técnicas de Papanicolaou e Gram*

Comparative study for the diagnosis of bacterial vaginosis by Papanicolaou and Gram staining techniques

Beatriz Schlatter Hasenack¹; Ana Karina M. Benthien Miquelão²; Audrey de Souza Marquez³; Éryka Helena Trapp e Pinheiro⁴ & Ana Paula Urnau⁵

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo determinar a habilidade do exame citopatológico de Papanicolaou para diagnosticar a vaginose bacteriana (VB), usando a coloração de Gram (gradiente de Nugent) como método diagnóstico padrão. Em estudo prospectivo foram analisadas amostras cérvico-vaginais de 223 mulheres não gestantes, com idades entre 14 e 82 anos. Na bacterioscopia ao Gram, a VB foi definida de acordo com os critérios propostos por Nugent *et al.* (1991), e, na técnica de Papanicolaou, a afecção foi caracterizada pela presença de microbiota mista com predomínio de cocobacilos, presença de clue cells e ausência ou diminuição da microbiota bacilar. A leitura dos esfregaços foi realizada por dois examinadores individualmente e de forma independente. O grau de concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi definido pelo coeficiente kappa. Comparado ao Gram, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do método de Papanicolaou para diagnóstico de VB foram, respectivamente, 71%, 93%, 78% e 91%. O cálculo do coeficiente kappa demonstrou boa concordância entre os dois procedimentos ($k=0,7$). Os resultados obtidos sugerem que a análise dos esfregaços cérvico-vaginais corados pela técnica de Papanicolaou pode representar uma alternativa prática e útil para o diagnóstico de VB.

PALAVRAS-CHAVE - vaginose bacteriana, diagnóstico, Papanicolaou, Gram.

SUMMARY - The purpose of the study was to determine the ability of Papanicolaou cytopathology exam in diagnosing bacterial vaginosis (VB) using Gram staining (Nugent gradient) as the gold standard method. In a prospective study, 223 endocervical samples from non-pregnant women ranging from 14 to 82 years old were analyzed. VB was defined according to Nugent *et al.* (1991) criterion in Gram staining and in Papanicolaou method the affection was characterized by the prevalence of cocobacilli in mist microbiota, the presence of clue cells and the absence of bacillary microbiota. The smears analysis were done by two different examiners, individually and independently. The concordance degree between the results from the two methods was established by kappa coefficient. By using Gram staining as the gold standard method, sensibility, specificity, positive predictive value and negative predictive value of Papanicolaou in diagnosing VB were 71%, 93%, 78% and 91%, respectively. Kappa coefficient analysis demonstrated good concordance between the two procedures for VB diagnosis ($k=0,7$). The results suggest that the analysis of endocervical smears by Papanicolaou staining can represent a practical and useful option for the diagnosis of VB.

KEYWORDS - bacterial vaginosis, diagnosis, Papanicolaou, Gram.

INTRODUÇÃO

As inflamações da vagina estão entre as principais causas de consulta ginecológica. Vaginose bacteriana, candidíase e tricomoniase são responsáveis por 90% dos casos de vaginites, sendo a primeira afecção a de maior prevalência em mulheres na idade reprodutiva (Adad *et al.*, 2001).

A vaginose bacteriana (VB) representa uma complexa mudança na microbiota vaginal caracterizada por uma redução na prevalência e concentração de lactobacilos, especialmente daqueles produtores de peróxido de hidrogênio, e um crescimento demasiado de microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Prevotella sp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides sp.* e *Peptostreptococcus spp.* (Marrazzo, 2004). Clinicamente, este distúrbio caracteriza-se por um aumento do conteúdo vaginal acompanhado de odor desagradável, o qual tende a piorar no período menstrual e após a relação sexual devido à volatilização das aminas produzidas pelas bactérias anaeróbias (Struczynsky *et al.*, 2006). Uma elevada proporção das mulheres com VB, entretanto, é assintomática (Klebanoff *et al.*, 2004).

A prevalência da VB varia segundo o método diagnóstico e a população estudada, ocorrendo em 15 - 19% das pacientes ginecológicas ambulatoriais, 10 - 30% nas pacientes gestantes e 24 - 40% das pacientes das clínicas de doenças sexual-

mente transmissíveis (Egan & Lipsky, 2000). Alguns fatores predisponentes parecem estar relacionados com esta patologia, como: idade, etnia, fumo, uso de dispositivo intra-uterino como método contraceptivo e comportamento sexual (Avilés *et al.*, 2004; Chiaffarino *et al.*, 2004; Giraldo *et al.*, 2005).

A importância do estudo da VB deve-se ao fato desta afecção estar associada com complicações ginecológicas e obstétricas, incluindo cervicites, salpingites, endometrites, infecções pós-operatórias e do trato urinário, bem como, doença inflamatória pélvica e resultados anormais nas análises citológicas cérvico-vaginais. (Harmanli *et al.*, 1995; Peipert *et al.*, 1997; Hillebrand *et al.*, 2002; Haggerty *et al.*, 2004; Ness *et al.*, 2004). Na gestação, podem ocorrer ruptura precoce de membranas, nascimentos prematuros, corioamnionites e endometrite pós-parto (Georgijevic *et al.*, 2000). Esta afecção parece ainda aumentar o risco para aquisição, transmissão ou reativação do vírus da imunodeficiência adquirida, vírus herpes simplex tipo 2 e papiloma vírus humano (Hashemi *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2000; Cherpès *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2005).

O diagnóstico clínico de VB pode ser estabelecido de acordo com os critérios de Amsel *et al.* (1983) e é efetuado em presença de no mínimo três dos seguintes itens: 1) leucorréia homogênea aderente às paredes vaginais; 2) pH vaginal superior a 4,5; 3) presença de clue cells ou células-alvo na análise microscópica do conteúdo vaginal e 4) teste das aminas positivo.

Recebido em 16/03/2007

Aprovado em 21/02/2008

*Trabalho desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, PR.

¹Docente do Curso de Farmácia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL);

²Docente do Curso de Farmácia da UNOPAR, mestre em Patologia pela UEL;

³Docente do Curso de Farmácia da UNOPAR, mestre em Microbiologia pela UEL;

⁴Docente do Curso de Farmácia da UNOPAR, especialista em Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Maringá (UEM);

⁵Aluna do Curso de Farmácia da UNOPAR.

Esfregaços corados pelo método de Gram para diagnóstico de VB foram introduzidos por Spiegel *et al.* (1983), que investigaram e mensuraram semiquantitativamente diferentes morfotipos bacterianos na microbiota vaginal. Posteriormente, Nugent *et al.* (1991) propuseram um sistema de escores, conhecido também como gradiente de Nugent, o qual é resultante da soma de valores diferenciados para a observação quantitativa de determinados morfotipos na bacterioscopia ao Gram. A utilização do gradiente de Nugent é amplamente difundida e é o método mais bem aceito no diagnóstico da VB (Schwebke *et al.*, 1996; Mota *et al.*, 2000; Karaca *et al.*, 2005).

A técnica de Papanicolaou é usada comumente como teste de triagem para detectar lesões pré-neoplásicas do colo uterino. O sucesso das triagens citológicas para câncer cervical tem feito desta técnica um procedimento de rotina (Pinho & França-Junior, 2003). Em relação ao diagnóstico da VB, a validade do método de Papanicolaou é controversa e estimula a realização de estudos comparativos com o intuito de definir o seu grau de confiabilidade.

O presente trabalho teve por objetivo determinar a habilidade do exame citopatológico cérvico-vaginal corado pela técnica de Papanicolaou para diagnosticar a VB, fazendo uso da bacterioscopia ao Gram (gradiente de Nugent) como método diagnóstico padrão.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado de forma prospectiva no período de setembro de 2003 a setembro de 2004 e envolveu 223 mulheres com idades de 14 a 82 anos, residentes em bairro carente da cidade de Londrina-PR.

As mulheres participantes foram convocadas aleatoriamente em suas residências e, para serem incluídas no estudo, assinaram um termo de consentimento informado por escrito, autorizando a realização da coleta das amostras biológicas, a realização dos exames laboratoriais e a utilização dos resultados obtidos para fins de pesquisa.

Coleta e preparo das amostras cérvico-vaginais

As mulheres foram aconselhadas a não fazerem uso de duchas higiênicas e medicamentos intravaginais nas 48 horas que precediam a coleta do exame, bem como fazer abstinência sexual no mesmo período.

Todas as amostras foram obtidas utilizando-se o espéculo vaginal para visualização do colo uterino. Com um swab estéril foi coletado o conteúdo vaginal e preparado o esfregaço para a bacterioscopia. Com a espátula de Ayre e escova cervical (*cytobrush*) foi realizada a coleta e o esfregaço cérvico-vaginal, o qual foi fixado com álcool absoluto para evitar a ação de enzimas autolíticas que poderiam alterar a morfologia celular.

Os esfregaços do conteúdo vaginal foram corados pela técnica de Gram e os esfregaços cérvico-vaginais corados pela técnica de Papanicolaou.

Análise das amostras

As análises dos esfregaços foram realizadas por dois observadores independentemente, sendo cada um responsável por uma metodologia.

Os esfregaços vaginais corados pela técnica de Gram foram analisados em microscópio óptico com objetiva de imersão. A VB foi definida de acordo com os critérios propostos por Nugent *et al.* (1991).

Os resultados das análises citológicas cérvico-vaginais corados por Papanicolaou foram relatados de acordo com o

Sistema Bethesda (2001). O diagnóstico de VB foi baseado na ausência ou diminuição de microbiota bacilar e presença de microbiota mista predominada por cocobacilos associada à visualização de clue cells. Nos esfregaços positivos para VB freqüentemente foram observados escassos leucócitos polimorfonucleares.

Análise estatística:

O grau de concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi definido pelo cálculo do coeficiente kappa (k) (Molinero, 2001). Valores de k iguais ou superiores a 0,6 indicam que as metodologias avaliadas possuem boa e muito boa concordância.

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo foram calculados segundo Ransohoff & Feinstein (1978).

RESULTADOS

Foram analisadas amostras cérvico-vaginais de 223 mulheres com idades entre 14 e 82 anos. A prevalência de VB diagnosticada através da bacterioscopia ao Gram pelo sistema de escores de Nugent foi de 24,7% (55/223). A sensibilidade, especificidade, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) da técnica de Papanicolaou para o diagnóstico da VB, quando comparado a bacterioscopia ao Gram, foram de 71%, 93%, 78% e 91%, respectivamente. Avaliando os resultados das leituras dos esfregaços cérvico-vaginais corados pelas técnicas de Gram e Papanicolaou, das 55 amostras positivas para VB ao Gram, 39 amostras (70,9%) tiveram o diagnóstico confirmado por Papanicolaou; porém, 16 amostras (29,1%) obtiveram resultados negativos. Dentre as 168 amostras consideradas negativas para VB pela técnica de Gram, houve concordância com a técnica de Papanicolaou em 157 amostras (93,5%); porém, o resultado foi discrepante em 11 (6,5%) (Tabela 1). O cálculo do coeficiente kappa demonstrou boa concordância entre os dois procedimentos para diagnóstico de VB (k=0,7).

TABELA I
Comparação dos resultados das leituras dos esfregaços de amostras cervico-vaginais coradas por Gram e Papanicolaou

| Papanicolaou | Gram Escore de Nugent* | |
|------------------|---------------------------|-----|
| | ≥ 7 | ≤ 6 |
| Positivo para VB | 39 | 11 |
| Negativo para VB | 16 | 157 |
| TOTAL | 55 | 168 |

* Positivo para VB: escore de Nugent ≥ 7; Negativo para VB: escore de Nugent ≤ 6.

DISCUSSÃO

VB é a mais freqüente das vaginites e é caracterizada por um aumento no crescimento de microorganismos anaeróbios devido a um desequilíbrio no ecossistema vaginal (Amsel *et al.*, 1983; Adad *et al.*, 2001). As condições clínico-patológicas caracterizam-se por eritema da parede vaginal, leucorréia de odor fétido e a presença de *clue cells* nos esfregaços cérvico-vaginais. O pH vaginal normalmente é alcalino em decorrência da atividade metabólica das bactérias anaeróbias presentes (Priestley *et al.*, 1996).

O diagnóstico de VB é usualmente estabelecido de acordo com critérios clínicos ou testes microbiológicos. Em verda-

de, a escolha do melhor método diagnóstico ainda é controversa, principalmente devido à discrepância de resultados obtidos em diferentes estudos realizados. Os critérios clínicos são os mais utilizados na prática médica, porém, segundo Mastrobattista *et al.* (2000), a VB é frequentemente mal diagnosticada desta forma porque os componentes utilizados são subjetivos. É importante lembrar que o uso dos critérios clínicos não é útil para o diagnóstico das pacientes assintomáticas, as quais precisam ser devidamente diagnosticadas e tratadas, principalmente quando gestantes ou quando forem submetidas a procedimentos cirúrgico-ginecológicos (Struczynsky *et al.*, 2006).

Os esfregaços citopatológicos cérvico-vaginais corados pelo método de Papanicolaou vêm sendo realizados com o objetivo de reconhecer células epiteliais pré-neoplásicas ou neoplásicas do colo uterino; porém, podem sugerir a presença de infecções cérvico-vaginais (Adad *et al.*, 2001). No estudo de Giacomini *et al.* (1998), utilizando os critérios de Amsel como padrão de diagnóstico para VB, os esfregaços corados por Papanicolaou apresentaram 88,7% de sensibilidade e 98,8% de especificidade. Empregando o mesmo delineamento de estudo, Fan *et al.* (1996) obtiveram sensibilidade de 85% e especificidade de 95%. Greene *et al.* (2000); em contrapartida, alcançaram valores bem inferiores para a sensibilidade (49%), ainda que a especificidade tenha sido elevada (93%). Em verdade, a avaliação do exame de Papanicolaou para o diagnóstico da VB tem levado a resultados contraditórios, fomentando a realização de mais estudos com o objetivo de validar este teste para a detecção desta patologia.

A bacterioscopia ao Gram da secreção vaginal é utilizada comumente para o diagnóstico das principais causas de vaginites; no caso da VB, o sistema de escores idealizado por Nugent *et al.* (1991) é o mais divulgado, sendo resultante da soma de valores diferenciados para a observação quantitativa dos seguintes morfotipos nos esfregaços vaginais corados pelo método de Gram (aumento de 1000X): lactobacilos, *G. vaginalis* ou *Bacteroides spp.* e bacilos Gram-negativos curvos. Nesta proposta, a VB seria confirmada quando o escore resultasse em valores iguais ou superiores a 7. Este sistema de diagnóstico tem sido amplamente empregado com bons valores de kappa, sensibilidade de 93% e especificidade de 70% (Urbanez, 2002). Schwebke *et al.* (1996) realizaram um estudo multicêntrico e concluíram que os critérios de Nugent determinados através da bacterioscopia ao Gram foram mais sensíveis que os critérios de Amsel para diagnóstico de VB. Zarakolu *et al.* (2004) avaliaram a interpretação dos esfregaços vaginais corados por Gram utilizando os critérios de Nugent realizada em três laboratórios distintos e demonstraram ser este um método confiável para o diagnóstico de VB em diferentes locais. Em vista do exposto, optamos por utilizar a bacterioscopia de Gram (gradiente de Nugent) como metodologia padrão para diagnóstico da VB.

Em relação à habilidade da técnica de Papanicolaou para diagnosticar a VB, quando comparada à bacterioscopia ao Gram, obteve-se nesse estudo 71% de sensibilidade, 93% de especificidade, 78% para VPP e 91% para VPN. A boa concordância das duas metodologias testadas foi revelada pelo coeficiente kappa de 0,7. Em avaliações similares, a literatura refere números discrepantes para estes mesmos parâmetros. Tokyol *et al.* (2004), por exemplo, valendo-se também da bacterioscopia ao Gram como método-padrão para diagnóstico da VB, obtiveram para a técnica de Papa-

nicolaou sensibilidade de 43%, especificidade 94%, VPP 74% e VPN 80%. Neste estudo, os critérios citológicos do Sistema Bethesda foram utilizados para a caracterização da VB e as análises citológicas seguiram os procedimentos de rotina, isto é, foram avaliadas amostras cervicais e não amostras vaginais, o que, segundo os autores, poderia explicar a baixa sensibilidade evidenciada. Porém, este raciocínio não é compartilhado por Culhane *et al.* (2005) que alegam que o exato local da coleta da amostra na região de fundo de saco vaginal não parece interferir no diagnóstico da VB. Davis *et al.* (1997), usando o mesmo protocolo de estudo de Tokyol *et al.* (2004), reportaram sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 55%, 98%, 96% e 78%, respectivamente. A validade do esfregaço corado por Papanicolaou para diagnóstico de VB foi da mesma forma estudada por Audisio *et al.* (2001) e os resultados relatados foram: sensibilidade 57%, especificidade 94%, VPP 70% e VPN 90% (tabela 2). Para justificar os índices mais baixos obtidos pelos referidos pesquisadores, em relação à sensibilidade da técnica de Papanicolaou para diagnóstico da VB, poderia ser aventada a possibilidade dos profissionais da citopatologia não estarem dando a adequada importância para avaliação da microbiota presente no esfregaço, talvez por este não ser o principal objetivo do exame.

Em contrapartida à moderada sensibilidade demonstrada pela técnica de Papanicolaou nos estudos acima descritos, os trabalhos realizados por Sodhani *et al.* (2005) e Lamont *et al.* (1999) revelaram resultados mais próximos aos nossos: sensibilidade de 78% e 87%, respectivamente, corroborando que esta técnica é hábil em detectar VB na maioria das mulheres, sintomáticas ou não (tabela 2).

TABELA II

Análise comparativa dos estudos publicados sobre a habilidade da técnica de Papanicolaou para diagnosticar a vaginose bacteriana usando a bacterioscopia ao Gram (gradiente de Nugent) como metodologia padrão de diagnóstico:

| Estudo | Sensibilidade | Especificidade |
|-------------------------------|---------------|----------------|
| Hasenack <i>et al.</i> , 2006 | 71% | 93% |
| Sodhani <i>et al.</i> , 2005 | 78% | 87% |
| Tokyol <i>et al.</i> , 2004 | 43% | 94% |
| Audisio <i>et al.</i> , 2001 | 57% | 94% |
| Lamont <i>et al.</i> , 1999 | 87% | 97% |
| Davis <i>et al.</i> , 1997 | 55% | 98% |

A elevada especificidade da técnica de Papanicolaou para o diagnóstico da VB evidenciada neste estudo foi igualmente demonstrada por outros pesquisadores (tabela 2). Este fato valoriza esta metodologia para a caracterização da VB particularmente quando o resultado é positivo.

Em conclusão, a metodologia de Papanicolaou demonstrou ser uma alternativa prática e útil para a caracterização da VB. É um exame de diagnóstico atraente por ser de fácil execução e possuir boa cobertura populacional, visto que faz parte do programa para a prevenção do câncer cérvico-uterino. Por ser realizado de rotina e não somente quando a paciente apresenta algum sinal ou sintoma de infecção genital, permite o diagnóstico da VB assintomática, viabilizando seu correto tratamento e prevenindo possíveis complicações.

REFERÊNCIAS

- Adad, S.J.; Lima, R.V.; Sawan, Z.T.E. et al. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decates. *São Paulo Med J*, 119(6):200-5, 2001.
- Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*, 74:14-22, 1983.
- Audisio, T.; Pignini, T.; de Riutort, S.V. et al. Validity of the Papanicolaou smear in the diagnosis of *Candida* spp., *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis. *J Low Gen Tract Dis*, 5(4):223-5, 2001.
- Avilés, A.G.P.; Vazquez, R.M.; Zaragoza, C.O. et al. Factores de riesgo asociados a vaginosis bacteriana. *Aten Primaria*, 34(7):360-5, 2004.
- Cherpes, T.L.; Meyn, L.A.; Krohn, M.A. et al. Association between acquisition of herpes simplex type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis*, 37:319-25, 2003.
- Chiapparino, F.; Parazzini, F.; DeBesi, P & Lavezzari, M. Risk factors for bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 117(2):222-6, 2004.
- Culhane, J.F.; Desanto, D.; Goldenberg, R.L. et al. Variation in Nugent score and leukocyte count in fluid collected from different vaginal sites. *Obstet Gynecol*, 105(1):120-3, 2005.
- Davis, J.D.; Connor, E.E.; Clark, P. et al. Correlation between cervical cytologic results and Gram stain as diagnostic tests for bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, 177:532-5, 1997.
- Egan M.E. & Lipski M.S. Diagnosis of vaginitis. *Am Fam Physican*, 62(5):1095-104, 2000.
- Fan, S.; Ke, Y. & Li, Q. Detection of bacterial vaginosis in Gram stained vaginal smears and Papanicolaou stained cervical smears. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 76(4):284-6, 1996.
- Georgijevic A, Cjukic-Ivancevic S., Bujko M. Bacterial vaginosis: epidemiology and risk factors. *Srp Arh Celok Lek*, 128:29-33, 2000.
- Giacomini, G.; Calcinai, A.; Moretti, D. et al. Accuracy of cervical/vaginal cytology in the diagnosis of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis.*, 25(1):24-7, 1998.
- Giraldo, P.C.; do Amaral, R.L.G.; Gonçalves, A.K. et al. Influência da frequência de coitos vaginais e da prática de duchas higiênicas sobre o equilíbrio da microbiota vaginal. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 27(5):257-62, 2005.
- Greene, J.F.; Kuehl, T.J. & Allen, S.R. The Papanicolaou smear: inadequate screening test for bacterial vaginosis during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 182(5):1048-9, 2000.
- Haggerty, C.L.; Hillier, S.L.; Bass, D.C. et al. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin Infect Dis*, 39:990-5, 2004.
- Harmanli, O.H.; Cheng, G.Y.; Nyirjesy, P. et al. Urinary tract infections in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*, 95(5):710-12, 1995.
- Hashemi, F.B.; Ghassemi, M.; Faro, S. et al. Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression by anaerobes associated with bacterial vaginosis. *J Infect Dis*, 181:1574-80, 2000.
- Hillebrand, L.; Harmanli, O.H.; Whiteman, V. et al. Urinary tract infections in pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, 196(5):916-7, 2002.
- Karaca, M; Bayram, A.; Kocoglu, M.E. et al. Comparison of clinical diagnosis and microbiological test results in vaginal infections. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 32(3):172-4, 2005.
- Klebanoff, M.A.; Schwebke, J.R.; Zhang, J. et al. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*, 104:267-72, 2004.
- Lamont R.F., Hudson E.A., Hay P.E., et al. A comparison of the use of Papanicolaou-stained cervical cytological smears with Gram-stained vaginal smears for the diagnosis of bacterial vaginosis in early pregnancy. *Int J STD AIDS*, 10:93-7, 1999.
- Marazzo, J.M. Evolving issues in understanding and treating bacterial vaginosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2(6):913-22, 2004.
- Mastrobattista J.M., Bishop K.D., Newton E.R. Wet smear compared with Gram stain diagnosis of bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women. *Obstet Gynecol*, 96:504-6, 2000.
- Moliner, L.M. Medidas de concordancia para variables cualitativas, 2001. Disponível em: <http://www.seh-lilha.org/concor2.htm>. Acesso em: 12 dez.2005.
- Mota, A.; Pietro, E.; Carnall, V. & Exposto, F. Evaluation of microscopy methods for diagnosis of bacterial vaginosis. *Acta Med Port*, 13(3):77-80, 2000.
- Ness, R.B.; Hillier, S.L.; Kip, K.E. et al. Bacterial Vaginosis and risk of pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol*, 104:761-69, 2004.
- Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. Reliability diagnosing bacterial vaginosis is improved standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*, 29:297-301, 1991.
- Peipert, J.F., Montagna, A.B.; Cooper, A.S. & Sung C.J. Bacterial vaginosis as a risk factor for upper genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol*, 177:1184-7, 1997.
- Pinho, A.A. & Franca-Junior, I. Cervical cancer prevention: a theoretical framework to analyze Papanicolaou test access and use. *Rev Bras Saude Mater Infant*, 3(1):95-112, 2003.
- Priestley C.J, Kinghorn GR. Bacterial vaginosis. *Br J Clin Pract*, 50:331-4, 1996.
- Ransohoff, R.E. & Feinstein, A.R. Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. *N Eng J Med*, 12(5):294-9, 1978.
- Schmid, G.; Markowitz, L.; Joesoef, R. et al. Bacterial vaginosis and HIV infection. *Sex Transm Infect*, 76:3-4, 2000.
- Schwebke J.R., Hillier S.L., Sobel J.D. et al. Validity of the vaginal Gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*, 88:573-6, 1996.
- Sodhani, P.; Garg, S.; Bhalla, P. et al. Prevalence of bacterial vaginosis in a community setting and role of the Pap smear in its detection. *Acta Cytol*, 49(6):634-8, 2005.
- Spiegel, C.A.; Amsel, R. & Holmes, K.K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol*, 18(1):170-7, 1983.
- Stuczynsky, J.V.; Naud, P.; Matos, J.C. et al. Vulvovaginites e cervicites. in: Pasqualotto, A.C. & Schwarzbald, A.V. *Doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2006. 816p. 342-4.
- Tokyo, C.; Aktepe, O.C.; Cevrioglu, A.S. et al. Bacterial vaginosis: comparison of Pap smear and microbiological test results. *Mod Pathol*, 17(7):857-60, 2004.
- Urban, A.A.; Bertasi, S.; Zandoná, S. & Petry, A.C.M. Quadro clínico e métodos diagnósticos das vulvovaginites mais frequentes. *Femina*, 30(2):117-23, 2002.
- Watts, D.H.; Fazzari, M.; Minkoff, H. et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis*, 191(7):1129-39, 2005.
- Zarakolu, P.; Sahin, H.; Aydin, F. et al. Reliability of interpretation of Gram-stained vaginal smears by Nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 48(2):77-80, 2004.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Beatriz Schlatter Hasenack
Rua Juscelino Kubitschek, 54. Bairro Jardim Boa Vista.
CEP: 86200-000 - Ibiporã, PR.
E-mail: beatriz.hasenack@unopar.br