

RIBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

Utilização da Reação em Cadeia da Polimerase no diagnóstico precoce da infecção pelo HIV em crianças nascidas de mães soropositivas 170

Luciane Failace; Marisa Chesky; Mauricio Pagnussat & Luiz Fernando Jobim
The use of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the early diagnosis of HIV infection in infants born to seropositive mothers

Análise dos fatores etiológicos da acidose metabólica em pós-operatório de cirurgia digestiva 173

Roberto de Cleva; Bruno Zilberstein; Francisco Garcia Soriano; Irineu Tadeu Velasco & Henrique Walter Pinotti
Analysis of metabolic acidosis ethiological factors on post-operative digestive surgery

Antioxidantes e oxidabilidade da LDL em pacientes hiperlipidêmicos 176

Patricia Moriel, Paula M. Andrade, Daniella Rodrigues, Marcelo C. Bertolani & Dulcinea S.P. Abdalla
Antioxidants and LDL oxidizability in hyperlipidemic patients

Coproscopia no diagnóstico da giardíase 181

Maria Marcia Imenes Ishida & Cláudio Santos Ferreira
Coproscopy in the diagnosis of giardiasis

Incidência de parasitoses em escolares da Escola Municipal de Educação Infantil "Sant'Ana Itatiaia", Juiz de Fora-MG e sua possível correlação com a qualidade da água para consumo 185

Alves, M.S.; Vilela, M.A.P.; Barbosa, N.R.; Alves, R.M.S. & Rezende, M.C.
Parasitosis incidence in children from EMEI "Sant'Ana Itatiaia", Juiz de Fora - MG, Brazil and possible relationship with the presence of the parasites in source of water

Valores de referência do ácido hipúrico urinário na região metropolitana de Belo Horizonte 188

E. M. Alvarez-Leite; A. Duarte; A. F. Couto; V. F. Caixeta & M. M. Barroca
Urinary hippuric acid reference values in Belo Horizonte metropolitan area, Brazil

Avaliação da contagem diferencial de células sanguíneas por metodologia automatizada e microscopia 191

Spada, C.; Treitinger, A.; Ramos, L. F. M.; Moritz, E.; Ferreira, S. C.; Steinwandter, M. M.; Steinwandter, S. T.; Cezarotto, F. S.; Souza, N. M. A. & Silva, M. V. P. F.
Differential blood cells counting evaluation by automated methodology and optical microscopy

Levantamento das características metodológicas em citologia cérvico-vaginal no Estado de Santa Catarina 194

Haas, P.; Comeli, O.; Marcon, S. & Müller, K.
Methodologic characteristic in cervical-vaginal cytology

Efeito do exercício físico associado ao consumo de álcool nos níveis lipídicos 197

Macedo, J. A. P.; Agostinho, T. L.; Alencar, N. N. M. & Queiroz, M. G. R.
Effect of physical exercise associated to alcohol intake on lipidic levels

Suplemento

Manual para Credenciamento do Sistema da Qualidade de Laboratórios Clínicos

4

ANÁLISE DOS FATORES ETIOLÓGICOS DA ACIDOSE METABÓLICA EM PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA DIGESTIVA

ROBERTO DE CLEVA*, BRUNO ZILBERSTEIN***, FRANCISCO GARCIA SORIANO**, IRINEU TADEU VELASCO**** E HENRIQUE WALTER PINOTTI*****.

* ASSISTENTE-DOUTOR DO DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

** ASSISTENTE-DOUTOR DA DISCIPLINA DE EMERGÊNCIAS MÉDICAS DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

*** PROFESSOR ASSOCIADO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA DO APARELHO DIGESTIVO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

****PROFESSOR TITULAR DA DISCIPLINA DE EMERGÊNCIAS MÉDICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

***** PROFESSOR TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA DO APARELHO DIGESTIVO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

RESUMO Foram estudados prospectivamente 31 pacientes submetidos a cirurgia do aparelho digestivo com propósito de definir a incidência da acidose metabólica no período pós-operatório e analisar a participação dos vários elementos envolvidos neste fenômeno. Observamos desenvolvimento de acidose metabólica em 65% dos casos, sendo uma acidose não severa com pH médio de 7,26 e HCO_3^- de 17 mmol/L. Foram identificados dois componentes desta acidose metabólica: 1) A produção de ácido láctico que corresponde a um consumo de 1,7 mmol/L de HCO_3^- , que é o menor componente de acidose; 2) a diluição do volume extracelular devido às soluções cristalóides, responsáveis por aproximadamente 4,3 mmol/L de redução do bicarbonato, e pela elevação do cloro plasmático.

SUMMARY : We studied prospectively 31 patients submitted to digestive surgery to describe the incidence of metabolic acidosis in the postoperative period and analyse the aetiological factors involved in this acid-base disturbance. We observed the development of metabolic acidosis in 65% of the patients, with pH 7,26 and serum bicarbonatum of 17 mmol/L. This metabolic acidosis has two components: 1) a minor one (lactic acidosis) which consumes 1,7 mmol/L of basis 2) a major one: dilution of the extracellular volume determined by crystalloid solutions infused during the surgery, which consumes 4,3 mmol/l of basis and also causes hyperchloremia.

DESCRIPTORS: METABOLIC ACIDOSIS; DIGESTIVE SURGERY;
POSTOPERATORY

DESCRITORES: ACIDOSE METABÓLICA; PÓS-OPERATÓRIO; CIRURGIA
DO APARELHO DIGESTIVO

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de acidose metabólica no pós-operatório de cirurgias do aparelho digestivo , apesar de ser fenômeno relativamente frequente, tem sido pouco estudado (1,2,3). Vários distúrbios metabólicos que ocorrem durante a operação podem contribuir para sua instalação , tais como: 1) Administração de grandes volumes de soluções cristalóides e glicosadas levando a diluição dos tampões plasmáticos e do fluido extracelular (4,5,6). 2) Uso de soluções endovenosas com pH em torno de 5 a 6, representando a infusão de carga de ácidos (7). 3) Redução do débito cardíaco e da resistência vascular periférica causadas por drogas anestésicas, contribuindo para o aumento do metabolismo anaeróbico e conseqüente produção de ácido láctico (8,9,10,11). 4) Alteração do metabolismo hepático por agentes anestésicos que podem reduzir a conversão do lactato (12,13).

No intuito de definir a incidência da acidose metabólica no pós-operatório e analisar a participação dos vários elementos envolvidos neste fenômeno, foram estudadas estas alterações em pacientes submetidos a cirurgia do aparelho digestivo.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados prospectivamente 31 pacientes seqüenciais, sendo 18 do sexo feminino, com idades entre 32 e 64 anos. As intervenções praticadas foram: hemigastrectomia 18, hemicolectomia 3, esofagectomia 3, gastroplastia redutora 3, gastroduodenopancreatectomia 4, correção de trânsito intestinal 1, derivação bilio-digestiva 1.

Em todos foram analisados os seguintes parâmetros laboratoriais : sódio (Na^+), cloro (Cl^-), potássio (K^+) plasmáticos e urinários; pH, bicarbonato (HCO_3^-), pCO_2 e ácido láctico plasmáticos. Os valores de ânion gap sérico (AG) e urinário (AGu) foram obtidos empregando-se as fórmulas clássicas descritas na literatura (14,15,16,17,18). Foram também computados os volumes de diurese e volumes de soro infundidos no período de 24 horas. Estes dados foram

controlados no pré-operatório (PRÉ), pós- operatório imediato (POi) e 24 horas após cirurgia (PO24).

Para melhor análise dos resultados os pacientes no pós-operatório foram divididos em dois grupos, a saber: com acidose - Grupo A , e sem acidose, Grupo B. Os dados foram analisadas pelo teste t de Student, aceitando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O volume de soluções cristalóides administrado em média no período intra- operatório foi de 3700 ± 300 ml . A acidose metabólica estava presente no pré-operatório em 2 pacientes. No POI foi detectada em 20 (65%) pacientes, e esta alteração persistiu por 24 horas em 7 (22%) pacientes (Tabela 1). Os valores médios de pH verificados nos 31 pacientes foram : $7,39 \pm 0,02$ no PRÉ, $7,29 \pm 0,03$ ($p=0,001$) no POI e $7,38 \pm 0,01$ no PO24. O bicarbonato plasmático teve comportamento semelhante: PRÉ $23 \pm 1,2$ mmol/l, POI $17 \pm 1,6$ mmol/L ($p=0,0001$) e PO24 $20 \pm 1,3$ mmol/L ($p=0,0001$) respectivamente nos mesmos períodos. O pCO_2 nos períodos PRÉ, POI e PO24 foram 35,5: 36 e 34,9 mmHg ($p = 0,8$). As dosagens de lactato sérico mostraram elevação nos períodos POI e PO24 em relação ao PRÉ, sendo este dado significativo apenas no POI .

Estes valores foram de $2,8 \pm 0,1$ mmol/L, $4,5 \pm 0,2$ mmol/L ($p=0.0001$) e $3 \pm 0,4$ mmol/L, no pré, POI e PO24 respectivamente. Os valores obtidos para o ânion gap plasmático foram de 18 ± 2 mmol/L, $12 \pm 1,5$ mmol/L ($p=0,0003$) e $13 \pm 1,8$ mmol/L ($p=0,002$), para PRÉ, POI e PO24. O ânion gap urinário também apresentou redução no POI e PO24 de 41 ± 12 para 21 ± 8 mmol/L ($p=0,025$). Observamos também elevação do cloro plasmático nos períodos POI e PO24; de $101 \pm 4,2$ (PRÉ) para $110 \pm 4,4$ mmol/L no POI ($p < 0,05$) e $105 \pm 4,7$ mmol/L no PO24 ($p=0,01$). No entanto, os níveis de sódio plasmático sofreram uma redução de $138 \pm 4,5$ mmol/L no PRE para $136 \pm 4,8$ mmol/L no POI ($p < 0,01$) e $134 \pm 4,7$ mmol/L no PO24 ($p = 0,004$). Os valores de Na^+ urinário (Na^+u) obtidos nos períodos POI e PO24 foram respectivamente: 111 ± 32 e 99 ± 27 .

Os pacientes que desenvolveram acidose metabólica no POI receberam em média 4.300 ± 900 ml de soluções cristalóides enquanto que os que não apresentaram tal alteração receberam em média 2.600 ± 800 ml.

Os pacientes com acidose metabólica no POI apresentaram valores de pH $7,26 \pm 0,02$ e os pacientes sem acidose pH $7,41 \pm 0,03$ ($p < 0,05$). A concentração plasmática de bicarbonato foi de $17,3 \pm 0,6$ e $17,5 \pm 0,7$ mmol/L para os grupos com acidose e sem acidose. No grupo sem acidose verificou-se também alcalose respiratória com paCO_2 de $29,2 \pm 1,7$ mmHg, enquanto o grupo com acidose apresentou um distúrbio misto metabólico e respiratório com paCO_2 de $38,3 \pm 1,3$ mmHg.

A análise dos valores de lactato no POI entre os pacientes com e sem acidose mostra os seguintes valores, respectivamente : $4,5 \pm 0,1$ mmol/L e $4,0 \pm 0,1$ mmol/L, e os valores de ânion gap sérico foram de $13,1 \pm 2,1$ mmol/L e $12,7 \pm 1,2$ mmol/L. Os valores de ânion gap urinário obtidos nos pacientes com e sem acidose no POI foram respectivamente: 35 ± 7 mmol/l e $44,8 \pm 7$ mmol/l. Observamos elevação do Cl^- sérico nos dois grupos, sendo mais acentuada, contudo não significativa, nos pacientes com acidose no POI (100 ± 8 mmol/L para 110 ± 10 mmol/L no grupo com acidose e 103 ± 8 mmol/L para 110 ± 10 mmol/L). Os pacientes sem acidose apresentaram redução mais acentuada e significativa nos níveis de Na^+ sérico no POI $138,6 \pm 12$ mmol/L para $135,6 \pm 10$ mmol/L que o grupo sem acidose 138 ± 11 mmol/L para 137 ± 11 mmol/L ($p=0,01$). Entretanto, os pacientes com acidose apresentavam excreção urinária de Na^+_{u} e Cl^-_{u} superior (119 ± 25 mmol/L e 127 ± 20 mmol/L, respectivamente) que o grupo sem acidose (106 ± 22 mmol/l e 101 ± 18 mmol/l).

DISCUSSÃO

Na literatura não existem muitos dados quanto a acidose metabólica pós-operatória, principalmente em pacientes submetidos a cirurgia do aparelho digestivo (1,2,3).

Apesar de ser distúrbio muito freqüente, como se pode observar a partir dos resultados obtidos neste estudo, onde 65% dos pacientes a desenvolveram, esta alteração não foi severa: o menor pH encontrado foi de 7,14 e na média foi $7,29 \pm 0,03$ no POI. A concentração de bicarbonato plasmático variou em 6 mmol/L do PRÉ para o POI, sem que tenha ocorrido variação do pCO_2 , descartando portanto acidose respiratória concomitante (1). A análise dos valores de pH e bicarbonato plasmático dos pacientes com acidose no POI mostra que estes valores não são muito diferentes da média geral obtida. A redução de bicarbonato plasmático observada (6 mmol/L)corresponde a um consumo de 84 mmol de HCO_3^- do volume extracelular ou um consumo de 252 mmol de alcali do volume corporal total.

Esta redução de HCO_3^- pode ocorrer em decorrência da produção de ácidos orgânicos (5,19). De fato, observamos elevação do lactato sérico de 2,8 para 4,5 mmol/l em média entre o período PRÉ e o POI, ou seja, um aumento de 1,7 mmol/l de lactato. Entretanto, esta variação de concentração de lactato, apesar de confirmar uma pequena lacticedemia, não pode ser responsável pelo consumo de 6 mmol/l de HCO_3^- . Contudo os níveis de lactato sérico dos pacientes que desenvolveram acidose seja superior ($4,5 \pm 0,1$ mmol/L) aos observados no grupo sem acidose ($4,0 \pm 0,1$ mmol/L) esta diferença não é significativa. A redução do bicarbonato plasmático poderia ser secundária à produção de outros ácidos não mensuráveis (14,15). O ânion gap plasmático é capaz de detectar de forma inespecífica a presença destes ânions não mensuráveis, que possam ser decorrentes da produção de ácidos. Observamos em nosso estudo que houve uma variação do nível de ânion gap plasmático de 18 para 12 mmol/L no período pré-operatório para o POI, ou seja, uma redução de 6 mmol/L. A variação da concentração do ânion gap coincide perfeitamente com a variação de HCO_3^- ; no entanto, não significa que se expliquem mutuamente. A produção de ácidos não mensuráveis que consomem o bicarbonato deveriam levar à elevação do nível de ânion gap e não redução, como foi observado neste estudo (20). Além disso, o fato do ânion gap se apresentar na faixa da normalidade demonstra que não ocorreu produção significativa de ácidos. A análise do ânion gap no POI entre pacientes com e sem acidose não apresenta diferença significativa ($13,1 \pm 2,1$ mmol/L e $12,7 \pm 1,2$ mmol/L), da mesma maneira que com o lactato. Igualmente, a aferição do

ânion gap urinário não apresenta diferença significativa entre o POI e o PO24. Portanto a acidose metabólica presente não foi decorrente do predomínio de uma produção de ácido láctico e nem mesmo de ânions não mensuráveis, conforme demonstrado. Realizamos a seguir um exercício teórico dos cálculos de diluição do volume extracelular para um valor médio de peso corporal de 60 Kg , como encontrado em nossos pacientes. Os pacientes com acidose apresentaram ganho de 4,3 litros no volume extracelular, o que pode diluir o bicarbonato de 23 para 17 mmol/L. No entanto, seria necessário um ganho de 6 litros para diluir o ânion gap de 18 para 12 mmol/L. Este dado sugere que estas alterações não apresentam os mesmos componentes determinantes. Assim, o valor de ânion gap esperado pela diluição do volume extracelular com o ganho de fluido de 4,3 litros, seria de 13,3 mmol/L. Teríamos, portanto, uma variação de 4,3 mmol/L no ânion gap, e não de 6 mmol/L.

Somado a isto, a produção de ácido láctico, com variação de 1,7 mmol/L do PRÉ para o POI elevaria o ânion gap para 15 mmol/L, ou seja, uma diferença de 3 mmol/L em relação ao valor observado. Estes dados tornam-se intrigantes pois temos redução de ânion gap plasmático na presença de elevação do lactato. Esta discordância de resultados pode ser ainda mais excitante em vista dos resultados de Na^+ e Cl^- plasmáticos e urinários. Observamos elevação do cloro plasmático nos períodos PRÉ e POI de 103 para 111 mmol/L ($p < 0,05$). No entanto, os níveis de sódio plasmático sofreram uma redução (de $138 \pm 0,8$ para $136 \pm 0,8$ mmol/L) a despeito das cargas de NaCl recebidas pelos pacientes no intra-operatório ($p < 0,05$) (3,4,21,22). Os

valores de cloro urinário foram de 115 ± 15 e 100 ± 18 mmol/L para os pacientes com e sem acidose respectivamente, no POI. Os dois grupos apresentam redução do AGu, e alguns pacientes apresentavam AGu negativo, demonstrando uma carga excretada de cloro superior à carga excretada de amônio, o que indica o desenvolvimento de acidose hiperclorêmica nestes pacientes(14,17,18,23).

Espera-se que após a infusão de cristalóides (soro fisiológico) com 150 mmol/L de Na^+ e ganho de 4,3 litros no extracelular, que o Cl^- e o Na^+ plasmáticos se elevem(20). Observamos entretanto elevação do cloro e redução do sódio plasmático (4,21,22). Para explicar estes fenômenos temos que supor redistribuição diferenciada entre os elementos sódio, cloro e água entre os espaços extra e intracelular (4,21,22). Talvez essa redistribuição possa explicar o contraste entre elevação de lactato e redução de ânion gap. Os pacientes que não apresentaram acidose tiveram em média um ganho de 2600 mL de cristalóides. A redução do bicarbonato plasmático esperado com esta diluição seria de 4 mmol/L, ou seja, o valor do HCO_3^- no POI deveria ser 19 mmol/L, e não 17 mmol/L como foi encontrado. Contudo, a hiperventilação apresentada por estes pacientes deve tê-lo reduzido para um valor final próximo a 17 mmol/L.

Em conclusão, observamos desenvolvimento de acidose metabólica no pós-operatório de cirurgia do aparelho digestivo em 65% dos casos, sendo uma acidose não severa com pH médio de 7,26 e HCO_3^- de 17 mmol/L. Foram identificados dois componentes desta acidose metabólica: 1) A produção de ácido láctico que corresponde a um consumo de 1,7 mmol/L de HCO_3^- , que é o

menor componente de acidose; 2) a diluição do volume extracelular com as soluções cristalóides responsáveis por aproximadamente 4,3 mmol/L de redução do bicarbonato, e pela elevação do cloro plasmático. Outros estudos são necessários para esclarecer a discordância entre os valores de ácido láctico e ânion gap plasmático, e também as diferenças de distribuição de cloro e sódio plasmáticos.

TABELA 2 - RESULTADOS OBTIDOS NOS PACIENTES COM ACIDOSE E SEM ACIDOSE NO POI

	GRUPO A COM ACIDOSE	GRUPO B SEM ACIDOSE
pH	7,26 ± 0,02 *	7,35±0,03
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	17 ± 0,6	18 ± 0,7
pCO ₂ mmHg	38 ± 1,3	35 ± 1,7
LACTATO (mmol/L)	5,0 ± 0,1	3,7 ± 0,1
ÂNION GAP (mmol/L)	14 ± 2,1	11 ± 1,2

VOLUME INFUNDIDO (mL)	4300 ± 900*	2600 ± 800
Cl ⁻ plasmático (mmol/L)	103 ± 8 *	100 ± 10
Na ⁺ plasmático (mmol/L)	139 ± 12*	137 ± 12

* p < 0,05

TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS NOS PERÍODOS PRÉ-OPERATÓRIO (PRÉ), PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO (POI), E PÓS-OPERATÓRIO 24 HORAS (PO24). VALORES MÉDIOS DE TODOS OS PACIENTES.

	PRÉ	POI	PO24
pH	7,39 ± 0,22	7,29 ± 0,25*	7,38 ± 0,31
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	23 ± 1,0	17 ± 2*	20 ± 2
pCO ₂ (mmHg)	35,5 ± 3	36 ± 5	34,9 ± 4
Lactato (mmol/L)	2,8 ± 0,2	4,5 ± 0,1*	3,0 ± 0,2

Ânion gap (mmol/L)	18 ± 2	12 ± 3*	13 ± 3*
Na ⁺ (mmol/L)	138 ± 4,5	136 ± 4,8	134 ± 4,3*
Cl ⁻ (mmol/L)	101 ± 4,2	110 ± 4,4*	105 ± 4,7
AGu (mmol/L)		41 ± 6	23 ± 3*

P<0,05

Referências

- 1- Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism - 1980, pp 132-167.
McGraw-Hill, Inc. Maxwell & Kleeman.
- 2- **Pietropaoli P., Caporelli S., De-Pace F., Donati A., Adrario E., Luzi A., Munch C., Giovannini C., Frezzotti A.R.** Intraoperative lactic acidosis, can it be treated ? Clinico-experimental, prospective, sequential study. *Minerva-Anestesiol* 1994;60(12):707-713.
- 3- **Novarini A.** Water-eletrolyte and acid-base balance in surgery. Problems in the postoperative period. *Clin Ter* 1994; 145(10):287-93.

- 4- **Moon P.F., Kramer G.C.** Hypertonic saline-dextran resuscitation from hemorrhagic shock induces transient mixed acidosis. *Crit Care Med* 1995;23(2):323-31.
- 5- **Oh M.S., Carroll H.J., Uribarri J.** Mechanism of normochloremic and hyperchloremic acidosis in diabetic ketoacidosis. *Nephron* 1990;54:1-6.
- 6- **Brivet F., Bernardin M., Cherin P., Chalas J., Galanaud P., Dormont J.** Hyperchloremic acidosis during grand mal seizure lactic acidosis. *Intensive Care Med* 1994;20(1):27-31.
- 7- **Canizaro P.C., Prager M.D., Shires G.T.** The infusion of Ringer's lactate solution during shock. Changes in lactate, excess lactate, and pH. *Am J Surg* 1971;122:494-501.
- 8- **Delaney T.J., Kistner J.R., Lake C.L.** Myocardial function during halothane and euflurane anesthesia in patients with coronary artery disease. *Anesth Analg* 1980;59:240-248.
- 9- **Duke P.C., Fownes D., Wade J.G.** Halothane depresses baroreflex control of heart rate in man. *Anesthesiology* 1977;46:184-190.
- 10- **Lowenstein E., Whiting R.B., Bittar D.A.** Local and neurally mediated effects of morphine on skeletal muscle vascular resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 1972;180:359-345.
- 11- **Steven W.C., Cromwell T.H., Halsey M.J.** The cardiovascular effects of a new inhalation anesthetic, Forane, in human volunteers at constant arterial carbon dioxide tension. *Anesthesiology* 1971; 35:8-12.

- 12- **Brody G.L., Sweet R.B.** Halothane anesthetic as a possible cause of massive necrosis. *Anesthesiology* 1963;24:29-38.
- 13- **Wood M, Berman M.L., Harbison R.D.** Halothane-induced hepatic necrosis in triiodothyronine-pretreated rats. *Anesthesiology* 1980;52:470-478.
- 14- **Halperin M.L., Vasuvattakul S., Bayoumi A.** A modified classification of metabolic acidosis: A pathophysiologic approach. *Nepron* 1992;60:129-133.
- 15- **Gabow P.A.** Disorders associated with an altered anion gap. *Kidney International* 1985;27:472-483.
- 16- **Kamel K.S., Ethier J.H., Richardson R.M.A., Bear R.A., Halperin M. L.** Urine electrolytes and osmolality:when and how to use them. *Am. J. Nephrol.* 1990;10:89-102.
- 17- **Goldstein M., Bear R., Richardson R., Marsdeu P., Halperin M.** The urine anion gap: A clinically useful index of ammonium excretion. *Am J Med Sci* 1986;292:198-202.
- 18- **Dyck R., Asthana S., Kalra J., West M., Massey L.** A modification of the urine osmolal gap : an improved method for estimating urine ammonium. *Am J Nephrol* 1990;10:359-362.
- 19- **Madias N.E.** Lactic acidosis. *Kidney International* 1986;29:752-774.
- 20- **Richardson R.M.A., Halperin M.L.** A potentially misleading diagnostic test in patients with hyperchloremic metabolic acidosis. *Am J Kidney Dis* 1987;10:140-143.

- 21- **Paulson W.D.** Effect of acute pH change on serum anion gap. *J Am Soc Nephrol* 1996;7(2):357-63.
- 22- **Velasco I.T., Rocha-Silva M.** *Am J Physiol*
- 23- **vanBeuren M., Rabelink T. J., vanRijn H.J.M., Koomans H. A.** Effects of acute NaCl, KCl and KHCO₃ loads on renal electrolyte excretion in humans. *Clinical Science* 1992;83:567-574.

ANTIOXIDANTES E OXIDABILIDADE DA LDL EM PACIENTES HIPERLIPIDÊMICOS*

Antioxidants and LDL Oxidizability in Hyperlipidemic Patients

Patricia Moriel¹, Paula M. Andrade¹, Daniella Rodrigues¹, Marcelo C. Bertolani² & Dulcineia S.P. Abdalla¹

*¹Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, ²Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, S.P., Brasil.

RESUMO - A oxidação da LDL tem um papel chave na patogênese da aterosclerose. Muitos estudos sugerem que os antioxidantes podem atuar diminuindo a oxidação das lipoproteínas e inibindo a progressão da aterosclerose. Portanto, além da medida dos níveis séricos dos lípidos, torna-se importante investigar o “status” antioxidante e a susceptibilidade da LDL à oxidação em estados hiperlipidêmicos. Neste trabalho, determinou-se as concentrações plasmáticas de ascorbato e urato, o conteúdo de vitamina E, licopeno e β -caroteno no plasma e nas lipoproteínas e a cinética de oxidação da LDL *in vitro*. Foram estudados 3 grupos : 1) pacientes hipercolesterolêmicos sob medicação anti-hipertensiva; 2) pacientes normolipidêmicos e 3) pacientes hipercolesterolêmicos sem nenhum tipo de medicação. Os pacientes hipercolesterolêmicos apresentaram concentrações menores de antioxidantes no plasma e nas lipoproteínas em relação ao grupo controle. Correlações negativas foram observadas entre os níveis de antioxidantes e o tempo de iniciação da oxidação da fração pesada da LDL, indicando um efeito significativo dos antioxidantes sobre a susceptibilidade da LDL à oxidação. Estes resultados indicam que concentrações menores de antioxidantes hidro e lipossolúveis facilitam a oxidação da LDL, contribuindo potencialmente para um maior risco para o desenvolvimento ou progressão da aterosclerose em pacientes hipercolesterolêmicos.

PALAVRAS-CHAVE - Aterosclerose, antioxidantes, LDL, lipoproteínas oxidadas

SUMMARY - It has been demonstrated that LDL oxidation has a key role in the pathogenesis of atherosclerosis. Several studies suggest that antioxidants can decrease lipoprotein oxidation and inhibit atherosclerosis progression. Then, besides to measure the serum lipid concentration, it is also important to determine the antioxidant status and the oxidative susceptibility of LDL in hyperlipidemic states. Here, the plasma ascorbate and urate concentrations, the amount of vitamin E, lycopene and β -carotene of plasma and lipoproteins, as well as, the *in vitro* LDL oxidation kinetics were measured in the following groups: 1) hypercholesterolemic patients under anti-hypertensive treatment 2) normolipidemic individuals and 3) hypercholesterolemic patients under absolute restriction of all kind of drugs. The antioxidant concentrations of blood plasma and lipoproteins were

lower in hypercholesterolemic patients as compared to normolipidemic individuals. Negative correlation between the plasma and lipoprotein antioxidant concentrations and the lag time of heavy LDL oxidation were observed showing the crucial role of antioxidants on lipoprotein oxidizability. Data show that a lower level of water and lipid soluble antioxidants of plasma and lipoproteins, respectively, would favor LDL oxidation and potentially contribute to increase atherosclerosis risk of hypercholesterolemic patients.

KEY WORDS - Atherosclerosis, antioxidants, LDL, oxidized lipoproteins

1 - INTRODUÇÃO

O monitoramento da produção de espécies radicalares em fluidos biológicos é extremamente difícil, pelo fato da maior parte dos radicais livres gerados apresentarem meia-vida muito curta. No entanto, em diversas doenças nas quais o envolvimento das espécies radicalares tem sido sugerido, seria de extremo interesse realizar-se uma avaliação, ainda que indireta, da produção endógena dessas espécies.

A modificação oxidativa de lipoproteínas é um fator crítico no desenvolvimento da aterosclerose. O aumento do tempo de permanência das lipoproteínas no compartimento plasmático, que ocorre nas hiperlipidemias, pode facilitar a oxidação destas partículas por espécies oxidantes liberadas por células endoteliais, células musculares lisas, monócitos, neutrófilos, macrófagos e plaquetas¹⁻⁴. De fato, tem sido relatado que neutrófilos e monócitos de pacientes hiperlipidêmicos apresentam maior produção de radical superóxido, quando estimulados⁵⁻⁷. A modificação oxidativa da LDL resulta na alteração de várias propriedades físico-químicas e estruturais nessa partícula⁸⁻¹¹, o que a torna um mediador importante em diversas etapas da aterosclerose (Figura 1).

A susceptibilidade das lipoproteínas à oxidação depende do equilíbrio entre a geração de espécies oxidantes e dos antioxidantes hidrossolúveis, nos

compartimentos onde as mesmas estão presentes, e, principalmente, pela quantidade de antioxidantes lipossolúveis transportados por estas partículas. Muitos trabalhos têm mostrado evidências desta participação dos antioxidantes no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose¹²⁻¹⁴. Neste sentido, a determinação da oxidabilidade das lipoproteínas plasmáticas e dos níveis de antioxidantes poderia auxiliar na avaliação do risco aterosclerótico dos pacientes hiperlipidêmicos. Com este objetivo, investigou-se em indivíduos hiperlipidêmicos e normolipidêmicos: 1) a susceptibilidade da LDL à oxidação; 2) as concentrações plasmáticas dos antioxidantes hidrossolúveis (ascorbato e urato) e 3) o conteúdo dos antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, licopeno e beta-caroteno) no plasma e nas lipoproteínas.

2. Materiais e Métodos

2.1 – Casuística

Foram estudados 3 grupos : 1) pacientes hipercolesterolêmicos que estavam sob medicação anti-hipertensiva, mas não tomavam fármacos hipolipemiantes (n=70); 2) indivíduos normolipidêmicos (n=8) e 3) pacientes hipercolesterolêmicos com restrição total a qualquer tipo de medicação (n=18). Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Lípidos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. O sangue dos pacientes (20 ml) foi coletado em tubos Vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante, obtendo-se o plasma por centrifugação a 2500 rpm a 10 minutos. O plasma

obtido foi armazenado em nitrogênio líquido até a realização das determinações.

2.2 - Isolamento de lipoproteínas

A Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) (1,020 <d>1,063 g/ml), Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL) (1,006 <d> 1,019) e Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) (1,065 <d> 1,210) foram isoladas do plasma dos pacientes na presença de BHT (20 μ M) e uma combinação de inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e benzamidina), por ultracentrifugação sequencial¹⁵. As subfrações leve (1,020<d>1,045) e pesada (1,045 <d>1,063) da LDL foram obtidas por ultracentrifugação do plasma em gradiente de cloreto de sódio, na presença dos inibidores de proteases citados acima, mas na ausência de BHT. As lipoproteínas foram, em seguida, dialisadas contra 6 litros de tampão pH 7,4 (NaCl 150,0 mM, EDTA 1,0 mM, NaN₃ e Tris 10,0 mM), a 4° C, durante 12 horas, sendo que para a LDL pesada utilizou-se o mesmo tampão, porém, sem EDTA.

2.3 - Determinação de colesterol total, triacilgliceróis e de proteínas totais

Os níveis de colesterol total e de triacilgliceróis do plasma e das frações lipoprotéicas foram determinados por métodos enzimáticos, utilizando-se reagentes comerciais (Biosystems - Espanha). As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry e cols. (1951)¹⁶, utilizando-se albumina bovina como padrão.

2.4 - Determinação de ascorbato, urato, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno

Os níveis plasmáticos de ascorbato e urato e as concentrações de α -tocoferol, licopeno e β -caroteno, presentes no plasma e nas lipoproteínas, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se um detector eletroquímico (potencial = + 600mv). A extração de ascorbato e urato do plasma foi realizada com ácido perclórico 0,75%¹⁷ e a extração do α -tocoferol, licopeno e do β -caroteno, com metanol:hexano (1:3, v/v)¹⁸. A fase contendo hexano foi evaporada e o resíduo foi dissolvido em fase móvel para a posterior determinação de α -tocoferol e β -caroteno. Todas as amostras foram filtradas em membranas com poros de 22 μ m e injetadas no cromatógrafo (20 μ l), através do injetor automático SIL-10A (Shimadzu). A quantificação das amostras foi feita com padrões externos, através de curvas de calibração com níveis múltiplos, utilizando-se o programa Class-LC10, LC-work station. Foi utilizado um sistema cromatográfico LC10 (Shimadzu), com uma coluna de fase reversa C₁₈ CG-Nucleosil (CG do Brasil S/A). Para a análise de α -tocoferol, licopeno e de β -caroteno utilizou-se uma fase móvel composta por metanol:acetonitrila:clorofórmio (35:35:30,v/v/v), contendo perclorato de lítio 20 mM¹⁹. Na determinação de ascorbato e urato, a fase móvel foi composta por acetato de sódio trihidratado (0,04M), dodecilamina (1ml/l) e EDTA (0,200g/l) em água deionizada, ajustada para pH 5 com ácido acético glacial. O fluxo da fase móvel foi de 1ml/minuto para todas as análises.

2.5 - Grau de oxidabilidade da LDL (Lag time, lag rate, log rate e peak time)

A LDL pesada (0,5 mg de proteína/ml), foi incubada com 60 μ M de CuSO_4 em PBS à 37⁰C, monitorando-se a cinética da reação de oxidação através da medida contínua da conjugação de dienos em 234 nm, durante 2 horas. A cinética de oxidação da LDL foi analisada, considerando-se quatro diferentes componentes deste processo: 1 - LAG TIME : fase de iniciação , ou seja, tempo requerido para que ocorra o consumo total dos antioxidantes das lipoproteínas; 2 - LAG RATE : aumento da absorbância em 234 nm durante o lag time, que representa a velocidade do processo de iniciação; 3 - LOG RATE : aumento da absorbância depois do lag time, que represente a velocidade de propagação; 4 – PEAK TIME : tempo final de oxidação das partículas de lipoproteína²⁰.

2.6 - Análise estatística

Os resultados foram calculados como média \pm desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Wilcoxon; o nível de significância estabelecido foi de $p < 0.05$. As regressões lineares foram realizadas pelo programa Origin, onde “r” = valor do coeficiente de correlação e “p” = significância da correlação.

3. RESULTADOS

Na tabela 1, encontram-se as médias e os desvios padrão das determinações de colesterol total, triacilgliceróis e de proteínas no plasma e nas frações lipoprotéicas de todos os grupos estudados.

As concentrações plasmáticas de ascorbato foram de $35,3 \pm 22,0 \mu\text{M}$, e de urato $145,1 \pm 43,3 \mu\text{M}$ nos pacientes do grupo 1. Para os mesmos pacientes, o conteúdo de α -tocoferol da LDL pesada foi de $16,7 \pm 7,5 \text{ nmol/mg}$ de proteína da LDL. Em relação à oxidabilidade da LDL pesada, obteve-se um valor para lag time de $39,0 \pm 10,1$ minutos. Correlações positivas foram observadas entre o lag time e as concentrações dos antioxidantes urato e α -tocoferol (Fig. 2).

As concentrações plasmáticas de ascorbato, urato, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno nos grupos 2 (controle) e 3 (hipercolesterolêmico) estão demonstradas na figura 3. A figura 4 mostra as concentrações de α -tocoferol, licopeno e β -caroteno nas lipoproteínas dos mesmos grupos. Na figura 5, observa-se o grau de oxidabilidade da LDL analisado em termos dos quatro parâmetros citados no item 2.5.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A aterosclerose ainda é a principal causa de morte nos países industrializados. Apesar de estar claro que a alta concentração de colesterol total e da LDL é um dos principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose, os mecanismos relacionados ao desenvolvimento e à progressão da aterosclerose continuam incertos. Nos últimos anos, várias evidências experimentais têm mostrado que a modificação oxidativa da LDL e de outras lipoproteínas é uma etapa crucial

na patogênese da aterosclerose²⁰⁻²³. Desta forma, é de extrema importância avaliar-se não apenas o perfil lipídico dos indivíduos, mas também determinar a oxidação das lipoproteínas, o que pode contribuir para uma avaliação mais completa do risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, utilizando-se materiais biológicos de fácil obtenção, tais como plasma ou urina.

Este trabalho mostrou não existir diferenças significativas para as concentrações dos antioxidantes hidrossolúveis, ascorbato e urato, entre os pacientes hipercolesterolêmicos sob medicação anti-hipertensiva, mas na ausência de agentes hipolipemiantes, e os pacientes hipercolesterolêmicos sem nenhum tipo de medicação. As correlações positivas entre as concentrações plasmáticas de urato e do conteúdo de α -tocoferol na LDL pesada com o tempo de iniciação da oxidação da fração pesada da LDL, o Lag Time, indicou um efeito significativo dos antioxidantes estudados sobre a susceptibilidade da LDL à oxidação nos pacientes hipercolesterolêmicos do grupo 1. A concentração plasmática de ascorbato foi menor nos pacientes hipercolesterolêmicos quando comparado à do grupo controle. Este dado é importante uma vez que vários estudos mostram que o ascorbato pode proteger os lipídeos do plasma e das lipoproteínas contra a peroxidação lipídica²⁴⁻²⁶. Além disto, o ascorbato tem a capacidade de regenerar o radical tocoferil²⁷ e, conseqüentemente, uma menor concentração plasmática de ascorbato prejudicaria essa via, diminuindo o conteúdo de α -tocoferol regenerado nas lipoproteínas. Em adição ao papel antioxidante, estudos em humanos indicam que o ascorbato está envolvido no metabolismo do colesterol, na síntese de prostaciclina pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos²⁸ e na manutenção da integridade vascular, revertendo a disfunção

endotelial em pacientes com doença coronariana crônica²⁹. Portanto, uma menor concentração de ascorbato nos pacientes hipercolesterolêmicos pode ser de extrema importância para a progressão do processo aterosclerótico.

Em relação aos antioxidantes lipossolúveis, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno, observou-se uma diminuição significativa da concentração plasmática de α -tocoferol no grupo hipercolesterolêmico, em relação ao grupo controle, quando o conteúdo de α -tocoferol foi normalizado pela concentração de colesterol total do plasma. Vários autores têm demonstrado a existência de correlações positivas entre as concentrações plasmáticas de α -tocoferol e os níveis de lipídeos totais e de colesterol³⁰⁻³², possivelmente devido à maior incorporação do α -tocoferol às lipoproteínas, as quais encontram-se aumentadas nos estados hiperlipidêmicos. Portanto, a forma mais correta de expressar o conteúdo de α -tocoferol no plasma, nos indivíduos hipercolesterolêmicos, é em relação à concentração de colesterol total³³. A concentração dos antioxidantes lipossolúveis nas lipoproteínas, normalizada pelo conteúdo de colesterol e/ou de proteína contido na partícula de lipoproteína, diminuiu nos pacientes hipercolesterolêmicos em relação aos controles.

O α -tocoferol é o principal antioxidante presente nas lipoproteínas, inibindo tanto a fase de iniciação como de propagação da peroxidação lipídica³⁴. Outra importante função do α -tocoferol no processo aterosclerótico seria seu efeito inibitório sobre a expressão de moléculas de adesão de leucócitos e das células endoteliais vasculares, atuando assim sobre a interação celular endotélio-leucócitos³⁵. Portanto, a diminuição da concentração de α -tocoferol na hipercolesterolemia, além de facilitar a

oxidação das lipoproteínas, poderia promover indiretamente um aumento da expressão de moléculas de adesão, e conseqüentemente, a entrada de monócitos na íntima arterial, propiciando uma maior formação de células espumosas.

A diminuição do tempo de iniciação da oxidação da fração pesada da LDL nos pacientes hipercolesterolêmicos indica uma menor resistência da LDL pesada à oxidação, na hipercolesterolemia. Em resumo, concentrações menores de antioxidantes hidro e lipossolúveis facilitam a oxidação da LDL, contribuindo potencialmente para um maior risco para o desenvolvimento ou progressão da aterosclerose em pacientes hipercolesterolêmicos.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPESP e a CPNq pelo suporte financeiro à este trabalho.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Steinbrecher, U. P., Witztum, J. L., Parthasarathy, S., Steinberg, D.** Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis*, v. 7, p. 135-143, 1987.
2. **Cathcart, M.K., Morel, D.W., Chisolm, G.M.** Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J. Leukocyte Biol.*, v. 38, p. 341-350, 1985.
3. **Morel, D.W., Dicorleto, P.E., Chilsom, G.M.** Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoproteins in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis*, v. 4, p. 357-364, 1984.
4. **Freeman, B.A., Crapo, J.D.** Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, v. 47, p. 412-426, 1982.

5. **Keaney, J.F., Gaziano, J.M., Xu, A., Frei, B. B., Curram-Celentano, J., Shwaery, G.T., Loscalzo, J.A.** Low-dose α -tocopherol improves and High-dose α -tocopherol worsens endothelial vasodilatador function in cholesterol-fed rabbits. *J. Clin. Invest.*, v. 93, p. 844-851, 1994.
6. **Hiramatsu, K., Arimori, S.** Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes*, v. 37, p. 832-837, 1988.
7. **Abdalla, D.S.P., Costa-Ros, L.F.B.P., Monteiro, H.P., Campa, A., Curi, R.** Human macrophage metabolism of low density lipoprotein oxidized by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis*, v. 107, p. 157-163, 1994.
8. **Brown, M. S., Masu, S. K., Falck, J. R., Ho, Y. K., Goldstein, J. L.** The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation : specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively charged LDL by macrophages. *J. Supramol. Struct.*, v. 13, p. 67-81, 1980.
9. **Jürgens, G., Hoff, H. F., Chisolm, G. M., Esterbauer, H.** Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation - characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids*, v. 45, p. 315-336, 1987.
10. **Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L.** Beyond cholesterol - Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, p. 915-924, 1989.
11. **Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Steinberg, D.** Lysophosphatidyl choline: A chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 2805-2809, 1988.
12. **Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P., Moser, U.K.** Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p. 326S-334S, 1991.
13. **Mahfouz, M.M., Kawano, H., Kummerow, F.A.** Effect OF Cholesterol-rich diets with and without added vitamins E and C on the severity of atherosclerosis in rabbits. *Am J. Clin. Nutr.*, v. 66, p. 1240-1249, 1997.

14. **Sun, J., Giraud, D.W., Moxley, R.A., Driskell, J.A.** Beta-Carotene and alpha-tocopherol inhibit the development of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 67, p. 155-163, 1997.
15. **Havel, R.J., Eder, H.A., Bradgon, H.J.** The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, v.80, p.1808-1811, 1984.
16. **Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-269, 1951.
17. **Kutnink, M. A., Skala, J. H., Sauberlich, H. E., Omaye, S. T.** Simultaneous determination of ascorbic acid, isoascorbic acid (erythorbic acid) and uric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Liquid Chromatogr.*, v. 8, p. 31-46, 1985.
18. **Keaney, J.F., Gaziano, J.M., Xu, A., Frei, B. B., Curram-Celentano, J., Shwaery, G.T., Loscalzo, J.A.** Low-dose α -tocopherol improves and High-dose α -tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J. Clin. Invest.*, v. 93, p. 844-851, 1994.
19. **Thurnhan, D. I., Smith, E., Flora, P. S.** Concurrent liquid-chromatographic assay of retinol, α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene and β -cryptoxanthin. *Clin. Chem.*, v. 34, p. 337-343, 1988.
20. **Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürgens, G.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol. Med.*, v. 13, p. 341-390, 1992.
21. **Witzum, J.L., Steinberg, D.** Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, v.88, p 1785-1792, 1991.
22. **Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L. Edwards, P. A., Watson, A.D., Lusis, A.J.** Atherosclerosis: basic mechanism: oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, v. 91, p. 2488-2496, 1995.
23. **Lynch, S.M., Frei, B.B.** Antioxidants as anti-atherogens: animal studies. In: FREI, B.B., ed. *Natural Antioxidants in human health & disease*. Academic Press, 1994.

24. **Frei, B.B.** Ascorbic Acid protects lipids human and low density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.54, p.1113S-1118S, 1991.
25. **Frei, B. B., Stocker, R., Ames, B.N.** Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 9748-9752, 1988.
26. **Frei, B.B., England, L., Ames, B.N.** Ascobate is na outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 6377-6381, 1989.
27. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 280, p. 1-8, 1990.
28. **Simon, J. A.** Vitamin C and cardiovascular disease: a review. *J. AM. Coll. Nutr.*, v. 11, p. 107-125, 1992.
29. **Levine, G.N., Frei, B. B., Koulouris, S.N., Gerhard, M.D., Keaney, J.F., Vita, J.A.** Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, v. 93, p. 1107-1113, 1996.
30. **Konneh, M.K., Rutherford, C., Anggard, E., Ferns, G. A.** Tissue distribution of alpha-tocopherol following dietary supplementation in the rat: effects of concomitant cholesterol feeding. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.210, p.156-161, 1995.
31. **Horwitt, M.K., Harvey, C.C., Dahm, D.H., Searcy, M.T.** Relationship between tocopherol and serum lipid levels for determination of nutritional adequacy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 203, p. 223-236, 1972.
32. **Widhalm, K., Holzl, M., Brubacher, G.** Lipids, lipoproteins and alpha-tocopherol: relationship and changes during adolescence. A longitudinal study. *Ann. Nutr. Metab.*, v. 29, p. 12-18, 1985.
33. **Traber, M.G., Cohn, W., Muller, D.P.R.** Absorption, tranport and delivery to tissues. In: PACKER, L., FUCHS, J. eds. *Vitamin E in health and disease*. Marcel Dekker, 1992, p. 35-52.
34. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** *Free radicals in biology and medicine*. 2.ed. Oxford University Press, 1989.
35. **Terasawa, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., Manabe, H., Nakamura, Y., Takemura, T., Tanigawa, Y., Kondo, M.** Alpha-tocopherol inhibits expression od adhesion

molecules on leucocytes and vascular endothelial cells. In: *Biennial Meeting International Society for Free Radical Research*, 7., 1996. N. 123.2.

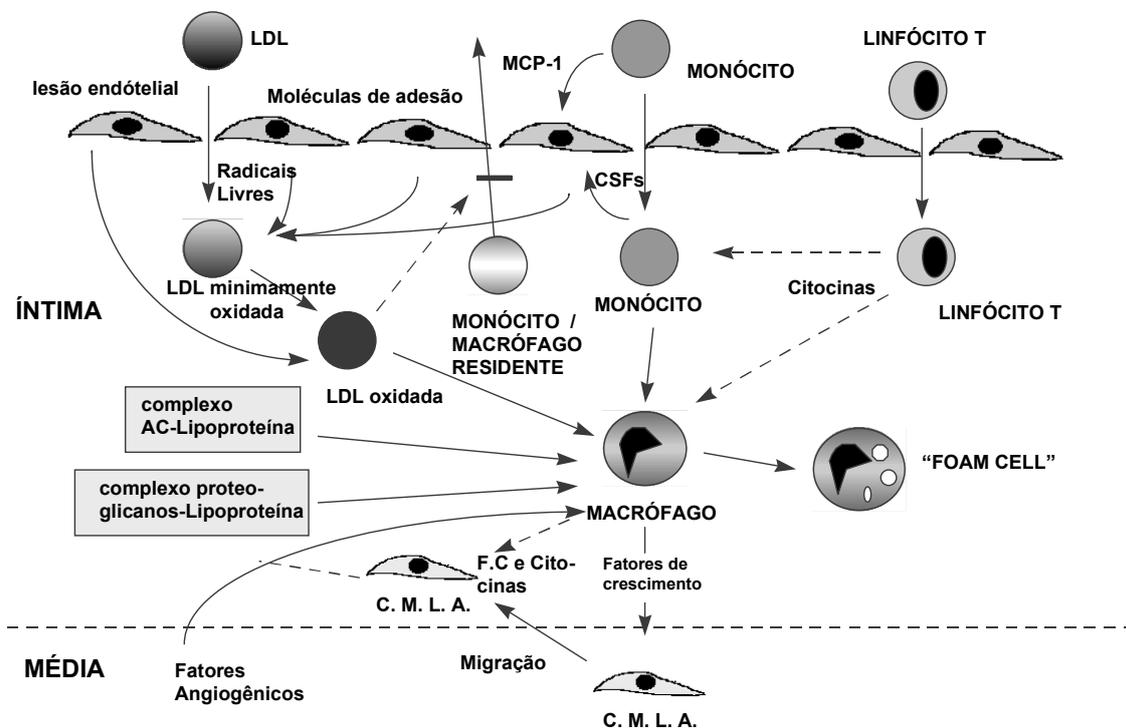


FIGURA 1 - Mecanismos pelos quais a LDL oxidada participa do processo de aterogênese. C.M.L.A - células musculares lisas arteriais; F.C - fatores de crescimento; MCP-1 - proteína quimiotática para monócito; CSFs - fatores estimuladores de colônia. (modificado de O'Brien, K.D. e Chait, A., 1994)

TABELA 1
Concentração de colesterol, triacilgliceróis e de proteína no plasma e nas lipoproteínas

	Colesterol (mg/dl)	triacilgliceróis (mg/dl)	proteína (mg/ml)
GRUPO 1			
plasma	307,1 ± 75,0	160.8 ± 71.1	61.43 ± 11.00
LDL pesada	101,3 ± 52,7	29.5 ± 11.7	0.89 ± 0.27
GRUPO 2			
plasma	165.3 ± 25.1	89.0 ± 16.6	71.56 ± 2.94
VLDL	5.5 ± 1.6	35.1 ± 10.0	0.12 ± 0.03
LDL	59.1 ± 15.9	26.9 ± 6.6	0.48 ± 0.10
HDL	32.0 ± 10.5	13.6 ± 2.5	2.81 ± 0.61
GRUPO 3			
plasma	321.9 ± 79.0*	118.7 ± 60.4	61.58 ± 10.48
VLDL	33.99 ± 25.2*	59.9 ± 31.6	0.48 ± 0.18
LDL	129.9 ± 71.4*	27.9 ± 11.3	0.94 ± 0.47*
HDL	72.19 ± 39.4*	17.8 ± 4.9	10.37 ± 7.78*

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. * significativo em relação ao grupo 2 (controle).

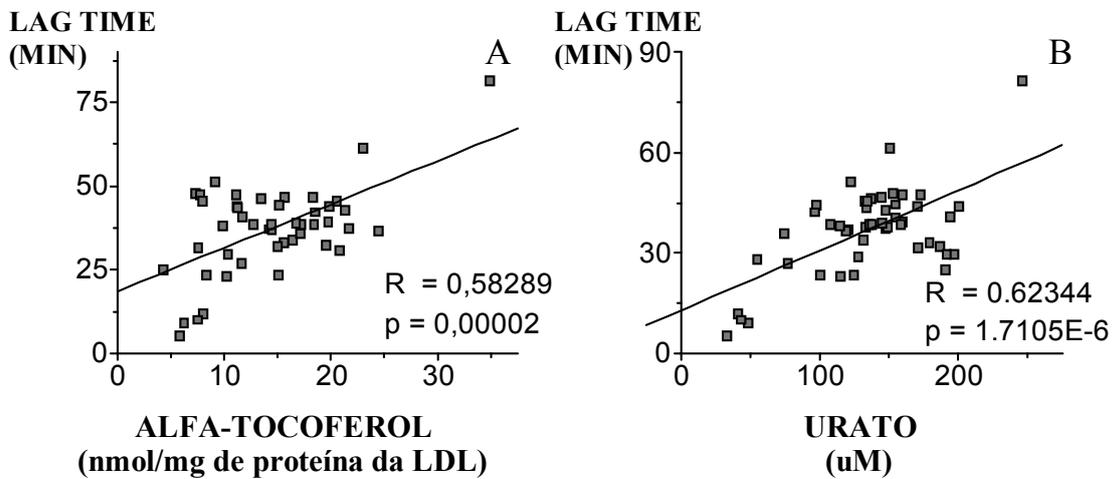


Figura 2 - Relação entre a lag time e o conteúdo de α -tocoferol na LDL pesada (A) e com a concentração plasmática de urato (B) no grupo 1. R = coeficiente de relação; p = nível de significância.

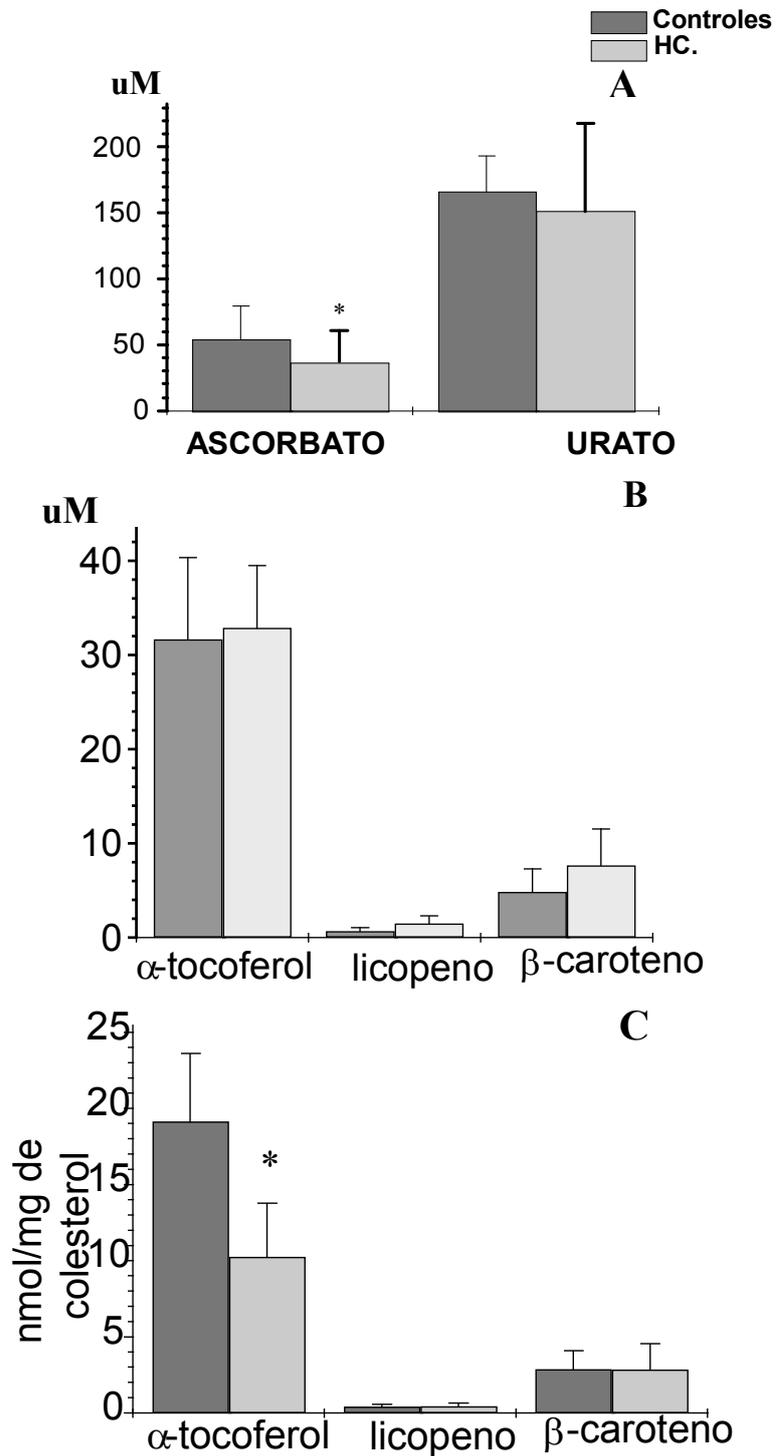


Figura 3 - Concentrações plasmáticas de ascorbato (A), urato (A), α -tocoferol (B e C), licopeno (B e C) e β -caroteno (B e C) nos grupos 2 e 3. HC. = hipercolesterolêmicos. * significativo em relação ao grupo controle.

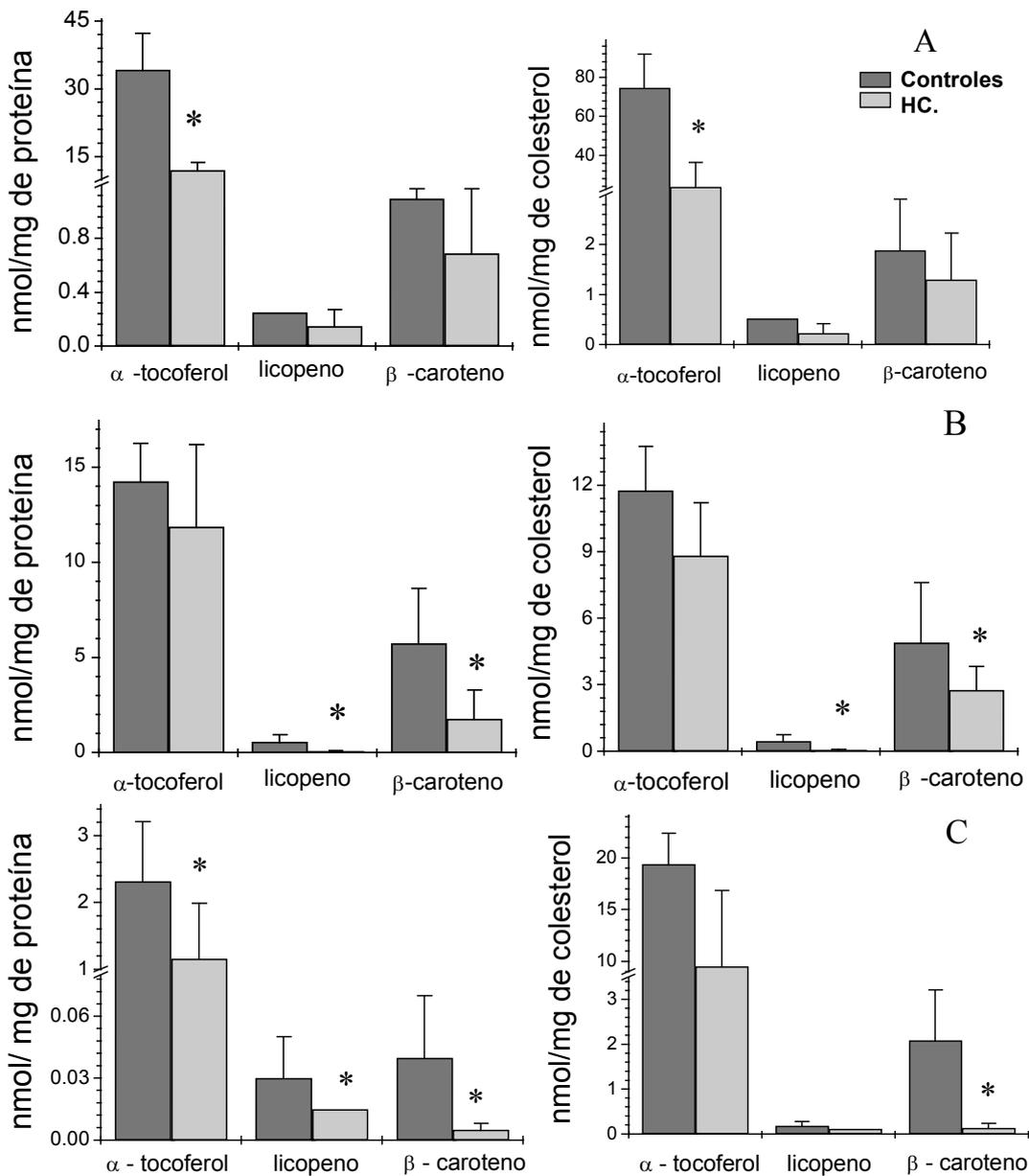


FIGURA 4 - Concentração de α -tocoferol, licopeno e β -caroteno na VLDL (A), LDL (B) e (HDL), normalizados pelo conteúdo de colesterol ou de proteína de cada partícula nos grupos 2 e 3. HC = hipercolesterolêmicos. * significativo em relação ao grupo controle.

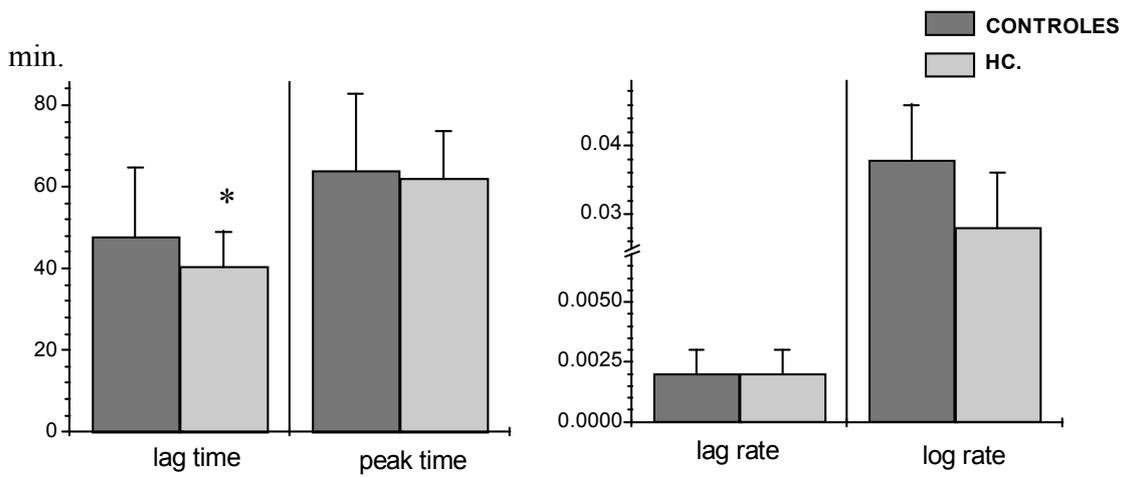


FIGURA 5 - Grau de oxidabilidade da LDL *in vitro* analisados em termos de quatro parâmetros : lag time, peak time, lag rate e log rate nos grupos 2 e 3. min. = minutos; HC. = hipercolesterolêmicos. * significativo em relação ao grupo controle.

AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS POR METODOLOGIA AUTOMATIZADA E MICROSCOPIA ÓPTICA

DIFFERENTIAL BLOOD CELLS COUNTING EVALUATION BY AUTOMATED METHODOLOGY AND OPTICAL MICROSCOPY

Spada, C.¹; Treitinger, A.¹; Ramos, L. F.M.²; Moritz, E.²; Ferreira, S. C.³; Steinwandter, M. M.³; Steinwandter, S. T.³; Cezarotto, F. S.²; Souza, N. M. A.³; Silva, M.V.P.F³.

Resumo: O hemograma é uma importante análise laboratorial de triagem na avaliação dos fatores estimuladores e diferenciadores dos precursores hemopoiéticos medulares. Em condições fisiológicas há equilíbrio entre a produção e a destruição das células sangüíneas. A avaliação do número de células sangüíneas, realizada através de microscopia óptica e/ou automatizada, pode revelar possíveis variações fisiológicas ou mesmo situações patológicas. O objetivo deste estudo foi comparar os resultados da contagem de células sangüíneas, empregando-se metodologia automatizada, com aqueles obtidos através da avaliação diferencial por microscopia óptica. As análises das células sangüíneas de 558 pacientes atendidos no Hospital Universitário foram realizadas no setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas. Os resultados deste estudo demonstram que através da metodologia automatizada determinou-se número significativamente maior de neutrófilos ($p < 0.05$) e de monócitos ($p < 0.0001$), em relação àqueles determinados por microscopia óptica. Nas determinações de plaquetas, linfócitos, eosinófilos e basófilos, não foram observadas variações significativas entre os métodos avaliados ($p > 0.05$). Esses dados sugerem que apesar da

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

agilidade dos métodos automatizados, quando o aparelho apresentar alarmes específicos em sua leitura, a análise por microscopia óptica, ainda é indispensável afim de minimizar as limitações na contagem diferencial das células sanguíneas realizadas em aparelhos automatizados, e assim garantir a qualidade do resultado.

Palavras-Chave - Células Sanguíneas, Automação e Microscopia Óptica.

Abstract: Hemogram is an important screening laboratory analysis in the assessment of stimulating and differentiating factors of medullary hemopoietic precursors. In physiological conditions, a balance is seen to exist between the production and the destruction of blood cells. The assessment of the number of blood cells, conducted by means of optical microscopy and/or by automated methods, can reveal possible physiologic variations, or even pathologic situations. The goal of the present study was to compare results of blood cells counting, using automated technology versus those obtained by the differential evaluation by means of optical microscopy. Blood cell analyses of 558 patients seen at the University Hospital were performed in the Hematology Department of the Clinical Analysis Laboratory. Results of this study showed that, using automated methodology, a significantly larger number of neutrophils ($p < 0.05$) and monocytes ($p < 0.0001$) was determined as compared to numbers arrived at by optical microscopy. In the determination of platelets, lymphocytes, eosinophils and basophils, no significant variations could be observed between the assessment methods ($p > 0.05$). The study data suggest that, notwithstanding the agility offered by automated methods, optical microscopy analysis still is, for specific reading alarms presented by the instruments, indispensable in cutting down the limitations posed by the differential

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

counting of blood cells conducted in automated equipment, assuring thus the quality of results.

Key words: Blood cells; automation; optical microscopy.

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos de Graduação do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

Endereço para Correspondência:

Professor Doutor Celso Spada

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Análises Clínicas

Campus Universitário - Trindade

Caixa Postal - 476 CEP 88.010-970 - Florianópolis - SC - Brasil

INTRODUÇÃO

A avaliação quantitativa dos leucócitos por microscopia óptica apresenta algumas desvantagens em relação à metodologia automatizada. Através da microscopia óptica consome-se mais tempo para contar número menor de células. Além disso é necessário maior número de operações para preparar a amostra biológica para a análise.

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

Nos últimos anos o avanço tecnológico verificado nas análises laboratoriais é indiscutível e sua necessidade inquestionável (Guerra-Shinohara & Santos, 1998). A contagem diferencial dos leucócitos por metodologia automatizada, em laboratórios de Análises Clínicas e especificamente na rotina hematológica, aumentou a capacidade de produção do setor em relação ao número de hemogramas realizados, proporcionou maior agilidade na expedição do resultado, dinamizou o trabalho dos profissionais do setor e proporcionou a contagem de número consideravelmente maior de células por amostra. Contudo, a grande preocupação dos profissionais da área está voltada para a sensibilidade e especificidade que os aparelhos apresentam em detectar possíveis variações fisiológicas e/ou patológicas, como desvio à esquerda e alterações em relação as células mononucleares sangüíneas (Grotto et alli, 1998).

A ocorrência de sinal de alerta, acusado pelo equipamento no momento da informação do resultado, sinalizando alteração na forma das hemácias, no número de plaquetas, na presença de células jovens da linhagem granulocítica ou na presença de alterações linfocitárias, determina a necessidade de repetir a análise por microscopia óptica.

A sensibilidade do aparelho automatizado em detectar alterações, bem como a frequência e a incidência percentual das mesmas, apontam para a necessidade de conhecer os níveis de confiabilidade e fidelidade dos resultados.

O objetivo deste estudo foi comparar a avaliação quantitativa das células sangüíneas realizadas através de metodologia automatizada com a avaliação por microscopia óptica.

MATERIAIS E MÉTODOS

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

Foram analisadas amostras sanguíneas de 558 pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. O sangue foi coletado utilizando-se de sistema a vácuo em frascos contendo EDTA para a realização do hemograma. O trabalho foi realizado no período de setembro a dezembro de 1997. As amostras biológicas foram analisadas em aparelho automatizado Cell Dyn 3000 SL - Abbott e por microscopia óptica.

A metodologia automatizada empregada usa como princípio para reconhecimento e identificação das células sanguíneas a dispersão de laser, onde o número de lóbulos das células e o conteúdo nuclear são fatores determinantes na caracterização de granulócitos e células mononucleares.

Ao mesmo tempo em que a contagem automatizada foi realizada, procedeu-se a confecção de extensões sanguíneas em lâminas e coloração por May Grunwald-Giemsa. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em microscópio óptico marca Olympus CBA, sendo contadas 100 células de forma transversal da lâmina (Bauer, 1980).

As amostras foram analisadas através das duas metodologias no período, máximo, de 04 (quatro) horas após a coleta do material biológico, conforme as normas preconizadas para processamento.

A análise da amostra deve obedecer critérios mínimos como: ausência de agregados plaquetários, ausência de coágulos visíveis, área de avaliação, delimitação das margens da lâmina, transição gradual das áreas espessas para as mais finas, aspecto da morfologia celular, ausência de artefato de técnica e distribuição homogênea das células (Marangoni & Fernandes, 1998), para obtenção de resultados confiáveis, que

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

permitam estabelecer com precisão e exatidão o resultado da amostragem, refletindo com o máximo de fidelidade possível a real condição do paciente em questão.

Os dados deste estudo foram avaliados estatisticamente pelo teste paramétrico de ANOVA, o qual assume que a mediana dos valores obtidos dos exames apresenta o mesmo desvio padrão. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%. Os valores foram considerados significativos somente quando as diferenças de medianas entre as determinações eram da ordem de $p < 0.05$.

RESULTDOS

A Figura 1 apresenta os valores percentuais das células sangüíneas presentes nas amostras avaliadas. Estatisticamente observa-se variação significativa ($p < 0.0001$) entre os valores encontrados por análise automatizada em relação a contagem efetuada por leitura ao microscópio óptico.

Inserir aqui a FIGURA 1.

A Figura 2 apresenta os valores percentuais de neutrófilos e linfócitos sangüíneos encontrados nas amostras avaliadas. O número de neutrófilos diminuiu significativamente ($p < 0.05$) quando a contagem foi realizada em microscopia óptica em relação a contagem efetuada em aparelho automatizado.

Inserir aqui a FIGURA 2.

Na Figura 3 observa-se o número de plaquetas encontrados nas amostras avaliadas. Apesar de apresentar índices maiores para este parâmetro, quando a avaliação

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

foi realizada por aparelho automatizado, em relação a avaliação por microscopia óptica, a diferença não apresentou significância estatística ($p>0.05$).

Inserir aqui a FIGURA 3.

Na tabela 01 são apresentados os valores percentuais de neutrófilos e monócitos encontrados nas contagens efetuadas entre os indivíduos que apresentaram alarme *flag*. Os resultados obtidos demonstram que houve variações significativas ($p=0.002$) de neutrófilos entre a contagem por análise automatizada em relação a contagem efetuada por leitura ao microscópio óptico. Em relação aos monócitos, a contagem por análise automatizada, foi estatisticamente menor ($p=0.0006$) pelo Teste de ANOVA, quando comparado com os índices de significância obtidos na avaliação do número de monócitos de todos os indivíduos avaliados (Figura 1).

Inserir aqui a TABELA 1.

DISCUSSÃO

A análise hematológica dos aparelhos automatizados avaliados quanto a sensibilidade e especificidade em gerar *flags*, demonstrou que contribuiu significativamente (88,9-100%) para a identificação de anormalidades dos granulócitos (Lippi et alli, 1997).

Para Fournier et alli⁽⁷⁾, os dados obtidos da análise inter aparelhos e comparando-os com os resultados obtidos por contagem em microscopia óptica, não

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

apresentaram variações significativas, contudo os dados foram menos consistentes quando a avaliação era realizada em crianças.

Dadas as variações percentuais e totais da contagem de linfócitos, quando são comparadas pessoas de idades diferentes, torna-se necessária a contagem pelo método por microscopia óptica, principalmente quando tratar-se de crianças (Cavalcanti-Júnior et alli, 1997 & Shahabuddin et alli, 1998), onde a contagem de linfócitos geralmente é superior aos valores de referência aos de uma pessoa adulta, pois linfócitos atípicos podem ser considerados pelo aparelho automatizado como sendo monócito.

A comparação do alarme *flag* com a contagem manual revelou um bom índice de correlação (>70%), no entanto, quando as alterações referentes ao alarme *flag* eram superiores a 20%, o percentual de correlação foi inferior (Thalhammer-Scherrer et alli, 1997). Esse resultado vem de encontro ao resultado por nós encontrado, demonstrando que sempre que há a presença do alarme *flag* na leitura do aparelho automatizado, ainda é indispensável a leitura por microscopia óptica (Tabela 1).

Barnard et alli⁽²⁾ concluíram que dados os resultados falso negativos (12,2 %) e falso positivos (13,4%) obtidos em determinados aparelhos, a contagem diferencial em microscópio óptico é recomendada, dado seus baixos índices de resultados falso negativos (0,8%). Para d'Onofrio et alli⁽⁶⁾, a análise por automação apresentou resultado falso negativo em 6,6%, com sensibilidade de 82,0% e baixa especificidade 71,5%, sendo que a contagem que apresentou maiores índices de resultados falso negativos foram os monócitos.

Os resultados obtidos nesse estudo, onde utilizamos apenas um aparelho automatizado em comparação às contagens realizadas por microscopia óptica, apresentaram resultados semelhantes aos obtidos por Llompart et alli⁽¹²⁾ que

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

compararam o resultado obtido por aparelhos automatizados em relação ao exame realizado por microscopia óptica, o qual foi utilizado como referência, e verificaram que os *flags* correspondiam a monócitos, bastonetes e linfócitos atípicos. Ainda observaram que os monócitos apresentaram variações maiores em relação as demais células. No entanto, na análise entre aparelhos automatizados de procedências diversas e com princípios de reconhecimento celular diferentes, em comparação com a contagem em microscopia óptica, foi observada linearidade e reprodutibilidade aceitáveis ($R > 0,9$) para neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Por outro lado em relação aos monócitos foi verificado o mesmo problema detectado em nosso estudo (Figura 1), cujos valores apresentaram-se superiores em aparelho automatizado em relação a contagem realizada por microscopia óptica (Aubert-Letrillart et alli, 1994).

Para Salvati et alli⁽¹⁴⁾, a análise automatizada é válida, contudo encontrou dificuldades em classificar corretamente os linfócitos atípicos e monócitos por automação, pois em comparação com a microscopia óptica havia discordância. Outros autores (Bas et alli, 1993 & Jou et alli, 1991) também verificaram discrepâncias em relação a contagem dos monócitos por metodologia automatizada em relação a microscopia óptica, cujos resultados foram semelhantes aos obtidos nesse estudo. O elevado erro médio padrão, a imprecisão e a acurácia, em relação a contagem de monócitos por metodologia automatizada, foram considerados inaceitáveis (Swaim, 1991).

Pela análise dos dados aqui apresentados e pelos trabalhos descritos na literatura, não resta dúvidas quanto a necessidade e importância da automação em hematologia clínica, principalmente quando os parâmetros hematológicos mantêm-se dentro dos valores de referência, contudo constata-se que há discrepâncias entre os dados obtidos

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

em aparelhos automatizados em relação a contagem realizada em microscópio óptico em situações diversas, como em: crianças, processos infecciosos virais com leucocitose e linfocitose, processos infecciosos bacterianos com leucocitose e neutrofilia, leucopenias, casos de processos leucopenizantes e leucemias, anemias, plaquetopenias ou plaquetoses, gravidez e recém natos. Principalmente nesses casos, a contagem diferencial dos leucócitos, também por microscopia óptica faz-se necessária. Para tanto torna-se imprescindível, que cada laboratório estabeleça critérios de padronização interna e externa, seguindo normas preconizadas e estabelecidas como padrão, para a utilização da automação em hematologia em seu estabelecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - Aubert-Letrillart, B., Binet, J. L., Baudet, S., Azgui, Z. & Herle-Beral, H.

Performance evaluation of the hametological analyser Cell-Dyn 3000 (Abbott).
Nouv. Rev. Fr. Hematol. 35(6):535-540,1994.

2 - Barnard, D. F., Barnard, S. A., Carter, A. B., Patterson, K. G., Yardumian, A.

& Machin, S. J. An evaluation of the Coulter VCS differential counter. Clin.
Lab. Haematol. 11(3):255-266,1989.

3 - Bas, B. M., Catsberg, M. J. & Kamp, S. L. A short evaluation of a new

haematological analyser: the Cobas Argos 5 Diff. Eur. J. clin. Chem. Clin.
Biochem. 31(9):603-608,1993.

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

- 4 - **Bauer, J. D.** Hematology In: Gradowohol's clinical laboratory methods and diagnosis. London, C. V. Mosby, 1980. 631-951.
- 5 - **Cavalcanti-Junior, G. B., Araújo, M. C. P. & Brito, R. N. S.** Comportamento do leucograma em crianças com pneumonia. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 29(2):69-72,1997.
- 6 - **D'Onofrio, G., Salvati, A. M., Berti, P., Cappabianca, M. P., Marsili, G., Quarantelli, M., Zini, G., Casini, C., De Philippis, C., & Mango, G.** Analysis of leucocyte populations with the Coulter S-Plus STKR as a screening tool for haematological abnormalities. Clin. Lab. Haematol. 13(1):51-66,1991.
- 7 - **Fournier, M., Gireau, A., Chretien, M. C., Boniface, B., Goudemand, J. & Cosson, A.** Laboratory evaluation of the Abbott Cell Dyn 3500 5-part differential. Am. J. Clin. Pathol. 105(3):286-292,1996.
- 8 - **Grotto, H. Z. W., Erbetta, A., Gilberti, M. F. P., Mendes, R. S. S., Botani, C. R. & Oliveira, F. M.** Automação em Hematologia: Avaliação de quatro sistemas. NewsLab, 28:62-70,1998.
- 9 - **Guerra-Shinohara, E. M. & Santos H. G.** Estudo morfológico do hemograma: variação inter-observador em um painel de casos. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 30(2):41-44,1998.

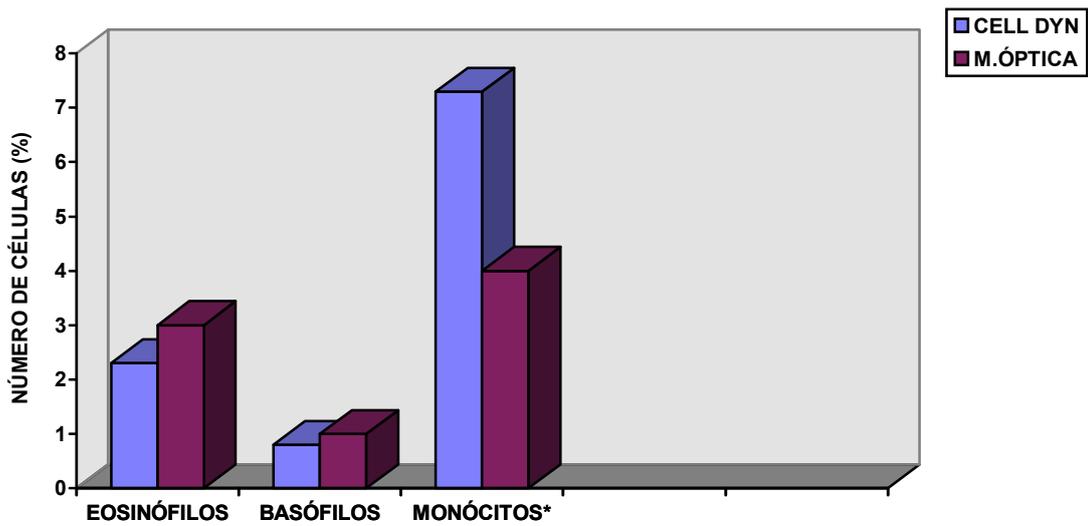
- 10 - Jou, J. M., Pastor, C., Aymerich, M., Villamor, N., Reverter, J. C., Bruges, R. M. & Vives Corrons, J. L.** Evaluation of the Sysmex NE-8000 analyzer according to the norms of the International Committee for Standardization in Hematology. *Sangre*. 36(5):387-393,1991.
- 11 - Lippi, G., Nicoli, M., Modena, N. & Guidi, G.** Clinical performance of leukocyte differential on the new Roche Cobas Veja haematological analyzer. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. 35(2):105-110,1997.
- 12 - Llopart, I., Vila, M., Quetglas, P., Perez, G. & Fuentespina, E.** Evaluation of the hematologic autoanalyzer Coulter Maxm. *Sangre*. 40(2):121-128,1995.
- 13 - Marangoni, V. B & Fernandes, R. M. C.** Contagem diferencial de leucócitos - Comparação de contadores hematológicos automatizados. *NewsLab*, 27:92-97,1998.
- 14 - Salvati, A. M., d'Onofrio, G., Berti, p., Cappabianca, M. P., Marsili, G.,.** An assessment of the operating characteristics of Coulter Counter Model S-Plus STKS. *Haematologica*. 76(2):94-103,1991.
- 15 - Shahabuddin, S., al Aayed, J. H., el-Rad, M. O. & Qureshi, M. I.** Lymphocyte subset reference ranges in healthy Saudi Arabian children. *Pediatr. Allergy Immunol*. 9(1):44-48, 1998.

16 - Swaim, W. R. Laboratory and clinical evaluation of white blood cell differential counts. Comparison of the Coulter VCS, Technicon H-1, and 800-cell manual method. *Am. J. Clin. Pathol.* 95(3):381-388,1991.

17 - Thalhammer-Scherrer, R. Knobl, P., Korninger, L. & Schwarzinger, I. Automated five-part white blood cell differential counts. Efficacy of software-generated white blood cell suspect flags of the hematology analysers Sysmex SE-9000, Sysmex NE-8000, and Coulter STKS. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121(6):573-577,1997.

FIGURA 1. Valores percentuais de eosinófilos, basófilos e monócitos sanguíneos em 558 amostras avaliadas

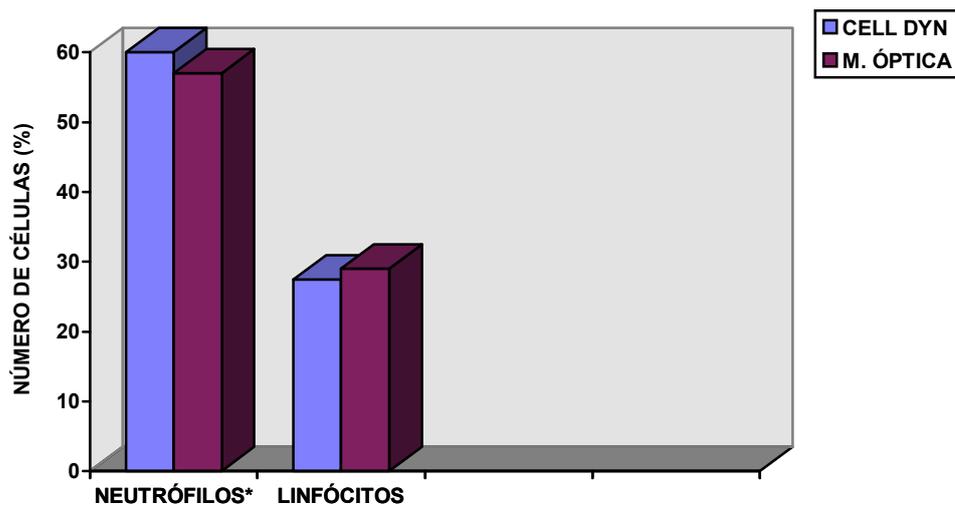
¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.



* Teste de ANOVA $p < 0.0001$

FIGURA 2. Valores percentuais de neutrófilos e linfócitos sangüíneos em 558 amostras avaliadas

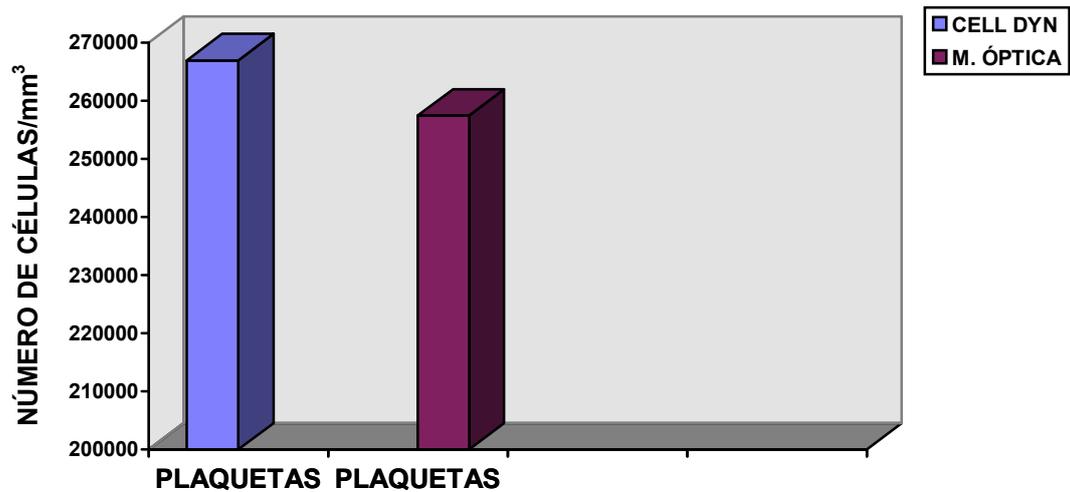
¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.



* Teste de ANOVA $p < 0.05$

FIGURA 3. Valores de plaquetas em milímetros cúbicos de sangue em 558 amostras avaliadas

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.



Teste de ANOVA $p > 0.05$

TABELA 1. Valores percentuais das células sanguíneas nas amostras que apresentaram alarme *flag*

	CELL DYN	MICROSCOPIA ÓPTICA

¹Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC. ²Alunos do Curso de Farmácia da UFSC. ³Farmacêuticos-Bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HU/UFSC.

	Mediana	D.P.	E.M.P.	Mediana	D.P.	E.M.P.
NEUTRÓFILOS*	72.40	18.20	1.49	64.00	17.58	1.48
MONÓCITOS**	6.80	6.69	1.28	3.00	2.15	0.46
LINFÓCITOS	19.20	24.05	2.44	19.00	23.71	2.51

D.P.= Desvio Padrão

E.M.P.=Erro Médio Padrão

* Teste de ANOVA $p=0.002$

** Teste de ANOVA $p=0.0006$

COPROSCOPIA NO DIAGNÓSTICO DA GIARDÍASE ¹

COPROSCOPY IN THE DIAGNOSIS OF GIARDIASIS

Maria Marcia Imenes Ishida (2) & Cláudio Santos Ferreira (3)

-
- 1) Parte da dissertação de mestrado de Maria Marcia Imenes Ishida, apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia, 1995.
 - 2) Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina.
 - 3) Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Correspondência para: Profa. Maria Marcia Imenes Ishida – Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Universidade Federal de Santa Catarina – 88010-970 Trindade, Florianópolis (SC).

RESUMO

Examinamos espécimens fecais de habitantes de Candeias do Jamari (estado de Rondônia, Amazônia Brasileira), de ambos sexos, sem seleção por idade e de crianças (1 a 13 anos de idade), de ambos sexos, pacientes do Hospital Universitário (H.U.) da Universidade de São Paulo. Técnicas qualitativas de concentração: sedimentação por gravidade e centrífugo-flutuação. Técnica quantitativa: contagem de cistos de *Giardia* em esfregaços de concentração determinada fotometricamente segundo a técnica de Beaver¹ (modificada). As quantidades de cistos por grama de fezes (CPG) foram calculadas com o uso de planilha de computador. *Giardia*, o parasita intestinal mais freqüente em ambas amostras populacionais, foi identificado nas fezes de 13,2% de 415 habitantes de Candeias do Jamari (CPG = $2,15 \times 10^3$ em média) e de 11,5% de 355 crianças em tratamento no H.U. (CPG = $2,20 \times 10^3$ em média). Os valores de CPG apresentaram distribuição superdispersa: uma pequena proporção dos hospedeiros excretou a maior parte dos cistos. As helmintíases mais freqüentes entre habitantes de Candeias do Jamari e pacientes do H.U. foram, respectivamente: ancilostomíase (12,7%) e ascaríase (7,0%). As técnicas usadas neste estudo foram projetadas para baixo custo operacional e alta sensibilidade.

UNITERMOS: Parasitas intestinais; Giardíase; Coproscopia parasitológica; Coproscopia quantitativa.

SUMMARY

We examined fecal specimens from inhabitants of Candeias do Jamari (state of Rondônia, Brazilian Amazon Region), of both sexes, regardless of age, and children (1 to 13 years old), of both sexes, under treatment at the Hospital Universitário (H.U.) of the University of São Paulo, city of São Paulo, State of São Paulo, Brazil. Qualitative concentration methods: gravity sedimentation and centrifugal flotation. Cyst counts: Beaver's¹ photometric (modified) was used to evaluate the concentration of fecal smears where *Giardia* cysts were counted. Results in terms of cysts per gram feces (CPG) were calculated with the aid of a microcomputer worksheet. *Giardia*, the most frequent intestinal parasite in both population samples, was identified in the feces of 13,2% of 415 inhabitants of Candeias do Jamari (average CPG = 2.150×10^3) and 11.5% of 355 children under treatment at H.U. (average CPG = 2.201×10^3). In both cases the distribution of CPG values was overdispersed, most cysts being excreted by a small proportion of the hosts. The helminthiasis most frequently found among the inhabitants of Candeias do Jamari and the H.U. patients were, respectively, ancylostomiasis (12.7%) and ascariasis (7.0%). The techniques used in this study aimed at low operational costs and improved sensitivity.

KEYWORDS: Intestinal parasites; Giardiasis; Parasitological coproscopy; Quantitative coproscopy.

INTRODUÇÃO

A observação de protozoários do gênero *Giardia* como parasitas do homem e de outros vertebrados (Hegner, 1922)¹¹ levou muitos autores a aceitar o critério de sua especificidade de hospedeiro, resultando daí a descrição de diversas espécies. Permanece até hoje incerta a posição taxonômica de várias espécies deste gênero, assunto que, de acordo com Thompson et al. (1990)²⁵, demanda ulteriores refinamentos metodológicos. Deste modo, usaremos apenas o nome genérico *Giardia* neste trabalho.

Em discussão desde o início deste século, a importância clínica da giardíase é hoje evidente (Farthing, 1993)⁴. Predominantemente sintomática quando associada à AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome* (Glaser et al., 1994)⁹, é alta sua prevalência entre homossexuais masculinos (Lockwood & Weber, 1989)¹⁵.

Embora as provas sorológicas (Goldin et al., 1993; Visvesvara et al., 1980)^{10, 27} representem importante progresso no diagnóstico da giardíase (Engelkirk & Pickering, 1990)³, a pesquisa de parasitas por meio do microscópio de luz encontra ainda ampla aplicação por ser não-invasiva, fácil de executar, de baixo custo e demandar equipamento já disponível em laboratórios de parasitologia. Cistos ou trofozoítos de *Giardia* são geralmente pesquisados em amostras fecais e, mais raramente, em aspirados duodenais e fragmentos de tecidos. Entretanto, para que se possam esperar resultados consistentes, todas as operações devem ser planejadas e executadas por pessoal adequadamente treinado. Danciger & López (1975)² chegam a preconizar, para reduzir a proporção de negativos falsos, o exame de 2 a 3 amostras (de cada paciente) por semana durante 4 ou 5 semanas. Os mesmos autores usam a técnica quantitativa original de Beaver¹ para analisar padrões de excreção de cistos de *Giardia* em crianças. Tais padrões fornecem importantes informações sobre a distribuição da excreção de cistos em populações de hospedeiros,

relevantes em pesquisa clínica e epidemiológica. A técnica fotométrica, originalmente proposta por Beaver para avaliar concentrações de esfregaços fecais, é simples e de baixo custo. As modificações adotadas visando a aumentar sua precisão, incluem o uso de um filtro óptico e leituras fotométricas, em termos de absorbância (ou de transmitância), feitas através de objetiva de microscópio com abertura numérica conhecida. Calculam-se as concentrações fecais dos esfregaços por meio de equações de regressão linear, de acordo com procedimentos usados em determinações fotométricas²¹. Contagens de formas evolutivas de parasitas eliminados por hospedeiros individuais representam informações importantes para o estudo clínico das infecções parasitárias e tornam possível analisar o papel desses hospedeiros na disseminação de material contaminante no ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações

Este estudo incluiu amostras de duas populações humanas:

1) Habitantes de Candeias do Jamari (63°54'W, 8°45'S), cidade do estado de Rondônia, Brasil (população: 7.600 habitantes), a 21 km a leste de Porto Velho, capital do estado. A cidade não conta com um sistema adequado de esgotos e a rede de abastecimento de água só é acessível a cerca da metade da população urbana. Entre agosto e novembro de 1990 foram colhidas 415 amostras de fezes dos habitantes locais (sem seleção por sexo ou idade). As amostras de fezes, transferidas para recipientes de plástico com o fixador MF (mertiolato-formalina), permaneceram aí até a ocasião do exame.

2) Crianças com idades de 1 a 13 anos, em tratamento no Hospital Universitário (H.U.) da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Durante o ano de 1993, de abril a outubro, espécimens fecais foram colhidos de uma amostra de 355 crianças de ambos os sexos. As amostras permaneceram sob refrigeração (cerca de 4° C), por um período de até 5 dias, até o momento do exame.

Técnica quantitativa

A quantidade de fezes contidas em cada esfregaço é avaliada por meio do método fotométrico proposto por Beaver (1949)¹ e modificado por Ferreira & Carvalho (1971)⁷ e Ferreira (1978)⁸. Neste caso, utiliza-se para a fotometria um microscópio monocular equipado com objetiva 3× e ocular tipo Huyghens sobre cujo diafragma há um

fotorresistor de sulfeto de cádmio (CdS) conectado a um instrumento medidor de resistência elétrica. O iluminador, de baixa voltagem (6 V), é equipado com filtro "luz do dia". A aferição do instrumento é simples e é fácil obter valores de absorvância (ou de transmitância) a partir de leituras em Ohms. Diluições fecais em série, em água destilada, foram preparadas e volumes conhecidos de cada suspensão transferidos para lâminas de microscopia. A preparação foi coberta com lamínula. Valores de absorvância e concentrações de esfregaços fecais foram associados por meio de regressão linear. Este cálculo obedece às normas gerais de determinações fotométricas: após determinar valores de absorvância correspondentes a concentrações conhecidas de esfregaços, obtém-se a equação de regressão que permite estimar concentrações de esfregaços fecais a partir de valores de absorvância²¹. O uso de objetivas com valores diferentes de abertura numérica demandará novos cálculos desta equação. As contagens de cistos de protozoários ou ovos de helmintos são feitas do modo habitual, em microscópio binocular. Quando o número de cistos por lâmina for muito alto, pode ser necessário realizar contagens por campo ou por faixa (da largura de um campo e comprimento igual a uma das dimensões da lamínula). Neste caso, deve ser medido o diâmetro do campo projetado sobre o plano do objeto. Novas medições do diâmetro do campo serão necessárias se houver modificações de sistemas ópticos.

Técnica:

1. Colocar uma gota de água sobre uma lâmina de microscopia e preparar um esfregaço, acrescentando quantidade de fezes suficiente para a obtenção de um esfregaço adequado ao exame. Cobrir a preparação com lamínula.

2. Usando o microscópio adaptado para fotometria, fazer leituras de absorvância em quatro campos próximos aos cantos da lamínula. Anotar as 4 leituras.

3. Examinar a lâmina usando microscópio binocular do qual tenham sido medidos previamente os diâmetros dos campos.

4. Contar números de cistos por campo, por faixa (diâmetro do campo \times largura da lamínula) ou em toda a lâmina, de acordo com sua numerosidade, avaliada por inspeção prévia.

Cálculos:

As variáveis necessárias para calcular CPG são: número de cistos contados em área conhecida de esfregaço e as quatro leituras de absorvância. As constantes são: diâmetro do campo do microscópio projetado na preparação, dimensões da lamínula e coeficientes linear e angular, respectivamente a e b , da equação de regressão: $y = a + bx$ que relaciona valores de absorvância (x) a concentrações de esfregaços fecais (y)²¹. O uso de planilha de computador, embora não indispensável, é aconselhável, por simplificar notavelmente o processo: estando a planilha organizada e contendo as constantes necessárias, é suficiente introduzir o número de cistos por campo, por faixa ou em toda a lâmina, o número de campos, faixas ou lâminas em que as leituras foram feitas e os valores de absorvância. Será calculado automaticamente o número de cistos por grama de fezes (CPG), podendo, se necessário, ser observados resultados intermediários dos cálculos.

Técnicas qualitativas

Sedimentação por gravidade:

Transferir cerca de 17 ml de suspensão fecal (concentração: aproximadamente 1,5%) previamente tamisada através de tela de nylon (14 malhas/cm) para um tubo de ensaio de 100 \times 15 mm. Após um período de sedimentação de 2 horas, remover o

sobrenadante por meio de pipeta. Um volume de 0,5 ml de sedimento deverá ser deixado para exame^{17, 18}.

Centrifugo-flutuação:

Transferir uma alíquota de suspensão fecal preparada como descrito acima para um tubo de ensaio e processar segundo a técnica de centrífugo-flutuação^{5, 20} modificada por Pereira¹⁹.

RESULTADOS

1) Amostras fecais de habitantes de Candeias do Jamari (Rondônia, Brasil)

A Tabela 1 mostra as proporções de amostras fecais positivas para parasitas intestinais dentre as 415 examinadas. A Tabela 2 mostra a distribuição de proporções de positividade para *Giardia* e valores de CPG por grupo etário. Ambas revelaram diferenças significantes entre grupos etários ($p < 0,05$ – teste de Kolmogorov-Smirnov)²³. A Figura 1 mostra a distribuição de freqüências de valores de CPG.

Tabelas 1 e 2

Figura 1

2) Amostras fecais de pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil)

A Tabela 3 mostra as proporções de amostras fecais positivas para parasitas intestinais dentre as 355 examinadas. A Tabela 4 mostra a distribuição das proporções de amostras positivas para *Giardia* e valores de CPG, por grupo etário. As diferenças entre grupos etários mostraram-se significantes ($p < 0,05$ – teste de Kolmogorov-Smirnov)²³. A Figura 2 mostra a distribuição de freqüências de valores de CPG.

Tabelas 3 e 4

Resultados positivos e negativos, para *Giardia* ou protozoários e helmintos, obtidos por meio de sedimentação por gravidade ou centrífugo-flutuação, podem ser comparados por inspeção das Tabelas 5 e 6 respectivamente.

Figura 2

Tabelas 5 e 6

Não se encontraram diferenças significantes entre as proporções de positivos para *Giardia* entre os pacientes do Hospital Universitário e os habitantes de Candeias do Jamari ($p > 0,05$ – Teste G)²³.

Parasitas dos gêneros *Microsporidium* e *Cryptosporidium*, que exigem técnicas especiais para sua identificação, não foram pesquisados. Por motivos operacionais, não foi também usado o “anal swab” para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*.

DISCUSSÃO

Embora as duas populações incluídas neste estudo fossem diferentes quanto às condições de vida, situação geográfica e grupos etários, ambas revelaram proporções equivalentes de amostras fecais positivas para *Giardia*. O nível sócio-econômico dos 415 habitantes de Candeias do Jamari era praticamente homogêneo, o que não se aplica à amostra de 355 pacientes do Hospital Universitário.

A giardiase foi a parasitose mais freqüentemente observada em ambas populações (habitantes de Candeias do Jamari, 13,2%; pacientes do Hospital Universitário, 11,5%), como se observa nas Tabelas 1 e 3. Proporções significativamente diferentes de positividade para *Giardia* foram encontradas entre grupos etários em ambas amostras de populações (Tabelas 2 e 4), o que concorda com as observações de Speelman & Ljungström (1986)²⁴ e Kasuya et al. (1989)¹³. O decréscimo da prevalência relacionado com a idade pode ser atribuído à perda de suscetibilidade resultante da interação hospedeiro-parasita, que poderia explicar a concomitante redução dos valores de CPG (Tabelas 2 e 4). O alto valor de CPG observado no grupo etário de 40 anos ou mais foi devido a contagens referentes a um único hospedeiro (Tabela 2). Em ambas populações a distribuição dos valores de CPG foi superdispersa (Figuras 1 e 2), como tem sido observado em outras parasitoses: as populações mais numerosas de parasitas são albergadas por uma pequena proporção da população de hospedeiros (Schulz & Kroeger, 1992; Vargas-Méndez, 1993; Ferreira et al., 1994)^{22, 26, 8}.

A sedimentação por gravidade em tubos de ensaio, durante duas horas, produziu esfregaços suficientemente límpidos para permitir a pronta identificação dos cistos de *Giardia*. As amostras de pacientes do Hospital Universitário foram também concentradas

segundo a técnica da centrífugo-flutuação (Faust et al., 1938)⁵ executada de acordo com as recomendações de Pereira (1984)¹⁹. Ambas as técnicas produziram resultados equivalentes (Tabelas 5 e 6), como foi assinalado com o uso da estatística Kappa^{14, 16}, entretanto, há um aumento de sensibilidade com o uso simultâneo dos dois métodos.

Os valores de CPG são importantes para investigar a distribuição de populações de parasitas nas populações de hospedeiros e a contribuição de hospedeiros individuais na contaminação do ambiente com formas evolutivas do parasita. O delineamento de esquemas quimioterápicos seletivos é baseado em tais informações (Hlaing et al., 1987)¹².

O fato de as técnicas quantitativas de exames de fezes serem geralmente laboriosas e de custo elevado tem contribuído para seu uso infreqüente. O método fotométrico para avaliar a concentração de esfregaços fecais é equivalente em precisão àqueles adotados em outras técnicas quantitativas. As modificações sugeridas por Ferreira & Carvalho (1971)⁷ e Ferreira (1978)⁸, tornam mais rápidas e precisas as determinações fotométricas e mais simples os cálculos de CPG. O microscópio monocular e o multímetro usados na fotometria podem já estar disponíveis no laboratório e o fotorresistor tem custo baixo. A demanda de tempo é pequena, uma vez que as contagens são feitas em esfregaços diretos. Este método permite o uso de exames quantitativos em rotina laboratorial, por ser necessário fazer as leituras fotométricas apenas nas amostras em que forem encontrados parasitas. O uso de planilha de microcomputador simplifica ainda mais o processo de contagem. As estimativas de CPG podem, entretanto, ser feitas com o auxílio de calculadora de bolso.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Drs. Luís Marcelo Aranha Camargo e Marcelo Urbano Ferreira, docentes do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pelo acesso a espécimens fecais da população de Candeias do Jamari (RO) e ao Dr. Nelson Fontana Margarido, Diretor Assistente Técnico da Superintendência do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pelo acesso a espécimens fecais de pacientes do Hospital.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEAVER, P.C. – Quantitative hookworm diagnosis by direct smear. **J. Parasit.**, **35**: 125-135, 1949.
2. DANCIGER, M. & LOPEZ, M. – Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. **Amer. J.trop. Med. Hyg.**, **24**: 237-242, 1975.
3. ENGELKIRK, P.G. & PICKERING, L. K. – Detection of *Giardia* by imunologic methods. In: MEYER, E.A., ed. *Giardiasis*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, 1990. p.187-198.
4. FARTHING, M.J.G. – Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. Pathogenesis of giardiasis. **Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, **87**: 17-21, 1993.
5. FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODOM, V.; MILLER, M.J.; PERES, C.; SAWITZ, W; THOMEN, L.F.; TOBIE, J. & WALKER, J.H. – A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, **18**: 169-183, 1938.
6. FERREIRA, C.S.- *Avaliação de técnicas de pesquisa de ovos de helmintos nas fezes: alguns aspectos básicos*. São Paulo, 1978. (Tese de Docência-Livre - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).
7. FERREIRA, C.S. & CARVALHO, M.E. – Simplificação do método de Beaver para a padronização de esfregaços de fezes. **Rev. paul. Med.**, **78**: 35, 1971.
8. FERREIRA, C.S.; FERREIRA, M.U. & NOGUEIRA, M. R. – The prevalence of infection by intestinal parasites in an urban slum in São Paulo, Brazil. **J. trop. Med. Hyg.**, **97**: 121-127, 1994.
9. GLASER, C.A.; ANGULO, F.J. & ROONEY, J.A. – Animal-associated opportunistic infections among persons infected with the human immunodeficiency virus. **Clin. infect. Dis.**, **18**: 14-24, 1994.
10. GOLDIN, A. J.; HALL, A.; SARKER, R.N.; WARHURST, D.C. & MILES, M.A. –Diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in Bangladeshi infants: faecal antigen capture ELISA. **Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, **87**: 428-432, 1993.

11. HEGNER, R.W. – A comparative study of the giardias living in man, rabbit and dog. **Am. J. Hyg., 2:** 442-454, 1922.
12. HLAING, T.; SAW, T.; LWIN, M. – Reinfection of people with *Ascaris lumbricoides* following single, 6-month and 12-month interval mass chemotherapy in Okpo village, rural Burma. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 81:** 140-6, 1987.
13. KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; AMANO, K.; MURASE, T.; ARAKI, H.; KATO, Y.; KUMADA, Y.; KOYAMA, A.; HIGUCHI, M.; NAKAMURA, J.; TOMIDA, K.; MAKINO, S. – Intestinal parasitic infections among schoolchildren in Chiang Mai, northern Thailand: an analysis of the present situation. **J. Trop. Med. Hyg., 92:** 360-4, 1989.
14. KRAEMER, H.C. & BLOCH, D.A. – Kappa coefficient in epidemiology: an appraisal of a reappraisal. **Journal of Clinical Epidemiology, 41:**959-968, 1988.
15. LOCKWOOD, D.N.J. & WEBER, J.N. Parasite infections in AIDS. **Parasit. today, 5:** 310-315, 1989.
16. MC LURE, M. & WILLET, W.C. Misinterpretation and misuse of the Kappa statistic. **Am. J. Epidemiol., 126:** 161, 1987.
17. MOITINHO, M.L.R. & FERREIRA, C.S. - Sedimentation in parasitological coproscopy. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 34:** 255-258, 1992.
18. MOITINHO, M.L.R. & FERREIRA, C.S.- Avaliação de técnica de sedimentação em tubos. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 36:** 153-156, 1994.
19. PEREIRA, D.S. **Coproscopia parasitológica: análise de operações do método de Faust et al.** São Paulo (SP), 1984. 51p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Univ. de São Paulo].
20. SANTOS, F.M.C. - *Coproscopia parasitológica: técnicas de flutuação.* São Paulo, 1988. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Univ. de São Paulo).
21. SCHARF, J.-H. ; KLEINE, R. & ABESSER, H. Die Problematik der Photometereichkurve – statistisch gesehen. **Histochemie, 10:**154-192, 1967.

22. SCHULZ, S. & KROEGER, A. Soil contamination with *Ascaris lumbricoides* eggs as an indicator of environmental hygiene in urban areas of north-east Brazil. **J. Trop. Med. Hyg.**, **95**: 95-103, 1992.
23. SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. - **Biometry**. 2. ed. New York, Freeman, 1981
24. SPEELMAN, P. & LJUNGSTRÖM, I. Protozoal enteric infections among expatriates in Bangladesh. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **35**: 1140-5, 1986.
25. THOMPSON, R.C.A.; LYMBERG, A.J. & MELONI, B.P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. **Protozool. abstracts**, **14**: 1-28, 1990.
26. VARGAS-MENDEZ, L.D. *Prevalência de Giardia em cães de Maringá-PR-Brasil*. São Paulo, 1993. (Tese de Doutorado- Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).
27. VISVESVARA, G.S.; SMITH, P.D.; HEALY, G.R. & BROWN, W.R.- An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia*. **Ann. int. Med.**, **93**: 802-805, 1980.

TABELA 1

Prevalência de parasitas intestinais em 415 habitantes (sem seleção por idade ou sexo) de Candeias do Jamari (Rondônia, Brasil), 1990.

Parasita	Número de casos	Porcentagem
<i>Giardia</i>	55	13,2
<i>Entamoeba histolytica</i>	5	1,2
Ancylostomatidae	53	12,7
<i>Ascaris lumbricoides</i>	45	10,8
<i>Trichuris trichiura</i>	22	5,3
<i>Hymenolepis nana</i>	18	4,3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	7	1,7
<i>Hymenolepis diminuta</i>	3	0,7
<i>Enterobius vermicularis</i>	2	0,5

TABELA 2

Distribuição, por grupo etário, de positividade para *Giardia* e contagens de cistos por grama de fezes (CPG). Amostras de 415 habitantes (sem seleção por idade ou sexo) de Candeias do Jamari (Rondônia, Brasil), 1990.

Grupo etário		Amostras examinadas		Positividade para <i>Giardia</i>		
Anos		Número	Porcentagem	Numero	Porcentagem	CPG $\times 10^3$
0	— 1	9	2,2	1	11,1	1 055,0
1	— 5	70	16,9	11	15,7	1 531,1
5	— 9	72	17,4	18	25,0	1 649,4
9	— 13	52	12,5	7	13,5	6 951,6
13	— 20	51	12,3	8	15,7	1 387,9
20	— 30	54	13,0	5	9,3	621,3
30	— 40	49	11,8	3	6,1	584,2
	> 40	58	14,0	2	3,5	3 012,8
Total		415	100,0	55	13,2	2 149,8

TABELA 3

Prevalência de parasitas intestinais em 355 crianças (1 a 13 anos), pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil), 1993.

Parasita	Número de casos	Porcentagem
<i>Giardia</i>	41	11,5
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	0,6
<i>Ascaris lumbricoides</i>	25	7,0
<i>Trichuris trichiura</i>	12	3,4
<i>Hymenolepis nana</i>	3	0,8
Ancylostomatidae	1	0,3

TABELA 4

Distribuição, por grupo etário, de positividade para *Giardia* e contagens de cistos por grama de fezes (CPG). Amostras de 355 crianças (1 a 13 anos), pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil), 1993.

Grupo etário	Amostras examinadas		Positividade para <i>Giardia</i>		
	Anos	Número	Percentagem	Número	Percentagem
0 — 2	88	24,8	14	15,9	3 698,0
2 — 5	125	35,2	17	13,6	1 496,6
5 — 9	98	27,6	10	10,2	1 303,6
9 — 13	44	12,4	0	0,0	0,0
Total	355	100,0	41	11,5	2 201,2

TABELA 5

Comparação de resultados obtidos por meio do uso de centrífugo-flutuação e sedimentação por gravidade para a identificação de cistos de *Giardia* em amostras fecais de 355 crianças (1 a 13 anos), pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil),1993.

Centrífugo-flutuação	Sedimentação por gravidade		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	32	5	37
Negativa	4	314	318
Total	36	319	355

Comparação de resultados obtidos com o uso de centrífugo-flutuação e sedimentação por gravidade na identificação de cistos de protozoários e ovos de helmintos em amostras fecais de 355 crianças (1 a 13 anos), pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil), 1993.

Centrífugo-flutuação	Sedimentação por gravidade		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	58	13	71
Negativa	13	271	284
Total	71	284	355

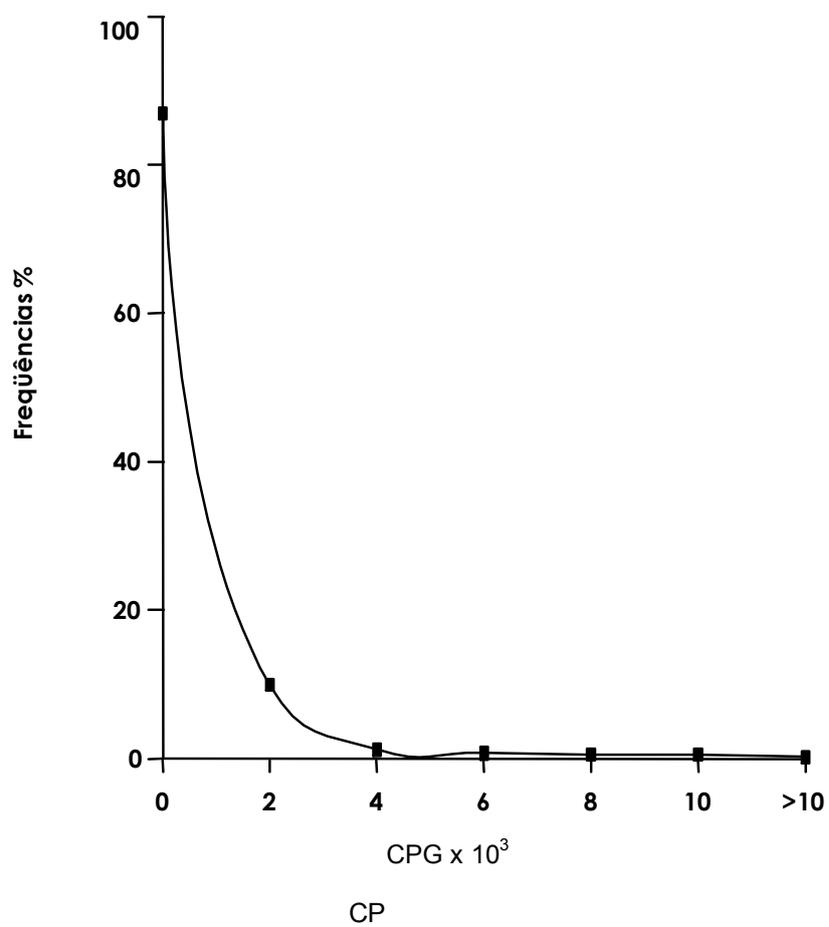


Figura 1 - Distribuição de frequências de contagens de cistos por grama de fezes (CPG). Habitantes de Candeias do Jamari, RO, Brasil, 1990.

Efeito do exercício físico associado ao consumo de álcool nos níveis lipídicos.

Effect of physical exercise associated to alcohol intake on lipidics levels

Macedo, J.A.P., Agostinho T.L., Alencar, N. N. M., Queiroz, M.G.R*.

***Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas-Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem- FFOE- Universidade Federal do Ceará**

Resumo

Efeito do exercício associado ao consumo de álcool nos níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticas foram investigados em 50 homens não sedentários consumindo álcool diariamente (estivadores) e 50 homens sedentários que não consumiam álcool (controle). Os estivadores apresentaram níveis de colesterol e colesterol HDL elevados quando comparado ao controle, mas a concentração de triglicerídeos se manteve no limiar apesar do álcool induzir hipertrigliceridemia. Os resultados sugerem que exercício além de agir de forma positiva elevando o colesterol HDL mantém os níveis de triglicerídeos dentro dos valores normais, reduzindo assim o risco de doenças cardiovasculares em alcoólatras.

Abstract:

Associations between physical exercise and alcohol intake on lipids and lipoproteins levels were examined in 50 no sedentary men daily (stevedores) and 50 sedentary men with no alcohol intake (control) . The levels of total and HDL cholesterol were higher in drinkers compared to non drinkers but the triglyceride were kept a normal levels although beverages show high concentration in this lipids. The results indicated that the exercise physical should cause positive effect on lipids and lipoproteins levels decreasing the risk of coronary heart disease (CHD) in alcoholatras.

KEYWORDS: LIPOPROTEINS; EXERCISE AND ALCOHOL

***Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da
Universidade Federal do Ceará.
e-mail:magorq@iq.usp.br Fax:(085)2439292**

Introdução

Vários estudos epidemiológicos demonstraram uma associação inversa entre o consumo de álcool e a incidência de doenças cardiovasculares (1,2,3). Trabalhos apresentando uma relação positiva entre o consumo de álcool e a concentração plasmática da lipoproteína de alta densidade (HDL) têm revelado que o aumento da HDL induzido pela ingestão moderada de álcool poderá desempenhar um possível efeito protetor nas doenças cardíacas (2).

Os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos são resultantes do equilíbrio dinâmico entre os aspectos anabólicos e catabólicos do metabolismo das lipoproteínas. A figura 1 apresenta o metabolismo normal das lipoproteínas: a dieta lipídica é absorvida no intestino delgado e incorporada aos quilomícrons, os quais são secretados pelos vasos linfáticos, alcançando a circulação via ducto torácico. Na circulação, triglicerídeos são gradualmente removidos destas partículas pela ação da lipase lipoproteica (LPL), originando assim os quilomícrons remanescentes, os quais são removidos posteriormente pelo fígado e utilizados na síntese das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Mais uma vez a lipase lipoproteica age catabolizando os triglicerídeos da VLDL para produzir lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), que quando delipidadas dão origem as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), responsáveis pela distribuição de colesterol aos tecidos. A captação de LDL através das células ocorre via receptor (B/E) e endocitose não específica. Concentrações elevadas de receptores de LDL são encontradas no fígado, responsável pela remoção de $\frac{3}{4}$ da LDL circulante (5). As partículas HDL derivam a partir do intestino e do fígado, atuam no transporte reverso de colesterol e agem esterificando o colesterol através da enzima colesterol-acil-transferase (LCAT).

Enquanto os níveis plasmáticos elevados de LDL estão relacionados com a incidência de arteriosclerose (6), o aumento de HDL mantém uma relação inversa com esta patologia (7). Enger e cols. (8) mostraram que o exercício físico prolongado poderá elevar os níveis de HDL e reduzir os triglicerídeos, sugerindo que este efeito resulte do aumento da atividade de LPL. Durante a hidrólise dos quilomícrons e VLDL, as apoproteínas e lipídios contidos nestas partículas são parcialmente transferidos para HDL. Taskinen e cols. (9) demonstraram que o uso moderado de álcool causa elevações na produção de VLDL, conduzindo a saturação de remoção dos triglicerídeos. Se a secreção de VLDL for prejudicada pelo consumo de álcool ou de doenças hepáticas resultará em hipertrigliceridemia.

Com base nos dados acima o presente trabalho investiga as alterações lipídicas nos indivíduos que consomem álcool com frequência e não abdicam das atividades físicas diárias devido a profissão que exercem, como os trabalhadores que auxiliam no transporte de mercadorias em mercados públicos (estivadores). O objetivo é avaliar o efeito do consumo de álcool associado ao exercício físico nos níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticas. Será que o exercício físico reduz os fatores de risco associados ao consumo de álcool diário?

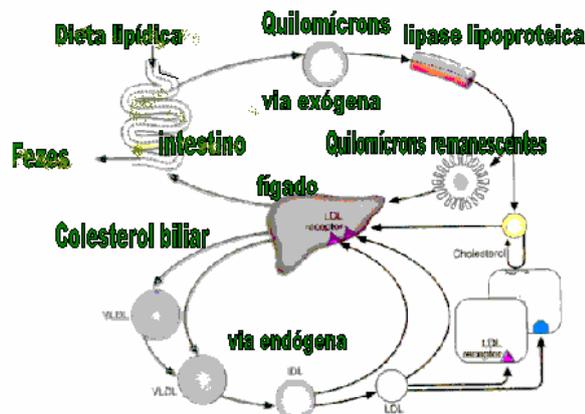


Figura 1: : Metabolismo das lipoproteínas (Gaw, A., Cowan, R., Reilly, D., Stewart, M. J., Shepherd, J., ed.1995 Clinical Biochemistry, Churchill Livingstone, New York.

Material e Métodos

Grupos

Grupo I-50 indivíduos do sexo masculino, saudáveis, sedentários de faixa etária de 30 a 40 anos e que não fazem uso de álcool.

Grupo II-50 estivadores na faixa etária de 30 a 40 anos, não sedentários, não diabéticos e que fazem uso diário de álcool.

Material biológico- Amostras séricas foram obtidas do sangue coletado através de punção venosa dos grupos em estudo, após 12 h de jejum e abstenção de álcool, para avaliação dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, VLDL, LDL e HDL.

Métodos Analíticos

Colesterol total e triglicerídeos foram determinados usando kits enzimáticos colorimétricos (LABTEST Diagnostica). As determinações de VLDL e LDL foram realizadas aplicando as equações propostas por Friedwald e cols. (10). Ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio foram utilizados na separação de HDL das demais lipoproteínas.

Análises Estatísticas

As médias foram calculadas \pm EPM dos valores séricos de lipídios e lipoproteínas. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através da análise de variâncias (ANOVA) e teste de Duncan para múltiplas comparações, $*p < 0,001$ foi utilizado para indicar significância estatística entre os grupos.

Resultados

O gráfico 1 (figura 2) mostra o perfil lipídico do grupo I (controle) e grupo II (estivadores). Os resultados demonstram uma diferença nos níveis séricos de lipídios e lipoproteínas entre os grupos em estudo. Os valores percentuais considerados desejáveis, limítrofes e elevados do grupo II estão representados no gráfico 2 (figura 3), indicando que 84% dos indivíduos apresentaram níveis limítrofe de colesterol total e 16% elevados com triglicérides dentro dos limites desejáveis. Quanto aos níveis de LDL, 72% apresentaram valores limítrofes, 10% elevados e 18% desejáveis. Todos os pacientes do referido grupo apresentaram concentrações desejáveis de HDL.

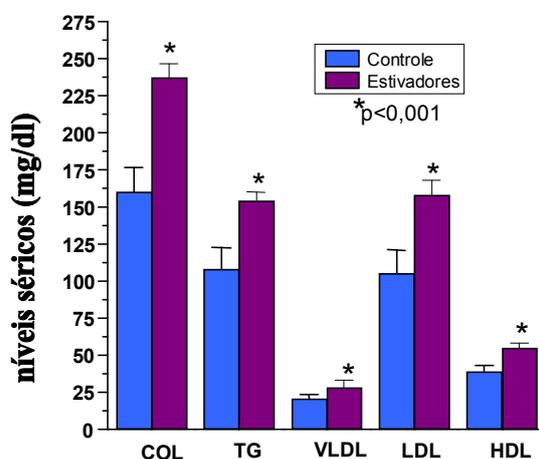


FIGURA 2. Perfil Lipídico. As barras representam a média \pm E.P.M. da concentração sérica de colesterol total (COL), triglicérides (TG), colesterol VLDL (VLDL), colesterol LDL (LDL) e colesterol HDL (HDL) dos grupos utilizados (n=50) * $p < 0,001$ indicam as diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo controle, ANOVA (teste de Duncan).

mg/dl	Desejável	Limítrofe	Anormal
Colesterol Total	< 200	200-250	>250
LDL*	<150	150-190	>190
HDL**	>38	35-38	<35
HDL/Col. total	>0,25	0,20-0,25	<0,20
Triglicérides	<189	180-220	>220

Tabela I : Interpretação dos níveis séricos de lipídios e lipoproteínas. Marshall, J.W. ed (1995) Clinical Chemistry Mosby. London

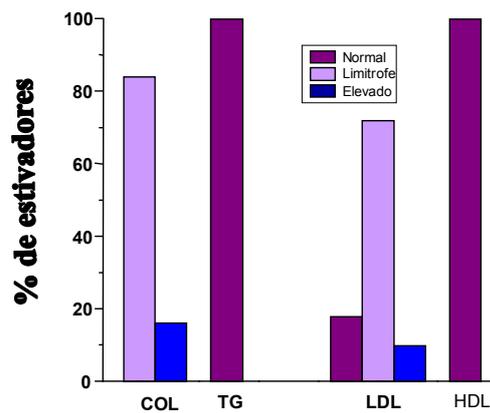


FIGURA 3. Interpretação dos níveis séricos de lipídios nos estivadores. As barras representam o percentual de estivadores que apresentaram níveis de lipídios e lipoproteínas: normais, limítrofes e elevados

Discussão:

Diferenças significativas na concentração sérica de lipídios e lipoproteínas dos estivadores quando comparadas ao controle são marcadas pela elevação dos níveis de colesterol total. Os valores estão acima do limítrofe, provando que o álcool afeta diretamente o metabolismo dos lipídios e lipoproteínas. Isto se deve ao fato de que no fígado o álcool é transformado em acetaldeído e Acetil Coenzima A, necessitando ambos os passos de um cofator NAD (Nicotina Adenina Dinucleotídeo), que é reduzida a NADH durante o processo. Como o NAD é o fator limitante na velocidade do catabolismo do álcool a conversão do NAD a NADH durante as duas fases de oxidação do etanol origina um desvio no equilíbrio de óxido-redução hepática causando irregularidades no metabolismo lipídico. A oxidação dos ácidos graxos livres que entram no fígado é diminuída nos indivíduos que consomem álcool devido a redução do NAD sofrida pelo metabolismo hepático do álcool e as conseqüências são acúmulo de ácidos graxos no fígado e o aumento de secreção de VLDL e LDL (11).

Apesar da elevação dos níveis de LDL, a concentração de HDL também aumentou, prevenindo o acúmulo de colesterol. Isto não significa que o álcool reduza os riscos de arteriosclerose, as apoproteínas B e E contidas na LDL e HDL, respectivamente, são responsáveis pela ligação das lipoproteínas aos receptores (12). Existe portanto, urgência que os métodos para determinar as apoproteínas se tornem mais acessíveis nos laboratórios de análises clínicas da rede pública, porque em muitos casos a determinação do colesterol total isoladamente não é suficiente para o diagnóstico. E mesmo quando associado às frações, deixa dúvidas.

Dentre as apoproteínas (AI e AII) contidas na HDL, somente a concentração de Apo AI é inversamente correlacionada com a arteriosclerose. Existem dados que mostram que enquanto a Apo AI oferece resistência à arteriosclerose, a apo AII contribui para aterogênese (13).

Associação positiva do colesterol HDL com álcool foi investigada anteriormente. Estudos clínicos experimentais indicam que o consumo moderado de álcool eleva os níveis de colesterol HDL e a retirada, reduz. Estudos têm demonstrado que a subfração HDL₂ está intimamente relacionada com o efeito protetor à doenças cardiovasculares (14), mas não está bem estabelecido que subfrações sejam mais afetadas pelo álcool. Sabe-se, porém, que o exercício eleva também esta subfração (15) o que nos leva a acreditar que os níveis séricos elevados de HDL do grupo em estudo não se deve somente ao consumo de álcool, mas ao modo de vida que levam. Exercendo a função de carregadores de mercadorias passam o dia em movimento e realizam caminhadas constantemente.

Valores normais de triglicerídeos encontrados no plasma dos indivíduos que fazem uso frequente de álcool reforça o efeito do exercício associado ao consumo de álcool. Trabalhos têm demonstrado que o exercício ativa a produção de lipase lipoproteica, o que ocasiona a quebra dos triglicerídeos acumulados devido a elevação de VLDL (16). Muitos fatores fisiológicos influenciam nos níveis de colesterol LDL e HDL (tab. 2).

O trabalho comprova que o sedentarismo constitui um fator de risco, mesmo em pessoas que não apresentam alterações na concentração sérica dos lipídios e lipoproteínas e reforça o efeito benéfico do exercício em situações patológicas como o alcoolismo.

Fatores que influenciam nas Lipoproteínas Plasmáticas

Variável	Colesterol HDL	Colesterol LDL	Triglicerídeos
Sexo	F>M	M =F	F<M
Idade	↑ no F	↑	↑
Exercício	↑	↓	↓
Obesidade	↓	Normal ou ↑	↑
Álcool	↑	Normal ou ↑	↑
Estrógenos	↑	↓	↑

Tabela 2. Influências fisiológicas externas nos lipídios e lipoproteínas plasmáticas
Marshall, J.W. ed (1995) Clinical Chemistry Mosby. London

Referências

- 1-Klatsky, A. L., Friedman, G.D. Sieglaub, (1974) A B. Ann Inter Med 81 294-298
- 2-Stason, W.B. Neff, R.K., Miettinen, O. S., Hershel, J (1976) Am J Epidemiol 104, 603-606
- 3-Barboriak, J. J., Rimm, A. A. Anderson, A. J., Schimidhoffer, M., Tristani, F.E., (1977) Br Heart J 39 289-302
- 4-Gordon, T., Doyle, J.T., (1986) Arch. Inter. Med 146 262-265
- 5-Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl,H., and Jurgens, G.,(1992) Free Rad. Biol. Med. 13, 341-390.
- 6-Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, M.D.(1989) N.Eng. J. Med 320 915-924
- 7-Miller, N. E., La Ville, A., Crook, D., (1985) Nature 314 109-111
- 8- Enger S.C., Stromme S.B., Refsum H.E., (1980) Scand J Clin Lab Invest Jun 40 341-345
- 9-Taskinem, M.R., Valmaki, M., Nikkila, E. A., (1992) Metabolism 31 1168-1173
- 10-Friedwald, W.T., Levy, R.J., Fredickson, D.S., (1972) Clin.Chem 18 499-509
- 11-Gruchow, H.W., Hoffman G. R., Anderson, J. A., Barboriak J. J., (1982) Atherosclerose 43 393-404
- 12- Chartteton J.E., Phillips.,M. Curtiss, L.K., Milne, R.W., Marcel, Y.L., Schumaker, V.N.(1991). J.Biol.Chem. 266, 595-596
- 13- Warden, C.H.,Hedrick, C.C., Qiao, J-H., Castellani, L.W., Lusic, A. J., (1993) Science 261, 469-472
- 14- Haskell, W.L., Camargo, C. Jr., Williams, P.T., Vranizan, M. K., Krauss, M. R., Lindgren, F.T., Wood, P.D., (1984) N. Eng. J. Med 310 805-810
- 15-Nye, E.R., Carlson, K., Kirstein, P., Rossner, S., (1981) Clin Chim Acta 113 51-57
- 16- Jaillard, J., Sezille, G., Scherrereel, P., Fruchart, J.C., (1971) Nutr Metab 13 114-127

**INCIDÊNCIA DE PARASIToses EM ESCOLARES DA ESCOLA
MUNICIPAL DE EDUCAÇÃO INFANTIL “SANT’ANA ITATIAIA - JUIZ DE
FORA - MG E SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO COM A QUALIDADE DA
ÁGUA UTILIZADA PARA CONSUMO***

**PARASIToses INCIDENCE IN CHILDREN FROM EMEI
“SANT’ANA ITATIAIA”, JUIZ DE FORA - MG, BRAZIL AND
POSSIBLE RELATIONSHIP WITH THE PRESENCE OF THE
PARASITES AND THE SOURCE OF THE WATER**

**ALVES, M.S.¹; VILELA, M.A.P.¹; BARBOSA, N.R.¹; ALVES, R.M.S.²;
REZENDE, M.C.²**

RESUMO

São apresentados os resultados de 23 exames parasitológicos de fezes coletadas com conservador MIF e analisadas pelo método preconizado por Hoffman, Pons & Janer⁽⁰⁸⁾ no Laboratório de Saúde Pública/FFB/UFJF e, de 09 análises bacteriológicas da água consumida na residência de 07 escolares da EMEI “ Sant’Ana Itatiaia” - Juiz de Fora - MG, segundo a metodologia empregada no Laboratório de Análise de Alimentos e Saneamento de Águas/FFB/UFJF. O estudo foi desenvolvido nos meses de Agosto a Outubro de 1994 em escolares com idade entre 04 e 06 anos e de ambos os sexos. A percentagem das amostras de fezes positivas foi de 56,52% e de negativas de 43,48%. A etiologia das enteroparasitoses de maior incidência na população estudada foi: *Entamoeba coli* (38,89%), *Ascaris lumbricoides* (27,78%), *Trichuris trichiura* (11,11%), *Giardia lamblia* (11,11%) e *Entamoeba histolytica* (11,11%). Das amostras analisadas, 17, 39% revelaram a presença de mais de um parasita. Apesar de não ter sido possível correlacionar a etiologia das enteroparasitoses com uma provável veiculação hídrica das mesmas, verificou-se que 61,11% das amostras de fezes examinadas revelaram a presença de protozoários e, ainda, que 60% das amostras de água oriundas de outras fontes que não o abastecimento público, foram consideradas impróprias para o consumo como bebida. Tais dados reforçam a necessidade de medidas administrativas eficientes para a implantação e melhoria do saneamento básico, pois não existe saúde sem infraestrutura sanitária.

Unitermos: parasitoses, escolares, veiculação hídrica.

SUMMARY

More are shown the results of 23 parasitologic assays of fecal samples collected with MIF analyzed in the Public Health Laboratory/FFB/UFJF with methodology by Hoffman, Pons & Janer⁽⁰⁸⁾ and 09 bacteriological assays of the water used in the house of 07 students of EMEI “Sant’Ana Itatiaia”, Juiz de Fora - MG, Brazil with methods used in the Food and Water Control Laboratory/FFB/UFJF. These studies were developed during August/October, 1994 with students of both sex with ages from 04 to 06 years. About 56,52% of the fecal samples were positive and the other 43,48% negative. The kinds of parasites that was most commonly find was: *Entamoeba coli* (38,89%), *Ascaris lumbricoides* (27,78%), *Trichuris trichiura* (11,11%), *Giardia lamblia* (11,11%) e *Entamoeba histolytica* (11,11%). There was

found more than one parasites in 17,39% of all the samples. Although it was not possible to relate the presence of the parasites with the source of the water, 61,11% of the fecal samples assays were positive for protozoans and 60% of the water samples collected from different sources than that of the public services, were taken as improperly to be used as drink. Such results show the needs of the use of a good sanitary program, because there is no health without basic sanitary structure.

Key words: parasitoses, school children, source of water.

INTRODUÇÃO

As parasitoses, apesar de todo avanço científico e tecnológico atual, ainda implicam em importante objeto de estudo, principalmente nos países em vias de desenvolvimento, nos quais, até hoje, são observadas precárias condições higiênico-sanitárias e baixa qualidade de vida da população.

Das doenças diagnosticadas em crianças na faixa etária compreendida entre 01 e 04 anos de idade, 24,7% foram enfermidades infecciosas e parasitárias⁽¹³⁾. A situação torna-se mais preocupante, quando consideramos crianças em idade escolar, visto que parasitoses intestinais como a tricuriase, podem diminuir as funções cognitivas de escolares⁽¹¹⁾.

A Organização Mundial da Saúde concluiu que as infecções parasitárias aumentarão, se não forem adotadas medidas efetivas para o controle das mesmas, priorizando a Saúde Pública. No futuro, aproximadamente a metade da população dos países em desenvolvimento tenderá a viver em zonas urbanas e, provavelmente, em habitações precárias e de má qualidade; favorecendo a transmissão de várias doenças, entre elas, as parasitoses⁽¹¹⁾.

Pesquisas realizadas na América Latina, África e Ásia demonstraram que a amebíase, ancilostomíase, ascaridíase e a giardíase encontravam-se entre as vinte infecções mais fatais e com elevada taxa de morbidade⁽⁰¹⁾. Superpopulação; padrões alimentares precários; baixas condições sócio-econômicas, aliadas a mínimas condições de saneamento básico, moradia e higiene foram os principais fatores responsáveis por essa situação⁽⁰⁷⁾.

ROCHA et alii(1994) constataram que a existência de água tratada em algumas casas contribuiu para que a prevalência de protozoários intestinais fosse inferior a dos helmintos, uma vez que os primeiros são facilmente veiculados pela água. Entretanto, a precariedade das fontes de abastecimento de água, que muitas vezes ficam a céu aberto, cria condições propícias à transmissão dos protozoários intestinais, mantendo-os, ainda, em elevada prevalência. FILHO et alii(1994) relataram uma maior prevalência de *Giardia lamblia* em crianças, evidenciando baixas condições de saneamento básico do meio em que habitavam, demonstrando contaminação fecal da água e dos alimentos que abasteciam a população.

A Universidade, através de professores e alunos envolvidos em projetos de extensão, é o elemento indicado para a divulgação dos conhecimentos básicos de educação comunitária⁽⁰²⁾⁽⁰⁷⁾. A participação da comunidade nesse tipo de trabalho é essencial tanto para aprender noções básicas de profilaxia de parasitoses intestinais e higiene ambiental, quanto para contribuir na coleta do material biológico e no fornecimento de informações.

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo verificar a incidência de parasitoses intestinais em escolares e a possibilidade da ocorrência de veiculação hídrica de alguns parasitas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Escola Municipal de Educação Infantil “Sant’Ana Itatiaia” situada no Campus Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG, no período de Agosto a Outubro de 1994.

Foram selecionadas, aleatoriamente, duas turmas das oito existentes na escola, perfazendo um total de 23 crianças, de ambos os sexos e na faixa etária de 04 a 06 anos.

O material biológico foi coletado pela família em recipientes próprios, contendo o conservador MIF, na proporção de uma parte de fezes para duas de conservador e enviado ao Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Farmácia e Bioquímica/UFJF, onde os exames parasitológicos foram realizados, empregando-se o método preconizado por Hoffman, Pons & Janer⁽⁰⁸⁾.

Nove amostras da água consumida na residência de 07 escolares, cujos exames parasitológicos revelaram presença de parasita(s), foram submetidas à análise bacteriológica, segundo a metodologia empregada no Laboratório de Análise de Alimentos e Saneamento de Águas da Faculdade de Farmácia e - Bioquímica/UFJF.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção de um maior número de amostras de fezes e água não foi possível devido às dificuldades impostas pelos familiares, o que também foi verificado por DE CARLI(1994)⁽⁰³⁾ e GURVITZ et alii (1993) (Tabela I).

Conforme mostram a Tabela II e o Gráfico 1, a percentagem das amostras de fezes positivas foi de 56,52% e a de negativas de 43,48%. A etiologia das enteroparasitoses de maior incidência na população estudada com seu respectivo valor percentual foi: *Entamoeba coli* (38,89%), *Ascaris lumbricoides* (27,78%), *Trichuris trichiura* (11,11%), *Giardia lamblia* (11,11%) e *Entamoeba histolytica* (11,11%) (Tabela III). Das amostras analisadas, 17, 39% revelaram a presença de mais de um parasita (Gráfico 2). Os resultados apresentados foram concordantes com os já descritos na literatura⁽⁰³⁾⁽⁰⁴⁾⁽¹⁰⁾⁽¹²⁾.

Uma maior percentagem de exames positivos foi encontrada no sexo masculino(39,13%) que no feminino (17,39%). Este percentual, provavelmente, sofreu influência da amostragem, visto que as turmas investigadas eram compostas por um maior número de meninos (Tabelas I e II).

Com relação aos resultados obtidos a partir das análises bacteriológicas da água consumida nas residências dos escolares (Tabela IV), não foi possível correlacionar a etiologia das enteroparasitoses com a provável veiculação hídrica das mesmas, ainda que a *Entamoeba coli* tenha sido evidenciada em 38,89% das amostras de fezes examinadas. Contudo, verificou-se que 100% das amostras de água obtidas do abastecimento público mostraram qualidade sanitária segura, enquanto 60% daquelas procedentes de outras fontes apresentaram-se impróprias para o consumo como bebida⁽⁰⁹⁾. Assim sendo, tais dados reforçam a necessidade de medidas administrativas eficientes para a implantação e melhoria do saneamento básico, pois não existe saúde sem infra-estrutura sanitária⁽¹⁰⁾.

TABELA I- IDENTIFICAÇÃO DOS ESCOLARES PARTICIPANTES DO ESTUDO E RESULTADO DOS EXAMES PARASITOLÓGICOS

Período	Aluno	Sexo*	Parasita(s) encontrado(s)
2°	AP	M	<i>G. lamblia</i>
	CHES	M	<i>A. lumbricoides</i>
	ES	F	nd
	FSL	M	<i>E. coli</i>
	LZC	M	nd
	MVB	M	nd
	RCL	F	<i>A. lumbricoides</i>
	RCS	F	nd
	RWPA	M	<i>E. coli</i>
	SAS	F	<i>G. lamblia</i>
	TCRS	F	<i>A. lumbricoides</i>
	VAMM	F	nd
	WMSJ	M	nd
3°	DRC	M	<i>T. trichiura</i>
	DCS	M	<i>E. coli</i>
	EFP	M	nd
	EA	M	<i>A. lumbricoides</i> <i>E. coli</i> <i>E. histolytica</i>
	JCRS	M	<i>E. coli</i> <i>E. histolytica</i>
	LDACP	M	nd
	MMOS	M	<i>A. lumbricoides</i> <i>E. coli</i>
	RMS	F	<i>E. coli</i> <i>E. histolytica</i>
	TSF	M	nd
	LCS	F	nd

*M = masculino, F = feminino

nd = não detectado

TABELA II - DISTRIBUIÇÃO DE EXAMES PARASITOLÓGICOS REALIZADOS EM 23 ESCOLARES, SEGUNDO O SEXO - JUIZ DE FORA - MG

RESULTADO	SEXO				TOTAL	
	Masculino		Feminino			
	N°	%	N°	%	N°	%

POSITIVO	09	39,13	04	17,39	13	56,52
NEGATIVO	06	26,09	04	17,39	10	43,48

TABELA III - FREQUÊNCIA DE HELMINTOS E PROTOZOÁRIOS NOS EXAMES PARASITOLÓGICOS POSITIVOS NA POPULAÇÃO DE ESCOLARES AVALIADOS - JUIZ DE FORA - M.G.

ESPÉCIE	TOTAL	
	Nº	%
<i>A. lumbricoides</i>	05	27,78
<i>T. trichiura</i>	02	11,11
<i>G. lamblia</i>	02	11,11
<i>E. histolytica</i>	02	11,11
<i>E. coli</i>	07	38,89

* 17,39% das amostras contêm mais de um parasita

TABELA IV - RESULTADOS DAS ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS DA ÁGUA CONSUMIDA NAS RESIDÊNCIAS DOS ESCOLARES, CUJOS EXAMES PARASITOLÓGICOS REVELARAM PRESENÇA DE PARASITA (S)

AMOSTRAS EXAMINADAS	ORIGEM DA ÁGUA CONSUMIDA	RESULTADOS	
		PCA (UFC/mL)	MC (UFC/100mL)
01-CHES	abastecimento público/poço	ausente/>300	ausente/55
02-FSL	abastecimento público	ausente	ausente
03-RWPA	filtro de barro	>300	>300
04-SAS	baldes	13	01
05-EA	filtro de barro	115	ausente
06-DRC	abastecimento público	46	ausente
07-TCRS	filtro/poço	>300/58	ausente/ausente

UFC = Unidade Formadora de Colônia

PCA = Plate Count Agar

MC = MacConkey

*Valores de referência⁽⁰⁹⁾: PCA: aceitável até 300 UFC/mL e MC: ausente/100mL

CONCLUSÃO

A partir do presente trabalho, os pesquisadores introduziram novos mecanismos de motivação à participação dos familiares e da direção da escola, bem como dos professores, visando maior êxito, principalmente, na obtenção de amostras e de informações.

A elevada incidência de enteroparasitoses está de acordo com os dados obtidos por outros autores, em diferentes regiões do Brasil⁽⁰³⁾⁽⁰⁴⁾⁽¹⁰⁾⁽¹²⁾.

Apesar de não ter sido possível correlacionar a etiologia das enteroparasitoses com a provável veiculação hídrica das mesmas, verificou-se que 61,11% das amostras de fezes examinadas revelaram a presença de protozoários e, ainda, que 60% das amostras de água oriundas de outras fontes que não o abastecimento público, foram consideradas impróprias para o consumo como bebida; reafirmando que não se deve apenas tratar uma criança com parasitoses intestinais, mas principalmente tratar o esgoto que a adoece e a água contaminada que ela bebe.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Extensão/Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Extensão/UFJF pela concessão das bolsas e à direção e professores da EMEI “Sant’ Ana Itatiaia” pelo apoio na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 DAVIS, A. *A Saúde do mundo*, 2-3, 1984.
- 02 DE CARLI, G. et alii Extensão Comunitária - Estudo de enteroparasitoses e das condições sócio-econômicas das vilas periféricas de Porto Alegre, RS, Brasil, durante o período de 1965 a 1981. *Cad. Far.*, 5:73-92, 1989.
- 03 DE CARLI, G.A. Prevalência de parasitas intestinais entre crianças de escolas nas vilas marginais de Porto Alegre, RS. *Rev. Bras. Farm.*, 75(1): 8-9, 1994.
- 04 DE CARLI, G.A. et alii Incidência de enteroparasitas entre colonos sem terra nos assentamentos de Charqueadas e Capela de Santana no Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 26(4): 123-5, 1994.
- 05 FILHO, M.C.; FERREIRA, R.F. & GARCIA, C.E. Incidência de enteroparasitas em crianças de Joinville - SC. *JBM*, 67(3):167-70, 1994.
- 06 GURVITZ, R.; MAIA, M.G.; GASTAL, F.L. & BRECHAME, R.B. Extensão universitária: o controle das helmintíases intestinais em uma

- população periférica da cidade de Pelotas. *VI Congresso da Federación Latinoamericana de Parasitologia e VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia*, São Paulo, 1993.
- 07 HUGGINS, D. Incidência de parasitoses intestinais em crianças de 0 a 5 anos de idade. *Ped. Mod.*, 21(1):19-27, 1986.
- 08 NETO, V.A. & CORREA, L.L. *Exame parasitológico das fezes*. 4ª ed., São Paulo, Ed. Sarvier, pág. 58-60.1980.
- 09 PEREIRA, J.F. *Saneamento de Águas*, Juiz de Fora, 1985.
- 10 ROCHA, M.O.; COSTA, C.A.; MELLO, R.T. & MOREIRA, M.C.C.G. Estudo comparativo da prevalência de parasitoses intestinais em escolares de Belo Horizonte, MG. *Rev..Bras. Anal. Clin* , 26(4):127-9, 1994.
- 11 UNICEF. Diretrizes para utilização racional de medicamentos nos serviços básicos de saúde. *A Prescrição*, nº 6:1-7, 1993.
- 12 VIEIRA, L.M.; NICOLATO, R.L.C. & JULIÁ, M.S.F. Prevalência de parasitas intestinais na população de Ouro Preto, MG, Brasil. *RBAC*, 27(3):99-101, 1995.
- 13 World Health Organization(WHO) *Las condiciones de salud en las Americas*, volume II, pág. 87-100, 1994.

* Universidade Federal de Juiz de Fora

1 Professoras do Departamento de Bromatologia, Toxicologia e Controle
Faculdade de Farmácia e Bioquímica

2 Bolsistas de Extensão - PROACE

Levantamento das características metodológicas em citologia

cérvico- vaginal no Estado de Santa Catarina

*Haas,P,** Comeli,O,** Marcon,S,** Müller, K.

Abstract: Making use of questionnaires sent to Clinical Analyses and Pathology laboratories in the state of Santa Catarina, the characteristics of such laboratories were evaluated covering material conditioning, sample-gatheringsites, and coloration employed. It was found 68,75% of the laboratories offered external services; as to material conditioning, 43,75% give preference to 95% alcohol; the most often used sites of collection are the bottom of the saccus vagina'lis and the junction squamocolumnar; regarding coloration, 56,25% used Papanicolaou, and no classification was seen to exist as a preference, but rather an association was observed, that is, the labs opted for a combination of ICN, Papanicolaou, Bethesda System, WHO, or just ICN.

Resumo: através de questionários enviados para laboratórios de Análises Clínicas e Patologia do Estado de Santa Catarina, avaliou-se as características dos laboratórios, acondicionamento do material, local de obtenção de amostras e coloração utilizada. Constatamos que 68,75% dos laboratórios prestam serviços externos; em relação ao acondicionamento do material, 43,75% preferem álcool 95%; para a realização da coleta os locais mais utilizados são o fundo de saco vaginal e junção escamo colunar; sobre a coloração, 56,25% utilizam Papanicolaou; e para a classificação, observamos que não existe uma preferência, mas sim, uma associação, ou seja, os laboratórios optam por um misto de NIC, Papanicolaou, Sistema Bethesda, OMS ou apenas NIC.

Universidade Federal de Santa Catarina/ Departamento de Análises Clínicas

*Professora Citologia Clínica ** Acadêmicas do Curso Farmácia -

Análises Clínicas

INTRODUÇÃO:

Papanicolaou em 1917, propôs o uso sistemático do esfregaço vaginal, desenvolveu o ciclo sexual em mulheres, revelado pelo esfregaço vaginal em 1923, e em 1928, referiu o uso do esfregaço para diagnóstico do câncer (8). O câncer constitui um problema de saúde pública. O prognóstico de um paciente com câncer, além das condições inerentes ao próprio hospedeiro, depende fundamentalmente do diagnóstico precoce, planejamento terapêutico correto (14). Câncer de colo de útero, apesar de apresentar decréscimo na sua mortalidade nos últimos anos, ainda aparece com cifras elevadas. É uma doença grave, podendo ser detectada nos seus estágios iniciais através da adoção de programas de rastreamento com cobertura populacional adequada, sendo que em nosso meio, detectamos um predomínio das formas avançadas da doença, em função da ausência destes programas. É pouco freqüente em mulheres com menos de 25 anos de idade, sofrendo um declínio acentuado, após 60 anos, com uma predominância de incidência concentrando-se entre os 40 e 50 anos de vida, e origina-se em 95% das vezes na junção escamo colunar. Segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina, a mortalidade por tipo de câncer em pacientes do sexo feminino em Santa Catarina no ano de 1996, foi representado em primeiro lugar com o câncer de mama no total de 12,43%; seguido do câncer de estômago com 9,34%; em terceiro lugar traquéia, brônquios e pulmão com 8,63%; e em quarto lugar o câncer de colo de útero, representando 6,12% das 1.553 pacientes levadas a óbito. Em 1994 e 1995, o câncer de colo de útero também ocupou o quarto lugar no Estado de Santa Catarina. A realização desta pesquisa foi impulsionada, por ser a citologia cérvico-vaginal, considerada de suma importância para o diagnóstico precoce do câncer de colo útero. Portanto, objetivou-se principalmente, coletar dados sobre as características das técnicas aplicadas no Estado de Santa Catarina em relação especificamente, ao exame citológico de colo de útero. Avaliar se a rede pública é mais procurada

para a realização deste exame, comparando com a rede privada de atendimento. Verificar dos locais de coleta de material, se apropriados ou não, objetivando uma coleta correta, com fins de um resultado preciso. Saber qual a coloração preferencialmente utilizada pelos laboratórios deste Estado, bem como o método de conservação destas lâminas. Obter informações sobre a classificação empregada atualmente pelos laboratórios.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Trata este trabalho de uma avaliação metodológica em laboratórios de Análises Clínicas e Patologia no desenvolvimento do exame de prevenção de câncer de colo uterino. Esta avaliação foi realizada através de um questionário enviado para os diversos laboratórios do Estado de Santa Catarina, divididos em regiões (norte, sul, oeste, extremo oeste e grande Florianópolis), analisando a natureza destes laboratórios, se públicos ou privados; material utilizado para a fixação do material; locais de coleta; coloração da lâmina e classificação utilizada. Verificou-se a revisão bibliográfica para averiguar se os procedimentos adotados

pelos laboratórios correspondem aos descritos na literatura. Foram enviados um total de 70 (setenta) questionários para os referidos laboratórios, sendo que retornaram um total de 16 (dezesseis) e destes, 03 (três) referentes a laboratórios que não realizam esta rotina. O período utilizado para a coleta destes dados, foi de 05 de março de 1997 à 11 de agosto de 1997. A cópia do questionário, encontra-se em anexo.

RESULTADOS :

Dos 16 questionários recebidos, três não executam esta rotina. Conforme questionário analisado, verificamos que 68,75% dos laboratórios prestam serviços externos; 6,25% dos laboratórios são hospitalares e os mesmos 6,25% prestam serviços em instituições; 18,75% não realizam esta rotina. Em relação ao acondicionamento do material (fixação do esfregaço), a maior parte, 43,75% utilizam álcool a 95%; seguido

de 12,50% que usam carbovax(polietileno glicol); 6,25% preferem álcool 95% e éter; 6,25% álcool 955 e citospray (propinil glicol); 6,25% álcool 955 e carbovax; 6,25% citospray; sendo que 18,75% não realizam esta rotina.No item obtenção de material, objetivando-se saber o local de coleta, encontramos 43,75% que optam por fundo de saco vaginal e junção escamo colunar; 18,755 fundo de saco vaginal, junção escamo colunar e parede vaginal para avaliação hormonal; 12,50% fundo de saco vaginal, parede vaginal e junção escamo colunar; 6,25% coletam apenas da junção escamo colunar e 18,75% não realizam esta rotina.Para verificar qual a coloração de lâminas usadas, a coloração de Papanicolaou apresentou-se com 56,25%; Papanicolaou e Shorr para avaliação hormonal com 12,50%; apenas Shorr 6,25%; Shorr e Papanicolaou 6,25%; 18,75% não realizam rotina.Finalizando o questionário,

procurou-se saber a classificação utilizada, e constatou-se que não existe uma preferência, ou seja, a maioria dos laboratórios adotam várias classificações fazendo um misto desta. As classificações Histopatológica, Neoplasia Intraepitelial cervical (NIC), Papanicolaou, Sistema Bethesda e a da Organização Mundial da Saúde (OMS) são usadas em 12,5%; NIC e Sistema Bethesda em 12,50%; somente NIC em 12,50%; Sistema Bethesda 6,25%; NIC e Papanicolaou em 6,25%; NIC, Sistema Bethesda e OMS em 6,25%; NIC, Papanicolaou e Sistema Bethesda em 12,50%; não realizam rotina 18,75%. DISCUSSÃO:

O exame citopatológico é sem dúvida de suma relevância como método de avaliação ginecológica da paciente, permitindo a identificação de moléstias de grande importância na oncologia e na microbiologia. A integração com demais parâmetros é absolutamente fundamental e, quando houver discrepância entre os achados colposcópicos, citopatológicos e histopatológicos é imperiosa a reavaliação detalhada das condições de coleta e de interpretação de cada um destes exames para o máximo benefício do paciente. O ideal seria que a população não procurasse os serviços de saúde apenas quando há manifestação

da doença, mas periodicamente como profilaxia, evitando assim um avanço do quadro patológico.

Para a obtenção da amostra, segundo Writgt,1993, a coleta é extremamente importante para um diagnóstico mais fidedigno. O local ideal para se fazer uma coleta adequada, também torna-se um fator a ser observado. No item, obtenção de material, verificamos que a coleta no fundo do saco vaginal e junção escamo colunar, apresenta-se como mais utilizada até o presente momento e as células da parede vaginal, são obtidas para avaliação hormonal, juntamente com os locais já citados, no entanto, seria muito importante se todos coletassem do fundo de saco vaginal, junção escamo colunar e parede vaginal, pois assim teríamos uma coleta abrangente, a qual favoreceria melhor o diagnóstico.

Após a coleta correta da amostra, esta deve ser acondicionada, ou seja, fixada para uma posterior coloração, a fim de evitar o ressecamento deste material. Conforme cita De Luca,1991, o álcool 95% pode ser utilizado, dado que confirma o questionamento sobre o acondicionamento, já que 43,75% dos laboratórios utilizam este método, acreditamos que a escolha do álcool 95%, deve-se ao custo menor e pela praticidade de uso.

Considerando os resultados analisados dos questionários, observamos que a coloração de Papanicolaou é mais utilizada, totalizando 56,25% dos laboratórios, dado este compatível com a literatura, lembrando sempre, que é necessário tomar certos cuidados com os corantes, como cita De Luca,1991, filtrando-os periodicamente antes do uso dos mesmos. A coloração de Shorr também é citada na literatura, como outra opção, e nos laboratórios analisados, somente 6,25% fazem uso desta. Quanto à coloração de Papanicolaou, provavelmente é mais utilizada, porque apresenta um grau de nitidez eficaz.

Analisando a literatura, Rains, 1995 e Meinyre - Seltmann, 1995, afirmam que a classificação mais utilizada é a Papanicolaou, e acrescentam que a mesma, apresenta vantagens e desvantagens. No entanto, o que verificamos é que esta classificação não é utilizada na íntegra, ou seja, tem-se tomado como prática fazer um misto de classificações, que incluem a Neoplasia Intraepitelial

Cervical (NIC), o Sistema Bethesda (de 1988), e ainda a classificação da Organização Mundial da Saúde (de 1973). A nomenclatura oficial em vigor no Brasil, segue as recomendações da OPS/OMS de 1985, proposta por Richart, onde a principal característica é a melhor compreensão das lesões intra epiteliais. Em Santa Catarina, 12,50% dos laboratórios analisados, utilizam apenas esta classificação para a emissão dos laudos citopatológicos.

Ainda é importante considerar neste item, a contribuição do Sistema Bethesda, que apresenta melhores relatos e informações para os clínicos, o que poderia justificar o seu significativo uso, na emissão de laudos.

Muitos laboratórios tem utilizado termos discretivos como modificações à classificação de Papanicolaou ou no lugar de classes numéricas. Embora estas descrições objetivam aumentar a qualidade de informação, não estão padronizadas, tornando-se difícil a comparação dos resultados de laboratórios diferentes.(Meinyre - Seltmann, 1995).

Outro fator importante desta análise, diz respeito às características dos laboratórios que prestam este tipo de serviço. A grande maioria, 68,75% dos exames emitidos são feitos por laboratórios externos, se compararmos com 6,25% dos serviços prestados por laboratórios hospitalares e o mesmo para laboratórios de instituições. Questionando este fator, soubemos que em Florianópolis os laboratórios de instituições e hospitalares, utilizam serviços de laboratórios externos para esta análise, já que não realizam esta rotina.

CONCLUSÃO:

Observamos que os laboratórios que responderam ao questionário não seguem uma norma em comum, e que os laudos podem chegar aos pacientes e clínicos de maneira variada, isto devido a não existir uma única classificação adotada. Em relação á coleta de material, comparando com a literatura, verificamos que sua maioria está sendo feita de modo adequado, acontecendo o mesmo para a coloração e acondicionamento das amostras.

No entanto, percebemos que os laboratórios hospitalares e de instituições, ainda apresentam índices pequenos para a realização desta rotina de serviços, em relação aos laboratórios externos, o que de certa forma acaba limitando o acesso ao exame do preventivo de câncer de colo de útero para a população de baixa renda, podendo assim contribuir para o número de casos positivos alcançar os patamares atuais.

Assim sendo, consideramos atingidos os objetivos da realização de levantamento de dados no Estado de Santa Catarina, avaliando os mesmos com os dados da literatura, já que na sua grande maioria apresentam-se coerentes.

Utilização da Reação em Cadeia da Polimerase no Diagnóstico Precoce da Infecção pelo HIV em Crianças Nascidas de Mães Soropositivas*

The use of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the early diagnosis of HIV infection in infants born to seropositive mothers

Luciane Failace¹, Marisa Chesky², Mauricio Pagnussat¹ & Luiz Fernando Jobim³

Resumo

O diagnóstico da infecção pelo HIV é feito através de testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos específicos contra o HIV. Em crianças com menos de 24 meses esses testes não são conclusivos devido a transferência passiva de anticorpos IgG anti-HIV das mães infectadas para seus recém-nascidos, positivando todas as reações sorológicas.

A transmissão vertical do HIV ocorre em 15 a 50% dessas crianças, sendo importante diferenciar precocemente as infectadas das não infectadas para oferecer tratamento e profilaxia adequados.

O desenvolvimento de técnicas que detectam a presença do vírus, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem permitido essa diferenciação.

Desde 1994 temos realizado o teste PCR-HIV-DNA qualitativo em filhos de mães HIV soropositivas. Foram testadas um total de 205 pacientes, sendo que, em 149 foi possível definir o estado de infecção pelo HIV independente do resultado da PCR.

Nas 43 crianças consideradas infectadas a PCR foi positiva em 40 (sensibilidade de 93,3%). Todas as 106 crianças não infectadas apresentaram PCR negativo (especificidade de 100%). O valor preditivo positivo encontrado foi de 100% e o valor preditivo negativo de 97,2%.

Observamos também, que crianças nascidas de mães HIV positivas tratadas com AZT na gestação e trabalho de parto apresentaram nítida diminuição nos índices de

*Trabalho realizado na Unidade de Imunologia - Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

¹Médicos Residentes de Imunologia Clínica do HCPA

²Farmacêutica-Bioquímica da Unidade de Imunologia do HCPA

³Professor do Departamento de Medicina Interna da UFRGS, chefe da Unidade de Imunologia do HCPA

infectividade (9,4%) em relação aos filhos de mães não tratadas (33,7%).
PALAVRAS CHAVE - PCR, HIV, crianças nascidas de mães soropositivas

Summary

The diagnosis of infection by HIV is done using serological assays that detect specific antibodies against HIV. In children, below 24 months, these tests are not conclusive because there is a passive transference of anti-HIV IgG antibody from mother to newborn, so all of the serological tests will be positives.

The vertical transmission of HIV happens in 15 - 30% of these children. It is important to differentiate, as soon as possible, the infected from the uninfected infants.

The development of techniques that detect the virus DNA, like PCR, became possible this differentiation.

Since 1994 we had used the HIV-DNA-PCR qualitative test in children born to HIV seropositive mothers. In 149 of 205 patients was possible to define clinically the HIV infection without PCR results.

In 43 children considered infected by HIV the PCR was positive in 40 cases (sensitivity = 93,3%). All of 106 uninfected children presented a negative PCR (specificity = 100%). The positive predictive value was 100% and the negative predictive value was 97,2%.

We also concluded that infants born to HIV positive mothers treated with AZT during pregnancy and delivery presented decreasing in infectivity (9,4%) when compared with children from mothers that did not receive treatment (33,7%).

KEY WORDS - PCR, HIV, children born to seropositive mothers

Introdução

Em 1981, a partir de notificações feitas ao Center for Diseases Control (CDC) foram descritos em homossexuais masculinos os primeiros casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).¹ No ano seguinte foi descrito o primeiro caso pediátrico de infecção pelo HIV.²

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), onze milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV no mundo, das quais, três milhões são mulheres em idade reprodutiva.^{3,4} As crianças nascidas dessas mulheres são consideradas sob risco

até que se possa demonstrar que estão infectadas, o que ocorre em 15 a 50% dos casos.^{5,6}

Atualmente a OMS estima que existam no mundo cerca de 500.000 a 1.000.000 de crianças infectadas. Para o ano 2.000 a previsão é de 2.700.000 crianças nesta situação.⁵ A transmissão vertical que pode acontecer intra-útero, peri-parto e com o aleitamento materno é a via de contágio em 85 a 90% dos pacientes pediátricos.⁵⁻⁸ O uso de zidovudine (AZT) durante a gestação, trabalho de parto e nas 6 semanas seguintes ao nascimento reduzem este risco para 8 a 10%.⁹

O diagnóstico e o tratamento precoce das crianças infectadas é fundamental para aumentar o tempo de sobrevivência e diminuir a morbidade. Porém, isto se torna difícil visto que a quase totalidade destas crianças podem nascer e permanecer assintomáticas por muitos anos e, que durante os primeiros 18 a 24 meses de vida podem ter ainda circulantes anticorpos IgG anti-HIV maternos transferidos passivamente durante a gestação.^{10,11} Isto torna difícil a valorização dos métodos sorológicos convencionais (Elisa, Western blot e Imunofluorescência direta) no diagnóstico dessas crianças.

Antes de dispormos de testes diretos para detecção do HIV, apenas pela comprovação da perda persistente dos anticorpos adquiridos da mãe era possível excluir a presença de infecção pelo HIV num lactente sob risco. Com a disponibilidade de ensaios que demonstram a presença do HIV tem se tornado possível a detecção precoce das crianças infectadas.¹¹

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica “in vitro” para a amplificação das sequências dos ácidos nucleicos específicas até níveis que sejam facilmente detectáveis no laboratório.^{11,12} Esta técnica tem se revelado muito útil para o diagnóstico de adultos e crianças infectadas pelo HIV, detectando porções do genoma do HIV em leucócitos ou plasma através da amplificação destes segmentos virais.

As vantagens da utilização da PCR para identificação das crianças infectadas são várias: necessidade de pequena quantidade de sangue (1 a 3 ml), rapidez dos resultados e sensibilidade semelhante à cultura do HIV e com custo inferior.¹²

O presente estudo descreve a experiência da Unidade de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com o uso da técnica de PCR no diagnóstico da transmissão vertical do HIV.

Material e métodos

No período de março 1995 a dezembro de 1997 foram avaliadas 205 crianças sob risco de estarem infectadas pelo HIV através da transmissão vertical. Todas apresentavam anti-HIV 1+2 (Elisa) positivo ao nascimento e, a partir do segundo mês de vida foram submetidas a PCR- HIV1 qualitativo para detecção do genoma viral.

As avaliações ambulatoriais foram realizadas trimestralmente, sendo rotina, a cada consulta, a realização de testes sorológicos (Elisa e imunofluorescência específica) para detecção de anticorpos contra o HIV. Foram consideradas infectadas as crianças que apresentaram critérios clínicos e sorológicos de infecção pelo HIV-1 e consideradas não infectadas as crianças que não apresentaram critérios clínicos de infecção pelo HIV-1, no período de observação , e que negativaram a sorologia.

A metodologia de PCR empregada foi o teste Amplicor HIV-1 (Roche), teste qualitativo que utiliza a amplificação do ácido nucléico e a hibridização do HIV-1 DNA pró-viral em preparação de leucócitos.

Para a separação dos leucócitos utiliza-se sangue com EDTA, 100 µl para crianças até 18 meses e 500 µl para crianças maiores e adultos.

O teste é baseado em três etapas:

1º) Amplificação da região alvo

A sequência alvo específica para detecção do HIV-1, DNA proviral, está localizada em uma região altamente conservada do gene gag e resulta num produto de 142 pb. Esta região limitada pelo par de “primers” SK431/432, é também conservada em alguns isolados de HIV-2. Assim, um subproduto de vírus HIV-2 pode ser amplificado e detectado por este teste.

A amostra contendo o DNA e a mistura de reagentes é aquecida para separar a hélice de fita dupla e expor a sequência alvo aos “primers” para que ocorra o anelamento destes na presença de temperatura adequada.

A enzima termoestável DNA polimerase na presença de um excesso de deoxinucleotídeos, incluindo adenina, citosina e uracil (no lugar de timina) estende os “primers” anelados produzindo os amplicons.

Este processo é repetido por 35 ciclos. Cada ciclo dobra a quantidade de DNA alvo.

2º) Hibridização do produto amplificado com sonda específica de ácido nucléico

Após a PCR, os amplicons são desnaturados quimicamente, formando fitas simples de DNA e são adicionados a orifícios de microplacas que contém sondas

específicas ligadas que são complementares ao produto amplificado. Os amplicons marcados com biotina irão hibridizar com as sondas específicas ligadas na placa. A hibridização específica dos amplicons com a sonda aumenta a especificidade da reação.

3º) Detecção do produto amplificado pela formação de cor

Para a remoção do material não hibridizado, faz-se uma lavagem dos orifícios da placa. O conjugado avidina-peroxidase é adicionado à placa. A avidina se liga à biotina que está presente nos amplicons capturados pela sonda que está no fundo do orifício da placa.

Após uma nova lavagem da placa para eliminar o conjugado que não se ligou, ocorre a reação entre o peróxido e a tetrametilbenzidina com a enzima retida no amplicon, que resultará em um complexo corado.

A reação é finalizada pela adição de um ácido fraco. A densidade ótica do produto corado é medido por um leitor de microplacas e os resultados são comparados com o valor do “cut-off”. Controles positivos e negativos acompanham o teste.

Resultados

A PCR para HIV-1 foi realizada em 205 crianças com sorologia para HIV positiva ao nascimento. A mediana da idade de realização do teste de PCR foi 6 meses de vida. A PCR foi positiva em 69 pacientes (33,7%) e negativa em 136 (66,3%).

Em 149 das 205 crianças testadas foi possível definir o estado de infecção pelo HIV, independente do resultado da PCR. Foram consideradas infectadas 43 crianças que apresentaram sintomas relacionados a AIDS e mantiveram sorologia positiva, e não infectadas 106 que permaneceram assintomáticas e negativaram a sorologia. As demais crianças permanecem em acompanhamento ambulatorial, hígdas e com anti-HIV ainda reagente.

Entre os 43 pacientes considerados infectados pelo HIV a PCR foi positiva em 40 (sensibilidade de 93,3%). Todas as 106 crianças consideradas não infectadas apresentaram PCR negativo (especificidade de 100%). O valor preditivo positivo encontrado foi de 100% e o valor preditivo negativo de 97,2%. A tabela 1 sintetiza os resultados dos testes de PCR em pacientes infectados e não infectados.

Das 106 crianças com PCR negativo 89,6% reverteram a sorologia até os 18 meses de idade, 6,6% negativaram a sorologia até os 24 meses e 3,8% até os 30 meses. A figura 1 mostra a negatificação da sorologia conforme faixa etária.

Nos 56 pacientes em que não foi possível definir o estado de infecção pelo HIV a PCR foi positiva em 29 e negativa em 27.

Em 32 crianças estudadas foi utilizado zidovudine (AZT) na gestação. Nestes pacientes a PCR foi positiva em 3 casos (9,4%) e negativa em 29 (90,6%).

Discussão

O número de mulheres em idade fértil contaminadas pelo HIV vem aumentando rapidamente. Todas as crianças nascidas destas mulheres apresentam sorologia positiva ao nascimento. Como o vírus atravessa a placenta em 15 a 50% dos casos, a maioria destas crianças não estará infectada. É importante diferenciar precocemente as crianças infectadas das não infectadas, pois a introdução de novas drogas anti-retrovirais, a profilaxia e o tratamento das infecções oportunistas aumentaram o tempo e a qualidade de sobrevivência.

Diversos estudos tem avaliado a capacidade dos testes de cultura viral, PCR, dosagem de anticorpos IgA anti-HIV e antigenemia p24 em identificar as crianças infectadas pelo HIV. Até o momento tem-se verificado que a cultura viral e a PCR são os testes com melhor sensibilidade e especificidade diagnóstica a partir do 2º mês de vida.¹³⁻¹⁵

A cultura do HIV é um teste pouco utilizado em nosso meio devido a sua difícil e dispendiosa execução, além da demora na obtenção dos resultados.

A PCR permite a detecção do HIV com sensibilidade entre 95 a 100% em crianças a partir do 2º mês de vida. Embora seja um ensaio que utilize complexa tecnologia de biologia molecular, é de fácil execução e permite resultados em até 24 horas.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é considerado um centro de referência para o acompanhamento de crianças sob risco de infecção pelo HIV. Para o melhor manejo destas crianças, tornou-se necessário dispormos de um método diagnóstico capaz de diferenciar as crianças infectadas das não infectadas. No final do ano de 1994 a Unidade de Imunologia do HCPA introduziu a PCR na sistemática de avaliação destas crianças.

A PCR foi realizada em 205 crianças sob risco de infecção pelo HIV e os resultados obtidos foram comparáveis aos encontrados na literatura, confirmando a eficácia do teste no diagnóstico precoce da infecção.

Este estudo também possibilitou a observação de que crianças nascidas de mães HIV positivas que receberam AZT durante a gestação e trabalho de parto apresentaram nítida diminuição nos índices de infectividade (9,4%) em relação aos filhos de mães não tratadas (33,7%).

Um teste com valor preditivo positivo de 100% nos permite afirmar que um resultado de PCR positivo a partir do 2º mês de vida é altamente sugestivo de infecção pelo HIV.

A PCR não detectou o vírus em três crianças com sintomas relacionados a AIDS. Assim sendo, um resultado de PCR negativo exige um rigoroso acompanhamento clínico e a negativação da sorologia para excluir o diagnóstico.

Bibliografia

1. Centers for Diseases Control. **Pneumocysts pneumonia** - Los Angeles. MMWR 1981; 30: 250-6.
2. Centers for Diseases Control. **Unexplained immunodeficiency and oportunic infection in children**. MMWR 1982; 31: 665-7.
3. Centers for Diseases Control. Update: **Mortality attributable to HIV infection among persons aged 24-55 years - United States, 1991 and 1992**. MMWR 1993; 42: 869-872.
4. Chin J. **Current and future dimensions of the HIV/AIDS pandemic in women and children**. Lancet 1990; 336: 221-224.
5. Oxtoby M. **Vertically acquired HIV infection in the USA**. In: Pizzo PA WC, ed. Pediatric AIDS. The challenge of HIV infection in infants, children, and adolescents. 2 end. Baltimore: Milliams & Wilkins, 1994: 3-20.
6. Bayer P, Dillon M, Deveiri AS, Keller M, O'Rourke S, Bryson Y. **Factors predictive of maternal-fetal transmission of HIV-1**. JAMA 271: 1925-1930, 1994.
7. Brierley J, Roth C, Warwick C. **Breast- feeding and HIV infection**. Lancet 1: 13466, 1988.
8. European Collaborative Study. **Risk factor for mother-to-child transmission of HIV**. N Engl J Med 327: 122477-1349, 1992.
9. Centers for Diseases Control. **Zidovudine for the prevention from mother to infant**. MMWR 43: 285-287, 1994.

10. Centers for Diseases Control. **Classification system for HIV infection in children under 13 years of age.** MMWR 36: 225-236, 1987.
11. Consensus Report. **Early diagnosis of HIV infection in infants.** J AIDS 5: 1169-1178, 1992.
12. Petru A, Dunphy MG, Azimi P, *et al.* **Reliability of polymerase chain reaction in the detection of human immunodeficiency virus infection in children.** Ped Inf Dis J 1992; 11: 30-3.
13. Borkowsky W, Krasinski K, Pollack H, *et al.* **Early diagnosis of human immunodeficiency virus infection in children < 6 months of age: comparison of polymerase chain reaction, culture and plasma antigen capture techniques.** J Infect Dis 166: 616-619, 1992.
14. Burgard M, Mayaux MJ, Blanche S, *et al.* **The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates.** N Engl J Med 327: 1192-1197, 1992.
15. De Rossi, Ades A, Mammano F, *et al.* **Antigen detection, virus culture, polymerase chain reaction and in vitro antibody production in the diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection.** AIDS 5: 15-20, 1991.

Tabela 1 – Resultado dos testes de PCR-HIV em pacientes infectados e não infectados.

	Infectados	Não infectados	Total
PCR positivo	40	0	40
PCR negativo	03	106	109
Total	43	106	149

Sensibilidade = 93%
Especificidade = 100%

Valor Preditivo Positivo =100%
Valor Preditivo Negativo =97,2%

**Valores de referência do ácido hipúrico urinário na região metropolitana de
Belo Horizonte ***

Urinary hippuric acid reference values in Belo Horizonte metropolitan area, Brazil

Alvarez-Leite¹, E. M.; Duarte², A.; Couto², A. F.; Caixeta³, V. F.; Barroca⁴, M. M.

RESUMO - Objetivando estabelecer a faixa de valor de referência para o ácido hipúrico na região metropolitana de Belo Horizonte, urinas de indivíduos não expostos ocupacionalmente ao tolueno foram analisadas por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se detector de ionização de chama. Os valores encontrados experimentalmente (n=281) variaram de < 0,1 a 2,79 g/L, mas a aplicação de estudo estatístico delimita como faixa de referência, a nível de significância de 95%, os valores de 0,361 a 0,481 g/L. São descritas, também, as condições analíticas padronizadas para a determinação cromatográfica do ácido hipúrico urinário.

UNITERMOS - Valor de referência, ácido hipúrico urinário, cromatografia em fase gasosa

* Trabalho realizado no Laboratório de Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Farmácia da UFMG - Av. Olegário Maciel 2360 s/610 - 30180-112 - Belo Horizonte - MG

¹ Professor Adjunto do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia/UFMG

² Bolsista de Iniciação Científica (CNPq), Setor de Toxicologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia/UFMG

³ Bolsista de Aperfeiçoamento, Setor de Toxicologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia/UFMG

⁴ Farmacêutico-Bioquímico, Laboratório de Toxicologia Ocupacional do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia/UFMG

SUMMARY - In order to know the hippuric acid reference value range in brasilian subjects living in metropolitan area of Belo Horizonte city, the toluene unexposed subjects urine have been determinated by gas-liquid chromatography acopled to flame ionization detector. The experimentally observed urinary hipuric acid range was < 0,1 a 2,79 g/L but the range "reference value" have been statistically definide (P=0,05) as 0,361 a 0,481 g/L. It has been described the gas-liquid chromatographic conditions used in this paper.

KEY WORDS - Reference value, urinary hippuric acid, gas-liquid chromatography

INTRODUÇÃO

Um dos requisitos importantes para a realização de um adequado Programa de Monitorização Biológica da Exposição Ocupacional a xenobióticos é o conhecimento dos valores de referência (VR) dos biomarcadores utilizados (10). Estes valores são influenciados por fatores individuais e, conseqüentemente, variam de acordo com a população estudada (12).

A legislação brasileira, através da Norma Regulamentadora nº 7 de 1994, (NR-7) do MT/Br (3) estabelece os chamados "valores de referência da normalidade" para a maioria dos indicadores biológicos discriminados em seu Quadro I. Muitos destes valores foram determinados em trabalhos realizados fora do Brasil, em condições ocupacionais, climáticas, clínicas e sócio-econômicas distintas das existentes no país, resultando, certamente, em valores de referência irrealis.

A influência de fatores individuais e sócio-econômicos torna-se mais importante quando o biomarcador analisado é um metabólito fisiologicamente encontrado na urina humana, como é o caso do ácido hipúrico (1),(2),(4),(6),(8),(11).

Este metabólito é formado no organismo pela conjugação do ácido benzóico com a glicina, assim dietas ricas em alimentos que contenham ácido benzóico e/ou seus precursores influenciam significativamente a formação do ácido hipúrico orgânico.

Dentre estes alimentos destacam-se as frutas (como ameixa e pêsegos), grãos verdes de café e, especialmente, os alimentos e bebidas conservadas com benzoatos. A ingestão de sucos de frutas, alguns tipos de pães e derivados, *ketchup*, mostarda e refrigerantes aumentam sobremaneira a formação e excreção do ácido hipúrico (os refrigerantes podem produzir uma concentração de ácido hipúrico igual àquela excretada após exposição ocupacional a 200mg/m³ de tolueno).

Outro fator a ser considerado é o uso de medicamentos. Isocarboxazida (antidepressivo, inibidor da monoaminoxidase), dietilpropiona, medicamentos que contenham femprobamato (alguns miorrelaxantes e ansiolíticos), assim como outros fármacos (cocaína) poderão aumentar a excreção fisiológica do ácido hipúrico pela urina. Assim, devido ao elevado e variável valor de referência do ácido hipúrico urinário, este indicador perde sua validade em termos da monitorização de exposições individuais leves.

Objetivando conhecer os reais valores de referência de alguns biomarcadores em uma faixa da população brasileira, a equipe do Laboratório de Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Farmácia da UFMG- LATO/FAFAR, em 1989, iniciou a linha de pesquisa “Valores de referência de indicadores biológicos utilizados na monitorização de exposições ocupacionais: estudo realizado na região metropolitana de Belo Horizonte”. Desta linha de pesquisa resultou o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Amostras de urina de indivíduos não expostos ao tolueno, residentes na região metropolitana de Belo Horizonte (n=281), foram selecionadas para o trabalho. Os indivíduos selecionados responderam ao protocolo toxicológico em anexo (Anexo 1), no momento da coleta das amostras.

Método

O método analítico empregado foi o de KIRA(7) modificado por ALVAREZ-LEITE, FRANÇA, MONTEIRO et alii (1) como descrito a seguir:

- ⇒ transferir 0,5 mL de urina para um tubo de vidro, adicionar gotas de HCl 6 mol/L e 4 mL de acetato de etila;
- ⇒ agitar 1 min. em agitador mecânico e transferir 3,5 mL da fase orgânica para um tubo de vidro;
- ⇒ adicionar 200 mg de sulfato de sódio anidro, agitar e transferir 3mL para um tubo de centrífuga;
- ⇒ adicionar 0,5 mL de solução metanólica de ácido heptadecanóico e evaporar até resíduo em banho de água a 70°C, sob fluxo de nitrogênio;
- ⇒ resfriar os tubos e adicionar 120 µL de agente metilante (hidróxido de trimetilfenilamônio);
- ⇒ agitar vigorosamente por 1 min. e injetar 3 µL no CG.

Foi utilizado o cromatógrafo a gás modelo 370 da Instrumentos Científicos CG Ltda, nas seguintes condições cromatográficas:

⇒ coluna cromatográfica de vidro empacotada com a fase fixa SE 30 a 3%, em Chromosorb WHP 100-120 mesh, medindo 1,8m de comprimento e 1/8" de diâmetro interno;

⇒ temperaturas de operações: -coluna (TC) = 180°C; -vaporizador(TV) = 215°C;
- detector (TD) = 260°C;

⇒ fluxos dos gases: N₂-U = 30 mL/min; H₂ = 30 mL/min; O₂ = 180 mL/min;

⇒ atenuação : 8×10^{-9}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método analítico padronizado apresentou sensibilidade, recuperação e precisão, adequados para a determinação dos valores de referência, como pode ser observado pelos dados subcitados:

⇒ porcentagem de recuperação = 88%,

⇒ coeficiente de variação: intra-ensaio = 13%,

interensaio = 15%

⇒ limite de quantificação de 0,1 g/L

⇒ limite de detecção de 0,03g/L e

⇒ faixa de linearidade 0,1 a 1,6 g/L.

A quantificação do ácido hipúrico (AH) foi feita com o auxílio de uma curva de calibração, onde se utilizou as relações área do pico de ácido hipúrico/área do pico do padrão interno x diferentes concentrações de solução padrão de AH.

Os dados referentes à validação analítica mostram ser o método padronizado, adequado aos objetivos do presente trabalho, uma vez que a grande maioria das amostras de urina analisadas apresentaram níveis de ácido hipúrico detectáveis através da metodologia.

Os valores obtidos mantiveram-se dentro da faixa experimental de $< 0,1$ a $2,79$ g/L, com média de $0,421$ g/L (mediana de $0,28$ g/L, média truncada de $0,372$ g/L) e desvio padrão de $0,405$ g/L. Os valores quantis 1 e 3 (Q1 e Q3) encontrados foram, respectivamente, $0,18$ e $0,503$ g/L

É importante ressaltar que, em 1994, quando a legislação brasileira passou a adotar a concentração da creatinina como correção do ácido hipúrico urinário, o presente trabalho já apresentava 201 alíquotas de urina analisadas, por este motivo a correção pela densidade urinária continuou a ser utilizada até ao final do projeto. Os valores foram submetidos ao tratamento estatístico proposto por MINOIA, SABBION et alii (9) e DUCA (5), considerando-se uma distribuição exponencial e um nível de significância de 95% ($Z_{0,05}$). A determinação do intervalo de confiança delimitou como valores de referência para 95% da população estudada, os níveis de ácido hipúrico dentro da faixa de $0,361$ a $0,481$ g/L.

Esses resultados são de extrema importância para a monitorização biológica da exposição ao tolueno no país, posto apresentarem uma faixa de referência que considera os fatores individuais, sócio-econômicos e ambientais existentes numa região industrial brasileira. Este talvez seja o primeiro ou um dos primeiros trabalhos a estabelecer a faixa de referência do ácido hipúrico em população brasileira e mostra que a média de ácido

hipúrico urinário em indivíduos não expostos, não difere, significativamente, do valor médio citado em trabalhos realizados em outros países (0,5 g/L) (6),(9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - ALVAREZ-LEITE, E. M.; FRANÇA, L. S.; MONTEIRO, R. B.; CIOLETTI, A. G.; BARROCA, M. M. - Liquid chromatography determination of urinary hippuric acid after trimethyl phenylammonium derivation. *Toxicorama*, Paris, v.6, p.5-8, 1994.

2 - BACLUNE, J. Human solvent exposure, factores influencing the pharmacokinetics and acute toxicity. *Institute of Environmental and Occupational Medicine University of Aarhus*, Denmark, November, 1990.

3 - BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Relações do Trabalho. Portaria nº 24, de dezembro de 1994. *Diário Oficial*, Brasília, 30 dezembro de 1994. Secção 1, p.21278-21279.

4 - DOSSING, M., BAELUM, J., HANSEN, S.H., LUNDGVIST, G.R. Effect of ethanol, cimetidine and propranolol on toluene metabolism in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, v.54, p.309-315, 1984.

5 - DUCA, P. - Valori di riferimento ed intervalli di tolleranza. *Med. Lav.*,82(3):195-212, 1991.

6 - HJELM, E.W., NÄSLUND, P.H., WALLÉN, M. Influence of cigarette smoking on the toxicokinetics of toluene in humans. *J. Toxicol. Environ. Health*, New York, v.25, p.155-163, 1988.

7 - KIRA, S. - *Brit. J. Ind. Med.*, v. 34 p. 305 - 309, 1977.

8 - LOF, A., WALLEN, M., HJELM, W. Influence of paracetamol and acetylsalicylic acid on the toxicokinetics of toluene. *Pharmacology & Toxicology*, v.66, p.138-141, 1990.

9 - MINOIA, C.; SABBION, E.; APOSTOLI, P.; PIETRA, R.; POZZOLI, L.; GALLORINI, M.; NICOLAOU, G.; ALESSIO, L.; CAPODAGLIO, E. - Trace element reference values in tissue from inhabitants of the European community. I - A study of 46 elements in urine, blood and serum of italian subjects. *Sci.Total Env.*, 95:89-105, 1990.

10 - SOUNIS, E. - *Manual de Higiene e Medicina do Trabalho*, 3^a ed., Ícone Editora, São Paulo, 1993, p. 363-370.

11- WANG, R.S., NAKAJINA, T. Kinetic studies on toluene metabolism in ethanol - and pheno-barbital - induced rat liver microsomes in vitro. *Arch Toxicol.*, v.65, p.39-44, 1991.

12- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva: WHO, *Environmental Health Criteria*, v.155, 82p., 1993.

ANEXO 1**Protocolo Toxicológico**

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFMG**LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA OCUPACIONAL - LATO/FAFAR****Questionário a ser respondido pelos indivíduos selecionados para o trabalho, no momento da coleta da amostra****I - DADOS SOBRE A AMOSTRAGEM**

Número da amostra

Densidade da urina

Data da coleta

Hora da coleta

Volume coletado

II - INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome:

Idade

Sexo

Profissão

Você é fumante?

 sim não

Há quanto tempo?

Quantos cigarros por dia?

Qual o tempo decorrido entre o último cigarro fumado e a hora da coleta?

Fuma no local de trabalho?

 sim não

Você costuma utilizar bebidas alcoólicas?

 sim não

Com que frequência?

Qual o tempo decorrido entre a última ingestão alcoólica e a hora da coleta?

Você costuma beber refrigerantes? sim não

Com que frequência?

Qual o tempo decorrido entre a última ingestão e a hora da coleta?

Qual a sua dieta normal? (frutas, especialmente ameixas e pêssegos, alimentos em conservas, mostarda, *ketchup*, etc)

Qual o tempo decorrido entre sua última refeição e a hora da coleta?

Você poderia citar os alimentos ingeridos?

Você costuma se alimentar no local de trabalho? sim não

Você faz uso diário de café? sim não

Quantas xícaras por dia?

Qual o tempo decorrido entre a última xícara de café e a hora da coleta?

Você faz uso de algum medicamento? sim não

Qual(is)?

Qual o tempo decorrido entre a última dosagem e a hora da coleta?

Você tem algum problema renal, hepático, pulmonar ou hematológico (anemia, por exemplo) sim não

Especificar

Existe alguma indústria perto de sua casa? sim não

Especificar

III - INFORMAÇÕES SOBRE O LOCAL DE TRABALHO

Você trabalha com substâncias químicas? sim não

Quais?

Com que frequência?

Especificar o setor ou secção onde trabalha e há quanto tempo

Descreva resumidamente a atividade executada

Jornada de trabalho atual: número de dias/semana número de horas/semana

em que dia(s) da semana é sua folga?

quando foi sua última folga?

Você já trabalhou em outro setor desta indústria? sim não

Quanto tempo?

Você já trabalhou em outras empresas? sim não

Quanto tempo?

Qual era a atividade executada?
