

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

Determinação da ferritina sérica por dois métodos imunológicos automatizados	39
<i>Elvira M. Guerra-Shinohara; Rosângela P. Paiva; Hosana G. Santos; Nairo M. Sumita; Maria Elizabeth Mendes; Luz-Marina Nuñez; Sophia C. Szarfarc & Adelaide J. Vaz</i>	
Ferritin determination performed by two immunologic automated methods	
Estudo morfológico do hemograma: variação inter-observador em um painel de casos	41
<i>Elvira Maria Guerra-Shinohara & Hosana Gonçalves Santos</i>	
A study on inter-observer variation through the hemogram morphological analysis	
Estudo retrospectivo da incidência de vulvovaginites, cervicites e neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres atendidas pelo serviço de prevenção ao câncer ginecológico e de mama no Município de Aracati-CE	45
<i>Francisca Janaina Soares Rocha & Geanne Matos A. Cunha</i>	
Incidence of vulvovaginitis, cervicitis and cervical intraepithelial neoplasia in women evaluated in a center for prevention of gynecologic and mammary cancer in the municipality of Aracati, Ceara: a retrospective study	
Infecções hospitalares em grandes queimados da área pediátrica do Hospital Geral da cidade de Aracaju	49
<i>Maria Regina Pires Carneiro & Marcélia Garcez Dória</i>	
Nosocomial infections in big burned of the pediatric area of the general hospital of Aracaju city	
Análise do teste de ELISA anti-HIV-1 em pacientes com leishmaniose visceral	53
<i>Ana Luiza Matos Ramos & Ivo Castelo Branco Coêlho</i>	
Seropositivity to ELISA's anti-HIV tests in patients with American Visceral Leishmaniasis	
Avaliação da atividade antimicrobiana de um desinfetante hospitalar	56
<i>Francisco Einstein do Nascimento & Maria de Jesus L. do Nascimento</i>	
The valuation of antimicrobial action test in hospital disinfectant	
Teste de hemaglutinação para o diagnóstico da neurocisticercose humana: desenvolvimento de reagente estável utilizando antígeno heterólogo	58
<i>Andréia P. Ferreira; Adelaide J. Vaz; Paulo M. Nakamura; José A. Livramento & Luis R. Machado</i>	
Hemmagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using heterologous antigens	
Leishmaniose visceral em Feira de Santana: inquérito sorológico em cães e a relação entre a distribuição da positividade canina por localidade e os casos humanos	61
<i>Simone Souza De Oliveira; Selma Santa Barbara Da Silva; Joelande Esquivel Correia & João Francisco Dos Santos</i>	
Visceral leishmaniosis in Feira de Santana-Bahia: sorologic inquest in dogs and the relation between the canine positivity and in human beings in each district	
• Sistema Internacional de Unidades (SI)	65
XXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas	
• Temas Livres	73

2

ANA LUZIA MATOS RAMOS

**ANÁLISE DO TESTE DE ELISA ANTI HIV-1 EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

FORTALEZA-CEARÁ

1996

ANÁLISE DO TESTE DE ELISA ANTI-HIV-1 EM PACIENTES COM

LEISHMANIOSE VISCERAL

Seropositivity to ELISA'S anti - HIV tests in patients with American Visceral Leishmaniasis

Ana Luiza Matos Ramos ¹, Ivo Castelo Branco Coelho ²

SUMÁRIO

As reações falso-positivas em testes de ELISA (Enzima Linked Immuno Sorbent Assay) podem acontecer.

O presente trabalho demonstra a existência de reações cruzada no teste de Elisa anti-HIV em 33 pacientes de 0 - 15 anos com diagnóstico de calazar. Foram observados 5 casos positivos para o teste de ELISA anti-HIV na primeira reação e em 4 (12,12%) houve a permanência da positividade na segunda reação sorológica. Estes pacientes positivos apresentaram Western Blot anti-HIV negativos. Devido o estigma da infecção pelo HIV, fica imperativo, em zonas endêmicas de Leishmaniose Visceral Americana, nos pacientes que tenham apresentado ELISA, anti-HIV positivo, a realização de outro teste comprobatório do HIV (Western Blot).

UNITERMOS

Leishmaniose Visceral Americana; alterações hematológicas; anticorpo; testes sorológicos; reações cruzadas.

SUMMARY

False-positive cross-reactions are observed with a certain frequency, in the immunoenzymatic test of ELISA. The present investigation reveals one such occurrences, in serological tests conducted on patients positive for American Visceral leishmaniasis (AVL). In a total of 33 ELISA assays in the sera of AVL patients, 4 were observed to be positive for

anti-HIV (12,12% positivity). However, subsequente Western blot assays did not confirm the positive results for observed with ELISA.

KEY WORDS

American Visceral Leishmaniasis; hematologic changes; antibody; serological tests; crossing over.

Recebido em 28/02/96

1. Pós - graduada em Hematologia e Hemoterapia - Hemoce - UFC
2. Prof. Dr. Titular - Departamento de Parasitologia - UFC

INTRODUÇÃO

A leishmaniose designa um distúrbio causado pelos protozoários do gênero *Leishmania*. Estudamos particularmente a leishmaniose visceral Americana (LVA), que tem como agente causal a *Leishmania donovani chagasi*, transmitida ao homem pela picada das fêmeas de *Lutzomia longipalpis* inseto hematófago considerado seu principal vetor no Brasil (2,9,12).

Sendo o calazar uma doença extremamente complexa a possibilidade de ocorrer reações cruzadas não nos surpreende. O motivo pelo qual acontecem reações cruzadas não está esclarecido, sabemos no entanto que a conformidade molecular, a localização dos sítios de ligação (EPITOPOS) e a existências de determinantes antigênicos são fatores que viabilizam a ocorrência destas reações.

O diagnóstico do calazar em áreas endêmicas pode ser suspeitado quando o paciente apresenta febre irregular ou recorrente, muitas vezes com dois picos diário, leucopenia e esplenomegalia; e confirmado quando se encontra a forma amastigota do parasita em esfregaço de aspirado medular, de baço e de fígado de linfonodos. (13) A punção esplênica revela alta porcentagem de positividade, mas tem uso limitado pois depende da normalidade dos fatores de coagulação e contagem de plaquetas do paciente (15). Quando o número de parasitas é relativamente baixo as múltiplas culturas, em meio N. N. N., de material do baço ou medula óssea mostram bons resultados (10).

Os anticorpos são detectáveis em todas as formas de leishmaniose. O teste de aglutinação direta detecta o anticorpo IgM sendo mais sensível na fase aguda (7,2). Teste positivo ($> 1:32$) varia de 97%, na leishmaniose visceral, para 81% L. cutânea do Novo Mundo (8).

Outros testes sorológicos, como fixação do complemento, a hemaglutinação, os ensaios enzima imuno absorventes ligados a enzima (ELISA) e a imunofluorescência indireta são técnicas mais eficazes no diagnóstico do parasita (1,11,14,16).

A prevenção da LVA pode ser feita construindo-se casas de tijolo onde não há fendas que propiciam a proliferação dos mosquitos. O combate só é possível por meio de pulverização com inseticidas (12).

OBJETIVO

Verificar a existência de reação cruzada no teste de ELISA anti-HIV, em pacientes com leishmaniose visceral Americana.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto de 1995 a janeiro de 1996, selecionamos para a nossa pesquisa pacientes com calazar internados no Hospital Infantil Albert Sabin - Fortaleza Ceará - de ambos os sexos com idade entre 0 a 15 anos. Coletamos sangue com rigorosa assepsia em tubos de ensaio sem anticoagulante, centrifugamos separamos e congelamos o soro para ulterior análise, que foi realizada em duas etapas: metade dos testes foram feitos em outubro e o restante em janeiro, no setor de sorologia do HEMOCE.

Aplicamos um protocolo de investigação para avaliação da queixa principal, do tempo de febre, dos sintomas hemorrágicos, das queixas

respiratórias e cardíacas, do aumento do abdome, das infecções associadas etc.

Sendo as alterações hematológicas (2,13) um fator decorrente e agravante para os portadores de leishmaniose visceral, avaliamos dados dos prontuários tais como: hematócrito, hemoglobina, número de leucócitos e plaquetas, dosagem de proteínas totais albumina e globulina.

O diagnóstico da leishmaniose visceral foi obtido pela pesquisa direta de protozoários por punção medular, imunofluorescência indireta para calazar ou ambas (9).

Para verificar a nossa hipótese realizamos testes de ELISA anti-HIV em duplicata em todas as amostras, repetimos o referido teste nas amostras com sorologia positiva e em seguida aplicamos o teste confirmatório Western blot.

FIGURA 2

POSITIVO → REPETIR → POSITIVO → WESTERN BLOT para
HIV ↗

ELISA

↘
NEGATIVO → REPETIR → NEGATIVO → DESPREZAR

RESULTADOS

Os Resultados estão apresentados em tabelas (tabelas 1,2,3,4,5,6 e 7).

TABELA 1 – Distribuição dos pacientes com calazar por faixa etária e sexo.

Idade Sexo	0 — 5a(%)	5 — 10(%)	10 — 15(%)	Total (%)
M	9(27,27)	4(12,12)	2(6,06)	15(45,45)
F	13(39,39)	3(9,09)	2(6,06)	18(54,54)
T	22(66,66)	7(21,21)	4(12,12)	33(100)

TABELA 2 – Distribuição dos pacientes com calazar quanto a queixa principal.

Queixa Principal	Frequência	%
Febre	23	69,6
Aumento do vol. Abdominal	18	54,5
Palidez Cut. Mucosa	14	42,4
Fraqueza Geral	05	15,15
Perda de peso	02	6,06
Diarréia	01	3,03
Tosse	01	3,03
Adnamia	01	3,03
Edema de membros	01	3,03

inferiores		
------------	--	--

TABELA 3 – Distribuição dos pacientes com calazar de acordo com a infecção associada.

Infecção associada	Frequência	%
Pneumonia	12	36,36
Gripe	05	15,15
Diarréia	04	12,12
Infecção urinária	03	9,09
Derrame pleural	01	3,03
Infecção orofaringe	01	3,03
Linfangite	01	3,03
Miocardite	01	3,03

TABELA 4 – Distribuição dos pacientes com calazar de acordo com a apresentação das vísceras.

Apresentação das vísceras	Frequência	%
Hepatoesplenomegalia	21	63,63
Hepatomegalia	06	18,18
Esplenomegalia	03	9,09
Sem Visceromegalias	03	9,09

TABELA 5 – Distribuição da Amplitude, Média e Desvio padrão de valores hematológicos em pacientes com calazar.

	PLAQUETAS x10 ³ /mm ³	LEUCÓCITO S TOTAIS (mm ³)	HEMOGLOBI NA (g%)	HEMTÓCRITO (%)	GLOBULINA (mg/dl)	ALBUMINA (mg/dl)	PROT. TOTAIS (mg/dl)
AMPLITUDE	10.000 – 4350000	1200 – 20.400	2,0 – 10,3	8,0 – 36,0	2,0 – 7,3	1,96 – 4,52	5,4 – 9,8
MÉDIA	141.606	4.215	6,63	23,18	4,59	3,13	7,73
D. PADÃO	86.363	3.648	1,88	6,2	1,33	0,7	1,08

TABELA 6 – Distribuição dos pacientes com calazar de acordo com o tempo de doença.

Tempo de doença (meses)	Frequência	%
0 --- 4	27	81,80
4 --- 8	05	15,15
8 --- 15	01	3,05
TOTAL	33	100,0

TABELA 7 - Resultados

Testes aplicados	No de pacientes estudados	Positivo - %	Negativo - %
Teste de ELIZA ANTI-HIV	33	5 - 15,15%	28 - 84,84%
Western BLOTTING para HIV	05	-----	33 - 100%

DISCUSSÃO

O relato verbal de casos envolvendo testes de ELISA anti-HIV falso-positivo em portadores de leishmaniose visceral americana (LVA), incentivou-nos, a pesquisar em pacientes portadores de L.V.A a Frequência destes resultados. Investigamos também outros fatores-sinais e sintomas - que pudessem levar a uma associação causa-efeito destas reações.

A avaliação hematológica fornece subsídios de grande valor para o diagnóstico do calazar, encontrando-se costumeiramente leucopenia, linfocitose, monocitose, anemia e plaquetopenia. A patogênese da doença é complexa, estando envolvidos o hiperesplenismo, as alterações medulares e mecanismos imunológicos (2,13).

Em nosso estudo houve discreta predominância do sexo feminino na L. V. A., no entanto, a literatura refere que a doença incide duas vezes mais no sexo masculino do que no sexo feminino. Podemos atribuir esta predominância ao fato de termos estudado pacientes abaixo de 15 anos (15).

Um dado bastante comum, encontrado nestes pacientes, foi a hipertrofia do baço e do fígado 21 (63,63%), fato este causado pelo tropismo visceral do parasito, hipertrofiando e hiperplasiando o sistema macrofágico das vísceras (6,13,15).

Encontramos na medula óssea a presença de macrófagos parasitados que pouco a pouco substituem o tecido hemopoiético. Em virtude das alterações que atingem os órgãos formadores e reguladores da composição sanguínea sobrevém anemia (15), em geral normocítica e

normocrômica (9). A anemia no calazar não é devida apenas à superpopulação histocitária dos órgãos hematopoiéticos. Constatou-se que a vida média das hemácias está diminuída provavelmente por mecanismos de auto-imunidade e ativação do complemento (9,15).

A diminuição das plaquetas foi observada em 18 pacientes (54,54%), expondo estes pacientes a risco de hemorragias particularmente a epistaxe (9).

A leucopenia (menos de 4.000 leuc/mm³) foi encontrado em 20 casos (60,60%), justificando a predisposição dos indivíduos a infecções secundários. A redução acontece principalmente nos granulócitos. Os linfócitos apresentam aumento percentual, mas há ligeira queda no número absoluto por milímetros cúbicos (9,15).

A análise das proteínas totais e frações apresentou globulina acima de 2,0mg/dl em 32 casos (96,9%). A hipergamaglobulinemia é do tipo policlonal (demonstrada pela eletroforese) em sua maioria inespecíficas não contribuindo para a proteção contra a doença. O aumento da concentração sérica de imunoglobulinas da classe IgM e IgG é responsável pelo resultado positivo de várias provas sorológicas, como a do formol gel e Bramachari por exemplo (2, 4).

Nos testes para verificar a existência de reação cruzada (falso-positivas) 5 pacientes (15,15%) deram resultados positivo para o teste de ELISA anti-HIV todos os testes foram realizados em duplicata. Após a repetição dos testes de ELISA anti-HIV positivos, 4 casos (12,2%) permaneceram positivos. Subsequentemente aplicamos o teste confirmatório de Western blot para HIV que deu resultado negativo (ausência de

anticorpos contra o vírus HIV), confirmando a nossa hipótese de reação cruzada em testes de ELISA anti-HIV no soro de pacientes com calazar.

A realização desta pesquisa não nos permite explicar, o porque da ocorrência dessas reações, no entanto a desordem causada pela doença na produção de anticorpos inespecíficos (2) pode ser considerado como um fator predisponente a essas reações.

Conviver com o estigma da AIDS é uma situação, por demais vexatória, se não caótica. Diante dos resultados desta pesquisa sugerimos que numa região endêmica de calazar seja realizado um teste confirmatório para HIV, como o Western blot anti-HIV evitando assim que pessoas recebam tratamento inadequado , ou cheguem até mesmo ao óbito por conclusão diagnóstica equivocada e não instituição da terapêutica necessária.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo nos leva a concluir que o teste de ELISA anti-HIV apresenta resultados falso-positivo em pacientes com Leishmaniose Visceral Americana em 12% (dos pacientes estudados).

Em área endêmica de calazar os pacientes que apresentarem o teste de ELISA anti-HIV positivo devem ser submetidos a um outro teste comprobatório para HIV (Western Blot para HIV).

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do setor de Imunohematologiaa do HEMOCE e a Farmacêutica - Bioquímica Maria Zenaide Matos Albuquerque.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS A. K. et. al. Antibodies and antigens. In: - **Celular and molecular immunology**. 2^a ed and antigens. In: -. Philadelphia: M.B. Saunders Company. 3, p. 56,57,59.
2. AMATO V. N., NICODEMO C., Leishmaniose Visceral (Calazar). In: – AMATO V. N., BALDY J.L.S. **Doenças transmissíveis**. 3 ed. São Paulo: Sarvier 1989. p. 559 –62.
3. BENTLEY G. A., BOYLOT G., CHITARRA V. Cross-reactivity in antibody-antigen interactions. **Res. immunologie**. V. 145, n. 15, p 45 – 8, jan., 1994.
4. BERHE N, HAILU A, WOLDAY D. et. al. Ethiopian visceral Leishmaniasis patients co-infected with human imunodeficiency. **Transactions of the royal society of tropical medicina & higgiene**. V 89, n. 2, p. 205 - 7, Mar - Apr 1995.
5. BIER, OTTO G. et. al. **Imunologia básica e aplicada**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 180 – 183, 1989.

6. DUERDEN B. I. et. al. **Microbial and parasite infection**. 3. ed., London: Edward Arnold, p. 181, 1993.
- 7 GOLUB, EDWARD S.. The Nature of antigens. In: – **Immunology, a synthesis**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, INC. Publishers, Cap. 2, p. 27, 28, 40. 1991.
8. LOCKSLEY, M. R., PLORDE J. J. Infecções por protozoários e helmintos. In: HARRISON T. R. e **Medicina interna**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994. Cap. 13, p., 1338.
9. MARSDEN D. P., WAARREN D. J. Jr. Leishmania Gorbach S. L., BARTLETT J. G., BLACKLOW N.R **Infections Desfases**. Philadelphia: W. B. Saunders Company. p. 1978 – 82. 1992.
10. NEVA A. FRANKLIN. **Basic clinical parasitology**. Ed. G. London: Prattice – Hall International. Inc., p. 73, 74, 75. 1994.
11. NEVES & D. PEREIRA. **Parasitologia Humana**. Ed. 9. São Paulo: ATHENEU. P 77 – 78. 1995.

12. PESSOA, S. B., MARTINS, A. V. **Parasitologia médica.** ed. 10. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 83 – 85, 113, 119. 1978.
13. RIBEIRA E. CURCULLE et. al. Visceral Leishmaniasis in patients with HIV infection. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.** V.13, n.2, p. 73 – 9, Feb., 1995.
14. ROESEL C. E. **Imunologia um método auto-instrutivo.** São Paulo: McGraw – Hill do Brasil Ltda. p. 99 – 100. 1978.
15. REY, LUIZ. Parasitologia. Parasitose e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Ed. 2. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan. S.A., p. 218 – 219. 1991.
16. ZUNINO N. J. ISRAEL G. Infecção por HIV, diagnóstico laboratorial. **ARSCVRANDI.** v. 2, n.5, p. 124 e 125. Jun, 1994.

Dra. Ana Luzia Matos Ramos

Rua Geraldo Magalhães, 1200

60.810-210 - Fortaleza - Ce

085 239.4088

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM DESINFETANTE HOSPITALAR

1-INTRODUÇÃO

A infecção que ocorre nos pacientes após a admissão hospitalar é um problema do mundo todo. O sucesso de procedimentos clínicos-cirúrgicos modernos e sofisticados é progressivamente ameaçado por infecção devido microrganismos de caráter epidêmico e resistentes virtualmente a todos os antibióticos.

Nós que trabalhamos com a saúde estamos preocupados com a própria vulnerabilidade às doenças transmitidas pelo sangue, como, Hepatite e AIDS.

Os hospitais necessitam de normas e procedimentos racionais, com base científica a fim de minimizar o risco de aquisição dessas infecções.

Como responsáveis pela prevenção e controle de infecção hospitalar, através deste trabalho fomos avaliar a atividade antimicrobiana de um desinfetante hospitalar, a base de Fenol sintético.

Como já é sabido, desinfetantes são substâncias químicas empregadas para destruir microrganismos sobre a superfície, sendo demasiadamente tóxicos quando aplicados diretamente nos tecidos vivos, sendo muito usados em ambientes e utensílios hospitalares e domésticos.

O desinfetante em estudo é o Fenol como substância ativa, que atua através da desnaturação das proteínas celulares e pela permeabilização da membrana celular, podendo ser bactericida ou bacteriostático dependendo da concentração.

O método empregado foi o microbiológico *in vitro*, classificado em teste com carreadores, baseados nos procedimentos técnicos do Manual de Saneantes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), usando cepas padronizadas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

O teste foi padronizados quanto aos microrganismos testes, meios de cultura, soluções e equipamentos, para obtenção de dados reprodutíveis e precisos.

O processo de desinfecção constitui um importante procedimento para o controle e prevenção de infecção hospitalar.

2-OBJETIVO

Determinar a atividade antimicrobiana de desinfetante hospitalar através de avaliação da ação bactericida da diluição recomendada pelo fabricante, como também, em outras diluições.

3-MATERIAL E MÉTODO

3.1-Avaliação Antimicrobiana de desinfetante

3.2-Condições seguidas para o ensaio

- Microrganismos testes: Staphylococcus aureus ATCC 6538
Salmonella choleraesius ATCC 10708
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442
- Amostra: Desinfetante hospitalar de uso geral que tem na sua composição o Fenol
- Meio de cultura: Ágar nutritivo
Caldo nutritivo
Caldo Letheen
- Diluyente: Água destilada
- Temperatura de incubação: $35^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$
- Soluções: Hidróxido de Sódio 0,1N
Asparagina 0,12 %
Fenolftaleína
- Período de incubação: 48 horas
- Concentração de solução de trabalho: 3 %, 5 %, 10 % e 20 %
- Carreadores: Cilindros de aço inox com 8 mm + 1, diâmetro externo, 6 mm + 1, diâmetro interno e 10 mm + 1 de comprimento

3.3-Preparações dos cilindros carreadores

- Mergulhar os cilindros em solução de NaOH 0,1N durante uma noite.
- Lavar com água da torneira até que a água de lavagem fique neutra à Fenolftaleína
- Lavar com água destilada
- Autoclavar os cilindros com solução de Asparagina a 0,12 % por 20 minutos a 121°C
- Guardar a temperatura ambiente

3.4-Preparação dos inóculos

- O repique inicial de cada microrganismo estudado é feito em Ágar nutritivo inclinado e incubado em estufa ($35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$) por 24 horas.
- Fazer três repiques seguidos de 24 horas em 10 ml de Caldo nutritivo em tubos de ensaio 25 x 150 mm e incubar em estufa $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$.
- Fazer este procedimento para cada microrganismo estudado (Estafilococos, Pseudomonas, Salmonela.

3.5-Execução do ensaio

- Transferir 10 cilindros estéreis com auxílio de alça de platina em tubo de ensaio 25 x 150 mm contendo o último repique
- Após um período de contato de 15 minutos à temperatura ambiente, remover os cilindros e colocá-los em posição vertical sobre o papel de filtro contido em uma placa de Petri estéril, cobrir e incubar a 37^o. C por 40 minutos.
- Guardar a cultura para determinar sua resistência ao Fenol
- Diluir o desinfetante a ser testado e distribuir em 10 tubos de ensaio 25 x 150 mm na quantidade de 10 ml por tubo.
- Adicionar então os cilindros contaminados e secos, a intervalos de 1 minuto, cada um dos 10 tubos contendo a diluição do desinfetante, logo, 10 tubos são semeados em 9 minutos, deixando 1 minuto de intervalo antes da transferência do 1^o. cilindro carreador, para o 1^o. tubo de subcultura (10 ml de Caldo Lethen em tubo de ensaio) e assim sucessivamente até o 10^o tubo.
- Este intervalo é constante entre cada tubo, perfazendo um período de contato de 10 minutos.
- Transferir cada cilindro para um novo tubo de subcultura.
- O intervalo de 1 minuto entre uma transferência e outra, permite uma flambagem adequada da alça de platina e a drenagem do excesso de desinfetante transportado pelo carreador.
- Agitar todos os tubos da cultura e incubá-los 48 horas a 37^o. C
- Descrever os resultados como: (positivo) crescimento e (negativo) ausência de crescimento.
- Este procedimento é feito com cada um dos 3 microrganismos estudados.
- O desinfetante deverá ser capaz de matar os microrganismos, sobre 59 dos 60 cilindros utilizados para conferir um nível de confiança de 95 %, como só foram usados 10 cilindros, nenhum deles deverá crescer.

4-RESULTADOS (TUBOS POSITIVO)

DILUIÇÃO	S. aureus	Salmonela	Pseudomonas
3 %	02	não testado	não testado
5 %	00	09	10
10 %	00	03	03
20 %	00	00	00

5-DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Das diluições testadas 3 %, 5 %, 10 % e 20 %, somente a última apresentou eficácia quanto a sua ação desinfetante.

6-CONCLUSÃO

Após os testes realizados observou-se que o Método Microbiológico *in vitro* usado para avaliar a atividade antimicrobiana de desinfetante hospitalar, demonstrou que o Fenol sintético, não pode ser usado com segurança no combate às infecções hospitalares na diluição recomendada pelo fabricante.

7-BIBLIOGRAFIA

SOARES, J B; CASIMIRO A R S; AGUIAR, L MB. A Microbiologia básica.
Edições UFC, Fortaleza-CE 1987

PELCZAR, M; REID, R C. Microbiologia vol I, SP 1980, Ed Mc Graw - Hill do Brasil

KOROLKOVAS, A; BURCKHALTER, J H. Química farmacêutica, ED
Guanabara ,RJ 1988

JAWETZ, E; MELNICK, EA. Manual de microbiologia médica, 6 Edição, Ed EL
Manual Modernos S.A, México 1975

OTTO, B; Bacteriologia e imunologia, 24 Edição, Ed Melhoramentos, SP 1985
Manual de saneantes da Fundação Osvaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde. RJ 1992

1.INTRODUÇÃO

ADMISSÃO DE PACIENTES →INFEÇÃO HOSPITALAR
MICROORGANISMOS→RESISTÊNCIA BACTERIANA
HOSPITAIS→PROCEDIMENTOS CONTRA AS INFECÇÕES
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DESINFETANTE A
BASE DE FENOL SINTÉTICO

DESINFETANTES→MATAM MICROORGANISMOS SOBRE A SUPERFÍCIE,
SENDO TÓXICOS QUANDO APLICADOS EM TECIDOS VIVOS, E USADOS EM
AMBIENTES E UTENSÍLIOS HOSPITALARES E DOMÉSTICOS.

MECANISMO DE AÇÃO→ DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS CELULARES
E PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR.

MÉTODO→ MICROBIOLÓGICO “*IN VITRO*” CLASSIFICADO EM TESTE COM
CARREADORES BASEADO INCQS, USANDO CEPAS PADRONIZADAS

2.OBJETIVO

DETERMINAR A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DESINFETANTE
HOSPITALAR ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA AÇÃO BACTERICIDA DA DILUIÇÃO
RECOMENDADA PELO FABRICANTE, COMO TAMBÉM, OUTRAS DILUIÇÕES.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE DESINFETANTE

3.2 CONDIÇÕES SEGUIDAS PARA O ENSAIO

MICROORGANISMOS TESTES:

- Staphylococcus aureus- ATCC 6538
- Salmonella choleraesuis -ATCC 10708
- Pseudomonas aeruginosa -ATCC 15442

AMOSTRA:

-Desinfetante hospitalar a base de fenol sintético

MEIOS DE CULTURA:

- Ágar Nutritivo
- Caldo Nutritivo
- Caldo Letheen

DILUENTE:

-Água Destilada

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO:

-35°.C ± 2°.C

SOLUÇÕES:

- Hidróxido de Sódio 0,1 N
- Asparagina 0,12%
- Fenolftaleína

PERÍODO DE INCUBAÇÃO:

- 48 horas

CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÃO DE TRABALHO:

-3%, 5%, 10% e 20%

CARREADORES:

-Cilindros de aço inox com 8 mm de diâmetro externo, 6 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE UM DESINFETANTE
HOSPITALAR NO COMBATE ÀS
INFECÇÕES HOSPITALARES**

AUTORES

**FRANCISCO EINSTEIN DO NASCIMENTO
MARIA DE JESUS LIMA DO NASCIMENTO**

NOME: Francisco Einstein do Nascimento / Maria de Jesus Lima do Nascimento

RUA:GEN Silva Júnior 797 Bloco B Apto: 304 Bairro:Fátima		
SALA	!CIDADE :Fortaleza	CEP : 60.411-200
UF: CE	!FONE (085) 227-28-67	

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM DESINFETANTE HOSPITALAR

AUTORES: Dr Francisco **Einstein** do Nascimento e
Dra **Maria de Jesus** L. do Nascimento

LOCAL DA REALIZAÇÃO: Laboratório de Controle de Qualidade de Microbiologia da Farmácia Escola da Universidade Federal do Ceará

ESPECIALIDADE DO TRABALHO: Microbiologia

RESUMO

O teste de avaliação da ação antimicrobiana de um desinfetante hospitalar a base de Fenol sintético no combate à infecção hospitalar, usando-se cepas padronizadas, na diluição recomendada pelo fabricante.

Palavras-Chaves: Desinfetante, Fenol, Microrganismos Padronizados, Diluições.

SUMMARY

The valuation of the test of the antimicrobial action of the hospital disinfectant, which basis is the synthetic Fenol in the hospital infection fight, using the standart microorganisms with the dilution recommended by the manufacturer.

Keys words: Disinfectant, Fenol, Standart microorganisms, dilution.

FRANCISCO EINSTEIN DO NASCIMENTO
MARIA DE JESUS LIMA DO NASCIMENTO



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM DESINFETANTE HOSPITALAR NO COMBATE ÀS INFECÇÕES HOSPITALARES

1.INTRODUÇÃO

2.OBJETIVO

3.MATERIAL E MÉTODOS

4.RESULTADOS

5.DISSCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.CONCLUSÃO

DETERMINAÇÃO DA FERRITINA SÉRICA POR DOIS MÉTODOS IMUNOLÓGICOS AUTOMATIZADOS

GUERRA-SHINOHARA, Elvira M.*; PAIVA, Rosângela P.*; SANTOS, Hosana G.*; SUMITA, Nairo M.**; MENDES, Maria Elizabeth**; NUÑEZ, Luz-Marina*****; SZARFARC, Sophia C.***; VAZ, Adelaide J.****

* Seção de Hematologia, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz.

Av Dr Arnaldo, 355 Cerqueira Cezar, CEP 01246-092 São Paulo, Brasil.

** Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

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

**** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

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

RESUMO: A concentração de ferritina sérica está diretamente relacionada às reservas de ferro do organismo. A proposta de nosso trabalho foi comparar os resultados obtidos na determinação da ferritina sérica por dois métodos imunológicos automatizados, uma vez que os resultados obtidos podem implicar ou não em condutas terapêuticas. Foram analisadas 206 amostras de soro por nefelometria usando o kit N-Látex-Ferritin da BEHRING e por enzimaímunoensaio em micropartículas usando o kit IMx ABBOTT. O coeficiente de correlação entre os dois métodos foi de $r^2 = 0,94$. No entanto, quando o método de

enzimaimunoensaio foi usado, a média dos resultados obtidos foram significativamente mais altos que a média dos resultados do método de nefelometria ($p < 0,001$). A seguinte equação de regressão foi obtida: $y = 0,836x + 1,172$ onde y é o resultado da nefelometria e x é o resultado do método IMx ABBOTT. Apesar da alta correlação obtida, os resultados confirmam a importância de se especificar a metodologia aplicada nos resultados reportados.

Palavras chaves: determinação de ferritina, métodos automatizados, métodos imunológicos.

SUMMARY. Serum ferritin concentration is directly related to iron stores in organism. Our paper proposes a comparison between the results obtained on ferritin determination performed by two methods, and the implication of these results in the therapeutic procedures. Two hundred six serum samples were analysed by nephelometry using the BEHRING N-latex-ferritin kit and by ABBOTT IMx enzyme immunoassay on microparticles. The coefficient correlation between the two methods was $r^2 = 0.94$. However, when enzyme immunoassay method was used, the mean results obtained was significantly higher than the mean results obtained by the nephelometry method ($p < 0.001$). The following regression equation was obtained: $y = 0.836x + 1.172$ where y is the result of nephelometry and x is the result of IMx ABBOTT method. Despite the high correlation obtained, the results confirm the importance of specifying the applied methodology in the results reports.

Keys words: ferritin determination, automated methods, immunologic methods.

INTRODUÇÃO

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

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

A determinação da ferritina é útil para o diagnóstico e monitoramento de estados de hipoferremia, tais como em condições onde ocorre a deficiência de ferro (HERSKO et al., 1979). A hipoferremia é um estado no qual os níveis de ferro no organismo estão abaixo dos valores normais, ocorrendo inicialmente a diminuição nos estoques de ferro, a concentração de ferro sérico e hemoglobina estão normais e a ferritina sérica está diminuída. Quando esta deficiência persiste, há diminuição dos níveis do ferro sérico, da saturação da transferrina, sem alteração da concentração da hemoglobina. A anemia por deficiência de ferro é um estado avançado da deficiência de ferro, é caracterizada pela ausência ou diminuição severa dos estoques de ferro, baixas concentração do ferro sérico e saturação da transferrina e presença de baixa concentração de hemoglobina (FAIRBANKS & BEUTLER, 1995).

Concentrações de ferritina sérica inferior a 10 $\mu\text{g/l}$ são encontradas na anemia por deficiência de ferro (JACOBS et al., 1972; FAIRBANKS & BEUTLER, 1995); concentrações entre 10 e 20 $\mu\text{g/l}$ podem ser indicativas desta deficiência, mas não dá diagnóstico

(FAIRBANKS & BEUTLER, 1995). Pode ainda ser utilizada no controle da terapia com ferro até a reposição dos estoques.

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 206 amostras de soro por dois laboratórios, um deles utilizou a técnica de nefelometria para determinação da ferritina sérica usando o kit BEHRING N-latex-ferritin, e outro utilizou o método do ensaio imunoenzimático com micropartículas (IMx ABBOTT). Nenhum dos laboratórios recebeu qualquer informação prévia, constituindo um duplo-cego.

No kit N-latex-ferritin (BEHRING, Alemanha): a ferritina sérica liga-se à micropartículas sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-ferritina. Os microagregados formados desviam a luz que incide sobre o tubo-reação. Essa dispersão da luz é medida pelo nefelômetro.

Kit IMx (Abbott Laboratories, USA): o método é totalmente automatizado (IMx System Operation) e baseia-se na captura de ferritina por micropartículas sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-ferritina. Um segundo anticorpo policlonal anti-ferritina marcado com

fosfatase alcalina liga-se à ferritina sérica capturada. Esse imunocomplexo formado é transferido para uma matriz de fibra de vidro que se liga irreversivelmente às micropartículas. Após lavagens para remoção de proteínas não complexadas, é adicionado o substrato fluorogênico 4-metil-umbeliferil-fosfato que, na presença da fosfatase forma produto fluorescente cuja emissão de luz é lida pelo fluorímetro do equipamento. A intensidade de leitura é proporcional à concentração de ferritina capturada, tornando o método quantitativo.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o Teste t de Student para comparar os valores obtidos nos dois métodos. Foram realizadas análises de regressão e correlação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O coeficiente de correlação obtido entre os dois métodos foi $r^2=0,94$. No entanto, a média dos resultados obtidos no ensaio imunoenzimático com micropartículas foi significativamente maior do que aquela encontrada no método de nefelometria ($p<0.001$) (Tabela 1).

A equação de regressão foi $y = 0,836.x + 1,172$, onde y é o resultado obtido pela nefelometria e x é o resultado obtido pelo método IMx ABBOTT.

TABELA 1 - Distribuição das médias e desvios-padrão dos métodos imunológicos automatizados.

MÉTODOS	Média (µg/L)	Desvio Padrão ±
Enzimaimunoensaio (A) IMx ABBOTT	37,52	34,27
Nefelometria (B) Behring N-latex-Ferritin	32,55	29,62
Diferença (A-B)	4,96	9,36

t calculado = 7,602

t crítico, 5%, ∞ = 1,960

p<0,0001

Os dois métodos são automatizados, o que diminui os erros técnicos e faz com que os resultados sejam mais reproduzíveis.

O uso de anticorpos monoclonais e policlonais de diferentes origens pode introduzir variáveis inerentes a estes anticorpos, devido a diferentes especificidades e afinidades para os epítomos da molécula da ferritina. O teste da Behring utiliza anticorpos policlonais anti-ferritina e o teste da Abbott utiliza anticorpos monoclonais de captura ligados à micropartículas, e conjugado com anticorpos policlonais ligados a enzima para a revelação das moléculas capturadas.

Nos dois testes, a leitura final é detectada por equipamento automatizado e a leitura do sinal é convertida para concentração, através de uma curva de calibração.

A escolha dos calibradores pode ser outra fonte de variabilidade entre os resultados obtidos por um ou outro método.

A nefelometria que é um método quantitativo de elevada precisão e reprodutibilidade, é utilizada para determinação de várias proteínas séricas. O teste Abbott, embora classificado como imunoenzimático pelo fabricante, representa melhor a técnica fluorimétrica, que tem ampla aplicação em testes quantitativos (TURGEON, 1996).

De modo geral, os métodos que utilizam conjugados com posterior emissão de luz, tais como, ocorre na fluorometria, são mais sensíveis do que aqueles que formam imunocomplexos. Isto pode explicar os altos valores encontrados no teste ABBOTT. Por outro lado, o uso de anticorpos monoclonais em ambos os testes aumentam a especificidade.

Os fabricantes (ABBOTT e BEHRING) sugerem que cada laboratório estabeleça seus valores de referências para a população que atende.

A escolha de um ou outro método dependerá de vários fatores, tais como, o custo, simplicidade e disponibilidade de equipamentos.

CONCLUSÃO

A despeito da elevada correlação obtida, os resultados confirmam a importância de se especificar a metodologia aplicada nos laudos dos resultados, principalmente no acompanhamento do tratamento do paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRICHTON, .R. - Ferritin: structure, synthesis and function. **N. England J. Med.** 1971: **24**: 1413- 22.

DORNER, M.H.; ABEL, U.; FRITZE, D.; MANKE, H.G.; DRINGS, P. - Serum ferritin in relation to the course of Hodgkin's Disease. **Cancer** 1983: **52**: 2308-12.

FAIRBANKS, V.F. & BEUTLER, E. Iron deficiency. In: BEUTLER, E; LICHTMAN, M.A; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J. **Willians Hematology**. 5. ed. New York, McGraw Hill, 1995. p.490-510.

HERSKO, C.; KONIJN, A.M.; LORIA, A. - Serum ferritin and mean corpuscular volume measurement in the diagnosis of β - thalassaemia minor and iron deficiency. **Acta Haemat.**1979: **62**: 236-39.

JACOBS, A.; MILLER, F.; WORWOOD, M.; BEAMISH, M.R.; WARDROP, C.A. - Ferritin in the serum of normal subjects and atients with iron deficiency and iron overload. **Br. Med. J.** 1972: **4**: 206-8.

KRAUSE, J.R. & STOLC, V. - Serum ferritin and bone marrow iron stores. I. Correlation with absence of iron biopsy specimens. **Am. J. Clin. Pathol.** 1979: **72**: 817-20.

MARCUS, D. M. & ZINBERG, N. - Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: results in normal individuals and patients with breast cancer. **J. Nati. Cancer Inst.** 1975: **55**: 791-5.

MAXIN, P. E. & VELTRI, R.W. - Serum ferritin as a tumor marker in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer** 1986: **57**: 305-11.

SCHETTINI, F.; MAUTONE, A.; CAVALLO, L.; ALTOMARE, M.; MONTAGNA, O.; DELL'EDERA, L. - Delayed decrease in serum ferritin in polytransfused children with thalassemia major after continuous subcutaneous infusions of desferrioxamine. **Acta Haemat.** 1981: **66**: 96-101.

TURGEON, M. L. - Labelling techniques in immunoassay. automated procedures. In: TURGEON, M.L. - **Immunology & Serology in laboratory medicine**. 2 nd ed., Mosby-Year Book, Inc., St Luis, 1996. p.151-164. 496p.

WALTERS, G.O.; MILLER, F.M.; WORWOOD, M. - Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. **J. Clin. Path.** 1973: **26**: 770- 2.

ESTUDO MORFOLÓGICO DO HEMOGRAMA: VARIAÇÃO INTER-OBSERVADOR EM UM PAINEL DE CASOS

GUERRA-SHINOHARA, Elvira Maria* & SANTOS, Hosana Gonçalves**

* Pesquisador Científico da Seção de Hematologia, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

** Estagiária da Seção de Hematologia, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

RESUMO

O controle de qualidade é um conjunto de normas e procedimentos que visa minimizar os erros, tendo como fim garantir que o resultado dos exames reflita o mais próximo possível as condições laboratoriais da amostra, dando ao clínico subsídios para as intervenções necessárias. A proposta deste trabalho foi realizar um estudo de variação inter-observador a partir da análise da morfologia de oito esfregaços sanguíneos por dez examinadores diferentes. Não foram oferecidos os dados da hematimetria, da contagem dos leucócitos totais e das plaquetas, sendo solicitado aos dez examinadores que fizessem a análise da série vermelha, série leucocitária e das plaquetas. No contato com o examinador, foi exposto o objetivo do trabalho, havendo concordância em participar, foi sorteado um número de 1 a 10, sendo que somente o examinador saberia o seu número para posterior conferência de desempenho. Dois examinadores apresentaram tendência a descrever mais bastonetes e células brancas jovens do que os demais, 3 examinadores não observaram a presença de granulações tóxicas nos leucócitos em dois esfregaços sanguíneos. Dos dez examinadores, cinco não observaram a presença de eritroblastos em um esfregaço sanguíneo, sendo que dois não a observaram em dois esfregaços. A avaliação da série vermelha mostrou que existe grande dificuldade em descrever o tamanho do eritrócito (macrocitose e microcitose) e 6 observadores não observaram ponteados basófilos em dois esfregaços sanguíneos. A dificuldade maior residiu no reconhecimento da policromasia. Conclui-se que o modelo de pequenos painéis já oferece evidência de tendenciosidade de análise e que há necessidade de estágios supervisionados desde a graduação até como reciclagem do pessoal que atua na prática diagnóstica, padronização das técnicas de execução e coloração dos esfregaços, e por fim propor situações que motivem todos a participar do controle de qualidade.

Palavras chaves: variação inter-observador, morfologia, hemograma.

SUMMARY

Quality control is a set of rules and procedures aiming at minimizing errors in order to assure that examination results reflect, as accurately as possible, the laboratorial conditions of the sample, thus giving the physician subsidies for the necessary interventions. This paper proposed to perform a study on inter-observer variation, through the morphological analysis of eight blood smears made by ten different examiners. Data on hematimetry and on total leukocyte and platelets counting were not provided to the examiners, who were all requested to analyse the red series, the leukocitary series and the platelets. When the purpose of the study was exposed to the examiners and all of them agreed on participating, a number from 1 to 10 was randomly assigned to each of them (this number was only known by the assigned examiner) for a further performance conference. Two examiners tended to described more bastonets and young white cells than the others. Three examiners did not observe the presence of toxic granulation in leukocytes in two of the blood smears. Five out of ten did not note the presence of erithroblasts in one of the blood smear and two of them failed in observing it in two blood smears. The assessment of the red series showed a great difficulty in describing the erythrocyte size (macrocytosis and microcytosis). Six observers did not mention punctate basophilia in two of the smears. The great difficulty was to note the polychromasia. The paper concludes that the small pannels model already offers evidences of biased analysis and that supervised training is needed not only for those in graduation courses but also, as recycling training, for the personnel involved in diagnosis practice, and in standardization of performance and dyeing techniques. Finally the authors emphasize the need for creating situations that motivate all to participate on quality control.

Key words: inter-observer variation, morphology, hemogram.

INTRODUÇÃO

O controle de qualidade é um conjunto de normas e ações que visa minimizar os erros, tendo como fim comum garantir ao paciente que o resultado do seu exame reflita o mais próximo possível as condições laboratoriais em que se encontra, dando ao clínico subsídios para o tratamento. A análise morfológica do hemograma depende do observador ao microscópio no que se refere ao conhecimento teórico e prático das células do sangue em pacientes doentes e não doentes, da capacidade de discernir o patológico do fisiológico, descrevendo graus de alterações em discreta, moderada e acentuada e da persistência em

procurar analisar todo o esfregaço e não apenas os campos correspondentes às 100 células da contagem diferencial dos leucócitos.

Existem dois tipos de controle de qualidade: o interno e o externo. O controle de qualidade interno é desenvolvido pelo laboratório através de normas e protocolos já estabelecidos, que visam evitar erros, dar condições de reciclagem do pessoal técnico, padronização e monitorização das técnicas utilizadas, utilização de padrões comerciais de boa qualidade, manutenção dos equipamentos, etc. O controle de qualidade externo é realizado normalmente por Instituições (Sociedades, Associações, etc.) que através de protocolos bem estabelecidos submetem amostras de sangue, soros, esfregaços sanguíneos a diversos laboratórios para que executem os exames e encaminhem os resultados de volta a Instituição para análise de desempenho. A proposta deste estudo foi realizar um estudo de variação inter-observador a partir da análise da morfologia de oito esfregaços sanguíneos por dez examinadores diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Foram selecionados oito hemogramas dos trabalhos de pesquisa da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

METODOLOGIA

Foi solicitado à 10 examinadores, de nível superior com mínimo de dois anos de experiência em análise morfológica do hemograma, que fizessem a análise dos mesmos oito esfregaços sanguíneos. Não havendo troca de informações entre os examinadores.

As amostras de sangue destes oito casos foram processadas em contador eletrônico de células modelo Coulter T890 e os esfregaços sanguíneos foram corados com Leishman.

No contato com o examinador foi exposto o objetivo do trabalho. Havendo a concordância em sua participação, foi sorteado um número de 1 a 10, sendo que somente o examinador saberia o seu número, para posterior conferência de desempenho. Na ocasião, recebeu também um envelope contendo os esfregaços sanguíneos e na instrução para a análise dos esfregaços e foi solicitado que a análise deveria ser individual e sem consulta a qualquer outra pessoa.

A instrução era a seguinte:

Prezado colega

Estamos enviando 8 esfregaços para a análise da série vermelha, série branca e plaquetas. Quanto as alterações morfológicas dos eritrócitos e leucócitos, solicitamos que relate dando cruzes para discreta (+), moderada (++) e acentuada (+++).

Ao final, coloque o resultado de cada esfregaço identificados de 1 a 8, dentro do envelope e identifique por fora do envelope com o número sorteado.

Depois da análise dos esfregaços, o envelope com a resposta foi colocado dentro de outro envelope maior aonde foram depositados todas as análises dos dez profissionais. Foi tomado o cuidado de não identificar o número do profissional nem o Serviço a qual pertencia.

Os resultados referentes as contagens de eritrócitos (He), dosagem de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de leucócitos e contagem de plaquetas não foram fornecidas aos examinadores.

CRITÉRIO DE ANÁLISE

A análise das respostas com a abertura do envelope só foi feita após o recebimento das dez análises.

Para se obter os valores de referência, os mesmos oitos esfregaços foram submetidos à quatro profissionais com ampla experiência em hematologia. Foram determinadas as médias e desvios-padrão e posteriormente calculado o intervalo de confiança de 95% (média $\pm$ 2 dp).

RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados os valores hematimétricos dos casos de 1 a 8 obtidos através de contador eletrônico semi-automático de células marca Coulter, modelo T890.

Tabela 1 - Distribuição dos valores hematimétricos dos oitos esfregaços sanguíneos analisados.

esfregaços	He x 10 ⁶ /mm ³	Hb g%	Ht %	VCM fL	HCM pg	CHCM %	Leucócitos x 10 ³ /mm ³	Plaquetas x 10 ³ /mm ³
1	2,70	9,0	26	98	33	34	4,1	187
2	3,28	12,0	36	109	36	33	11,1	424
3	2,64	10,6	31	116	40	35	16,0	337
4	3,55	11,0	32	91	31	34	4,4	265
5	4,41	13,9	42	95	32	33	7,4	270
6	3,92	11,4	31	80	29	36	19,0	433
7	3,74	11,0	34	90	29	33	13,4	967
8	4,91	15,6	44	90	32	35	8,4	238

Devido ao número e tamanho excessivo das tabelas correspondentes aos oito casos, só serão apresentados na íntegra os resultados dos casos 1 e 6, correspondentes as tabelas 2 e 3, respectivamente.

Os valores da fórmula leucocitária relativa discordantes dos valores de referência são apresentados com padrão hachuriado nas tabelas de 2 e 3.

Nas tabela 2 são apresentados os resultados das morfologias da série vermelha, série branca e análise qualitativa do número de plaquetas do caso 1. Tres dos dez examinadores não observaram a presença de eritroblastos no esfregaço sanguíneo analisado.

Na tabela 3 são apresentados os resultados das morfologias do caso 6. Neste caso há a presença de leucocitose (19.000 leucócitos/ mm^3 de sangue), cinco dos dez observadores relataram frequências de 6 a 11% de eosinófilos, quando os valores encontrados para os demais foram de 38,2 a 44,8%.

DISCUSSÃO

Na análise dos resultados da contagem diferencial dos esfregaços, observamos que o examinador 7 teve os resultados de sua análise discordantes em 4 esfregaços. Os examinadores 6 e 9 discordaram em 3 esfregaços, e os examinadores 8 e 10 discordaram em 2 esfregaços.

Os examinadores 7 e 9 apresentaram tendência a descrever mais bastonetes e células brancas jovens do que os demais, o que pode ser observado nos casos 1, 3 e 8.

Os examinadores 3, 6 e 8 não observaram a presença de granulações tóxicas nos leucócitos em dois esfregaços sanguíneos.

Dentre as discordâncias sobre a série branca, a que mais surpreendeu foi o não relato de eosinofilia pelos examinadores 6, 7, 8, 9, 10 no caso 6, tabela 3, quando foi descrito valores relativos de 6 a 11 eosinófilos e neste caso havia uma eosinofilia de 38,2 a 44,8%.

Atualmente a contagem diferencial dos leucócitos pode ser feita em contadores eletrônicos, que utilizam em geral, a citometria de fluxo e emissão de feixes de laser para identificação dos leucócitos segundo as características físico-químicas da célula.

A contagem diferencial efetuada em contadores eletrônicos apresenta a vantagem de contar cerca de 10.000 células, diferenciando da contagem manual que contam apenas 100 células. As estimativas de reprodutibilidade de uma contagem com limite de confiança 95%, depende da frequência da célula na fórmula leucocitária e do número de células contadas no esfregaço sanguíneo. Ou seja, em uma contagem onde foi observado 6 eosinófilos, numa segunda contagem diferencial se forem contados 100 células o observador pode encontrar de 2 a 13 eosinófilos, se contar 200 células o intervalo passa a ser de 3 a 11, se contar 1000 células o intervalo é de 4 a 8, e nos contadores eletrônicos com contagens de 10.000 células o intervalo é 5,5 a 6,5 (BAIN, 1997).

Segundo BAIN (1997) a fórmula leucocitária, assim como todos os exames de laboratório, está sujeita a variação técnica e estatística. As contagens diferenciais ao microscópio são satisfatórias quanto à identificação celular, mas pouco reprodutíveis, ao passo que as contagens automatizadas são muito reprodutíveis, mas, algumas vezes, pouco exatas.

A inexatidão dos resultados obtidos na contagem diferencial ocorre devido a má distribuição das células no esfregaço e também devido a erros de identificação das células. Estes erros por sua vez, podem ser decorrentes da má qualidade do esfregaço, da coloração empregada ou do treinamento deficiente do profissional.

Os diferentes tipos de leucócitos não se distribuem uniformemente sobre a lâmina. A cauda do esfregaço contém mais neutrófilos e menos linfócitos, enquanto que os monócitos são distribuídos em todo o seu comprimento

(TALSTAD, 1981). Quando há células grandes, tais como as células imaturas (blastos, promielócitos, e mielócitos), elas se acumulam mais nas bordas do esfregaço do que na parte central, e mais distalmente em relação aos linfócitos, basófilos, neutrófilos e metamielócitos (DAVIDSON, 1958).

Além da distribuição irregular dos leucócitos no esfregaço sanguíneo, o uso de lâminas extensoras com bordas irregulares e a confecção de esfregaços sanguíneos muito finos podem agravar esta má distribuição (BAIN, 1997)

Para compensar a má distribuição tem sido sugerido vários métodos para o exame do esfregaço que são os seguintes: (a) ao longo da distensão, este método compensa a má distribuição entre o corpo e a cauda do esfregaço, mas não no centro e a borda; (b) em ameia, tende fazer o inverso do método ao longo da distensão, pois nesse caso a contagem de 100 células não cobrirá uma parte significativa do comprimento do esfregaço; (c) método de ameia modificado, tenta suprir a má distribuição ao longo e centro do esfregaço. No método de ameia modificado, recomenda-se contar as células em dois campos paralelos a borda, depois quatro campos em ângulo reto as bordas (para o meio do esfregaço, após dois campos paralelos a bordas, quatro campos em ângulo reto indo para a borda, e assim em seguinte (BAIN, 1997).

Em relação a série vermelha, os examinadores 3, 4, 5, 6 e 9 não observaram a presença de eritroblastos em um esfregaço sanguíneo (caso 7), sendo que os examinadores 4 e 6 não a observaram em dois esfregaços (caso 1 e 7). Há a possibilidade de desconhecimento da morfologia dos precursores de série vermelha na medula óssea. Existiu também grande dificuldade no reconhecimento da policromasia. Sabendo que a presença de policromasia é um sinal de aumento da eritropoese, e que nas anemias hemolíticas há um aumento da destruição dos eritrócitos. O não relato desta alteração morfológica faz com que o clínico deixe de solicitar exames específicos para seu diagnóstico.

Através da avaliação do tamanho dos eritrócitos, observamos que existe grande dificuldade em descrever o tamanho, ou seja, se há macrocitose ou microcitose. Quando ocorreu a presença de anisocitose com as duas alterações, houve grande discordâncias entre os resultados. Os contadores eletrônicos

fornecem o RDW (“red cell distribution width”, amplitude de distribuição dos eritrócitos) que é um índice de variação do tamanho dos eritrócitos, os valores de referência para o Coulter S Plus e Technicon H2 são respectivamente, 9,9 a 15,5 e 11,6 a 13,9, para um número de amostra de 200 (BAIN, 1997). Valores superiores aos recomendados como referência evidenciam a presença de anisocitose, sendo que no caso da dupla população a curva de distribuição dos eritrócitos é de grande valia por que demonstra dois picos correspondentes a dupla população eritrocitária presente, onde se poderia obter valores diferentes de VCM para cada uma destas populações.

Além das alterações morfológicas do glóbulo vermelho relativas ao tamanho, cor e forma, a visualização de inclusões citoplasmáticas (ponteados basófilos, corpúsculos de Howell Jolly, etc.), depende do conhecimento prévio do observador e da persistência ao examinar o esfregaço. Seis observadores (3, 5, 6, 7, 8 e 10) não relataram ponteados basófilos em dois esfregaços sanguíneos (Tabelas 2). A presença de ponteados basófilos, junto com a presença de microcitose e policromasia são alterações morfológicas encontradas em casos de β -talassemia (LEITE et al, 1993).

As análises das plaquetas mostraram maior concordância, no entanto no caso 7 onde há um aumento do número de plaquetas (967.000 plaquetas/ mm^3 de sangue) o que foi relatado por 9 dos 10 examinadores.

A utilização de vários esfregaços para a avaliação inter-observador mostrou-se útil, pois é possível observar as tendências e as dificuldades de diferenciação das células de cada examinador, o que não seria observado com o uso de apenas um esfregaço sanguíneo.

Os dados encontrados reforçam a necessidade das Universidades formarem um profissional com conhecimentos básicos das células sanguíneas do sangue periférico e de medula óssea, e indicam necessidade de estágios supervisionados como reciclagem do pessoal que atua na prática diagnóstica.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o modelo de pequenos painéis já oferece evidência de tendenciosidade de análise de padrões morfológicos em hemogramas. Sugere-se que, a partir dos desvios de análise, sejam oferecidos de estágios supervisionados de reciclagem do pessoal que atua na prática diagnóstica, visando à padronização das técnicas de execução e coloração, como parte de um programa continuado de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIN, B.J. In: **Células sanguíneas: um guia prático.** ; trad. Walkyria M.F. Settineri e Célia Beatriz Fischmann. 2. ed. - Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 334 p.
- DAVIDSON, E. - The distribution of cells in peripheral blood smears. **J Clin Pathol** 1958; 11: 410-11.
- ENGLAND, J.M.; BAIN, B.J. - Total and differential leucocyte count. **Br J Haematol** 1976; 33: 1-7.
- LEITE, A.A.; ANGELI, M.A.R.; LONGOBARDI, O.; MOREIRA, H.W. β -talassemia e ponteados basófilos. Anais XIV Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia, 1993, Curitiba, Pr. p.299. (Resumo)
- LEWIS, S.M. - The WHO International External Quality Assessment Scheme for haematology. **Bulletin of the World Health Organization**, **66** (3): 283 - 290, 1983.

RÜMKE, C.L - Variability of results in differential cell counts on blood smears.
Triangle 1960; 4: 154-7.

TALSTAD, I. - Problems in microscopic and automatic cell differentiation
of blood and cell suspensions. **Scand J. Haematol** 1981: **26**: 398-406.

ESTUDO RETROSPECTIVO DA INCIDÊNCIA DE VULVOVAGINITES, CERVICITES E NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS EM MULHERES ATENDIDAS PELO SERVIÇO DE PREVENÇÃO AO CÂNCER GINECOLÓGICO E DE MAMA NO MUNICÍPIO DE ARACATI-CE

Incidence of vulvovaginitis, cervicitis and cervical intraepithelial neoplasia in women evaluated in a center for prevention of gynecologic and mammary cancer in the municipality of Aracati, Ceara: a retrospective study

F^{ca}Janaina Soares Rocha & Geanne Matos A. Cunha*

RESUMO- As vulvovaginites e cervicites são achados de alta frequência na clínica ginecológica e obstétrica, embora não constituam na maioria das vezes patologias graves, são responsáveis por constantes queixas de desconforto na mulher. Neste trabalho realizamos um estudo epidemiológico das vulvovaginites, cervicites e neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) em 2096 mulheres que foram atendidas pelo Serviço de Ginecologia do Hospital Municipal de Aracati no período de janeiro a dezembro de 1996. O estudo foi feito a partir da consulta de laudos citopatológicos avaliados por equipe especializada do Instituto de Prevenção de Câncer do Estado do Ceará (IPCC), através do qual constatamos que a incidência de vulvovaginites e cervicites foi bastante elevada (88,78%), enquanto que a de NIC foi na ordem de 0,72%. Esfregaços atróficos (3,82%), citolíticos (3,39%) e purulentos (3,29%) caracterizaram os demais tipos encontrados. Dos 2976 esfregaços cérvico-vaginais provenientes do município de Aracati avaliados com relação a frequência dos microagentes observamos os seguintes casos: 1101 (37%) flora mista, 630 (21,17%) bacilos de Döderlein, 512 (17,2%) *Gardnerella vaginalis*, 364 (12,23%) cocóides, 95 (3,19%) *Trichomonas vaginalis*, 71 (2,39%) fungos, 45 (1,51%) *Trichomonas* associada a cocóides, 31 (1,04%) *Gardnerella* associada a *Trichomonas*, 09 (0,3%) HPV, 06 (0,2%) *Chlamydia trachomatis*, 04 (0,13%) *Gardnerella* associada a fungos, 01 (0,04%) *Mobiluncus* e 107 (3,6%) corresponderam as vaginites atróficas. Conclui-se que apesar da alta incidência de vulvovaginites na população estudada, o baixo índice de NIC deva-se ao trabalho preventivo que tem sido desenvolvido nesta região.

ABSTRACT- Vulvovaginitis and cervicitis are commonly seen clinical conditions in gynecology and obstetric clinics. While they usually do not cause serious pathology, they frequently produce significant discomfort. An epidemiological study of vulvovaginitis, cervicitis and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) was carried out among 2096 women who attend the gynecology Service of the Municipal Hospital, Aracati, Ceará, between January and December, 1996. A review of all cytopathology reports of the Institute for Cancer Prevention of Ceara State (IPCC) demonstrated a high rate of vulvovaginitis and cervicitis (88,78%) but a low rate of CIN (0,72%). Microscopic examination of vaginal smears showed atrophy (3,82%), cytolysis (3,39%) and purulence (3,29%). The frequency of microorganisms identified in 2096 smears was: mixed flora, 1101 (37%), Doederlein bacilli, 630 (21,17%), *Gardenerella vaginalis*, 512 (17,2%), cocci, 364 (12,23%), *Trichomonas vaginalis*, 95 (3,19%), yeast, 71 (2,39%), *T.vaginalis* and cocci, 45 (1,51%),

Gardnerella and Trichomonas, 31(1,04%), HPV, 09(0,3%), *Chlamydia trachomatis*, 0690,2%), Gardnerella and yeast, 04(0,13%), Mobiluncus, 01(0,04%). In light of the high incidence of vulvovaginitis in this population, the low index incidence of CIN may be result of preventive measures that have been adopted in this area.

KEY WORDS- Intraepithelial cervical neoplasia, vulvovaginitis, cervicitis, incidence

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

INTRODUÇÃO

A denominação vulvovaginites engloba todas as manifestações inflamatórias e/ou infecciosas do Trato Genital Inferior (TGI).

Os microagentes mais frequentemente correlacionados com as vaginites infecciosas, consideradas específicas são *Cândida sp*, *Trichomonas vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae*, portanto a descarga vaginal que não é causada por tais microrganismos tem sido determinadas como vaginites inespecíficas, atualmente designada de vaginose bacterianas.

A sintomatologia das patologias ginecológicas, infecciosa e inflamatória, assemelha-se razoavelmente, independentemente de suas causas. A queixa mais comum é a alteração da secreção vaginal, que aumenta em quantidade e por vezes demonstra odor forte e proeminente, portanto a presença de odor e prurido constituem na maioria dos casos os processos inflamatórios. Sintomas uretrais podem indicar processos infecciosos que atingem tanto o trato genital como o urinário baixo, como nos casos de tricomoníase e gonorréia.

A inspeção especular da mucosa vaginal é macroscopicamente normal. Quando presentes sinais inflamatórios, estes compreendem rubor, calor e dor que nem sempre estão relacionados com fenômenos infecciosos, já que fatores externos (uso de duchas, contraceptivos orais, dispositivos intra-uterinos, coito), podem também provocá-los.

Para analisarmos tais alterações podemos realizar o exame à fresco do conteúdo vaginal, através do método de Gram ou Papanicolaou, que são os mais comuns. Desta modo, podemos identificar células vaginais, cervicais, leucócitos, eritrócitos, microrganismos distintos, espermatozóides, além de determinarmos o tipo etiológico predominante e sua relação com as células vaginais.

Nos esfregaços vaginais, todas as células superficiais, intermediárias e profundas originadas de um epitélio hígido são muito semelhantes entre si. As variações de afinidade tintorial, espessura e morfologia, citoplasmática e nucleares, são mínimas quando comparadas entre elementos da mesma camada. Nos epitélios atípicos, entretanto, estes fenômenos não se observam.

Segundo Focchi & cols (1987), não se conhece ainda com exatidão os fatores que desencadeiam a neoplasia cervical, considera-se que o aparecimento da lesão ocorra devido a substituição do epitélio cilíndrico por epitélio escamoso estratificado. Este processo se inicia através de uma metaplasia incipiente ou imatura sob o estímulo do baixo pH da vagina. A metaplasia, por sua vez, pode ser do tipo fisiológica ou atípica, de acordo com a presença ou não do agente mutagênico.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo consistiu de duas etapas: I- Consulta feita a 2096 laudos citopatológicos avaliados pelo laboratório de Citopatologia do IPCC, cuja colheita de material cérvico-vaginal tinha sido realizada no ambulatório de Ginecologia do Hospital Municipal de Aracati no período de janeiro a dezembro de 1996. Por meio deste levantamento foram analisados os diferentes tipos de esfregaços, classificando-os em esfregaços atróficos,

citolíticos, purulentos, inflamatórios e atípicos. O grau de inflamação variou de intensidade leve, moderada a acentuada. Os microrganismos causadores de vulvovaginites e cervicites foram divididos de acordo com a classificação adotada pela literatura consultada (9). II- Levantamento estatístico de 2976 laudos citológicos procedentes do hospital Municipal de Aracati e Centro de Saúde, ambos participam do sistema de prevenção ao câncer ginecológico e de mama realizado por este município. Através deste foi analisada a incidência total dos microagentes, isolados ou associados, presentes nos esfregaços vaginais normais, ou seja não atípicos.

No ambulatório de Ginecologia do HMA as amostras cérvico-vaginais foram obtidas a partir da colheita do material de fundo de saco posterior da vagina e raspado cervical, nos casos de rasteio de câncer e colheita tríplice obtendo-se a partir do material de fundo de saco, raspagem cervical e endocervical, e após a confecção dos esfregaços as lâminas eram fixadas em etanol a 95% e posteriormente coradas pelo método de Papanicolaou, de acordo com a técnica descrita no laboratório de Citopatologia do IPCC (14).

RESULTADOS

De um total de 2976 exames citopatológicos avaliados no IPCC com relação a frequência dos microagentes nos esfregaços cérvico-vaginais temos: 1101(37%) microbiota mista, 630(21,17%) bacilos de Döderlein, 512(17,2%) *Gardnerella vaginalis*, 364(12,23%) cocóides, 95(3,19%) *Trichomonas vaginalis*, 71(2,39%) fungos, 45(1,51%) *Trichomonas* associada a cocóides, 31(1,04%) *Gardnerella* associada a *Trichomonas*, 09(0,3%) HPV, 06(0,2%) *Chlamydia trachomatis*, 04(0,13%) *Gardnerella* associada a fungos, 01(0,04%) *Mobilluncus* e 107(3,6%) correspondente aos casos de vaginites atróficas, consideradas neste estudo como diagnóstico inconclusivo (Figura 1)

É importante salientar que dos 767 casos de vulvovaginites específicas, 512(66,75%) foram por *Gardnerella vaginalis*, 95(12,39%) foram por *Trichomonas vaginalis*, 71(9,26%) foram por fungos, 45(5,87%) foram por *Gardnerella* associada *Trichomonas*, 09(1,17%) foram por HPV e 04(0,52%) foram por *Gardnerella* associada a fungos (Figura 2)

Dos 2203 casos de vulvovaginites inespecíficas, 1101(49,98%) foi devido a presença de microbiota mista, 630(28,6%) devido aos bacilos de Döderlein, 364(16,52%) devido aos cocóides, 107(4,86%) corresponderam aos esfregaços atróficos e 01(0,04%) devido a bactérias pertencentes ao gênero *Mobilluncus* (Figura 3)

Seis pacientes apresentaram quadro de cervicite causado por *Chlamydia trachomatis*.

Dos 2096 esfregaços cérvico-vaginais corados por Papanicolaou, 1861(88,78%) eram do tipo inflamatório, 80(3,82%) eram atróficos, 71(3,39%) citolíticos e 69(3,29%) purulentos e 15(0,72%) representaram os esfregaços atípicos fortemente sugestivos de NIC (Figura 4)

Dos 1861 esfregaços vaginais tipo inflamatório, 879(47,23%) foram classificados como acentuado, 585(31,45%) como moderado e 397(21,34%) como leve, segundo o grau de intensidade do processo inflamatório observado (Figura 5).

Dos 26(0,92%) dos esfregaços atípicos, 11(42,31%) corresponderam as displasias provocadas por HPV, 08(30,37%) os casos de NIC I, 05(19,23%) os casos de NIC II e 02(7,69%) os casos de NIC III (Figura 6).

DISCUSSÃO

A grande incidência das vulvovaginites na população estudada confirma a importância desta patologia na prática ginecológica ambulatorial.

Através deste estudo pudemos constatar que aproximadamente 2/3 das mulheres submetidas ao exame ginecológico de prevenção apresentou um quadro de vulvovaginites de caráter inespecífico e não-infeccioso, predominando uma microbiota mista, do tipo saprófita. O caráter inespecífico refere-se ao fato de inexistir uma correlação entre o quadro clínico e o número de espécies bacterianas, isto é, verifica-se uma forma bacteriana predominante sem contudo ter sido expressa como uma forma de infecção(4)

Os lactobacilos aparecem em segundo lugar como causador das vulvovaginites inespecíficas, já que foram responsáveis por algum tipo de leucorréia nas mulheres analisadas, aparecendo por conta do aumento de resíduo vaginal fisiológico, capaz de exacerbar a quantidade destes bacilos(8).

A incidência de vulvovaginites específicas, tipo infecciosa, apesar de ter atingido um menor número de mulheres, cerca de 1/3 aproximadamente, merece destaque por conta da diversidade etiológica envolvida nos processos inflamatórios. A *Gardnerella vaginalis* foi a grande responsável por estas alterações. Vale ressaltar que apesar de alguns autores considerarem este microrganismo como causadores de vaginoses ou vaginites inespecíficas(7) não adotamos este conceito, em decorrência da sistematização das alterações celulares tipo inflamatórias observadas na mucosa da vagina e a proeminente proliferação bacteriana nos esfregaços, bem como a associação destes achados com a clínica do paciente.

O tipo de esfregaço predominante no estudo foi o inflamatório, ficando responsável por mais de 80% dos casos de modificações extracelulares no epitélio vaginal, condizentes com o tipo de microrganismo observado nos esfregaços. Aqueles considerados atróficos, em que não se pode detectar nenhum tipo de microrganismo ou características específicas do esfregaço, pode ter sido ocasionado nos casos de pacientes pós-menopausadas ou no pós-parto devido ao hipoestrogenismo que ocorre nestas situações, nas mulheres que fazem o uso prolongado de anticoncepcionais orais, bem como nos casos de atrofia epitelial senil e da infância (16).

Os esfregaços purulentos ocuparam o terceiro lugar de importância no estudo, foram observados sobretudo nos casos em que os cocos estavam proeminentemente distribuídos sobre o epitélio vaginal, provocando alterações celulares com destruição parcial ou total das células epiteliais escamadas e apresentando um número razoável de polimorfonucleares (16).

Os esfregaços atípicos, por sua vez, apresentaram baixo índice de frequência com relação aos demais tipos de esfregaço. Os processos displásicos causados por HPV foram

os responsáveis pela maioria das alterações citoplasmáticas e nucleares visualizadas nas células epiteliais, fato este demonstrado em outros trabalhos como sendo um dos fatores ligados ao aparecimento do carcinoma genital.(10)

CONCLUSÃO

Consideramos alta a incidência de vulvovaginites e cervicites na população estudada, temos a consciência que só através da divulgação em massa da importância da realização periódica dos exames ginecológicos de prevenção em nosso estado conseguiremos minimizar estas elevadas taxas, de forma que possamos detectar precocemente as alterações neoplásicas, intervindo em tempo hábil, para que estas não evoluam para lesões mais graves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Acceta, S.G.;Kaminsk J.;Ney D. & cols. Estudo retrospectivo da incidência de vulvovaginites na população da vila São José em Porto Alegre.*Revista HCPA*, 9(2): 88-89, 1989.
- 2-Alves,.A.L.L. Estudo epidemiológico das vulvovaginites, displasias e carcinoma do colo uterino na região docente assistencial do alto São Francisco e demais municípios assistidos pela Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais. *Rev. Med. MG*, 5(1): 2-5, 1995.
- 3-Araújo, C.L.& França, S.C. Consulta de Enfermagem Ginecológica: Eficácia do tratamento de rotina nas vulvovaginites.*Rev Bras Enf.*, 45(2/3): 116-121, 1992.
- 4-Bertini-Oliveira, A.M.; Comano, L. Semiologia das vulvovaginites e cervicites. *J. Bras. Ginec.*, 95(10): 441-449, 1985.
- 6-Fonseca, Â.M.; Pereyra, E.AG; Melo Guerra, DM & cols. Vulva e Papiloma Vírus Humano. *Temas BYK*. No 21, 1990.
- 7-Fonseca, N. M. Progressos em Patologia Cervical. *J. Bras. Ginec.*,90(3),1980.
- 8-Gusman, O. A; Asebey, E.R.H. Vulvovaginites inespecíficas infantis. *Ped.Mod*, 22(10): 353-354, 1987.
- 9-Hurd, J.K. Vaginitis. *Med. Clin. of North America*, 63(2): 423-432, 1979.
- 10-Nestarez, J.E; Mathias,L. Vulvovaginites II-Aspectos etiológicos e diagnósticos. *Femina*, 13(8): 691-694, 1985.

11-Nestarez, J.E.; Mathias,L. Vulvovaginites III-Vaginite Inespecífica. *Femina*, 13(9): 787-790, 1985.

12-Peixoto, S.; Tomioka, E.S.; Souza, A.Z. & cols. Aspectos clínicos, diagnósticos e conduta nas vulvovaginites e Doença Pélvica Inflamatória. *Rev. Ass. Med.*, 31(9/10): 165-172, 1985.

13-Riesgo, I.; Brow,N.H.; Blow, E.C. & cols. Ocorrência de patologias ginecológicas em ambulatório de ginecologia infanto-puberal: revisão de 415 consultas. *Saúde- Santa Maria*, 16(1/2): 93-100, 1990.

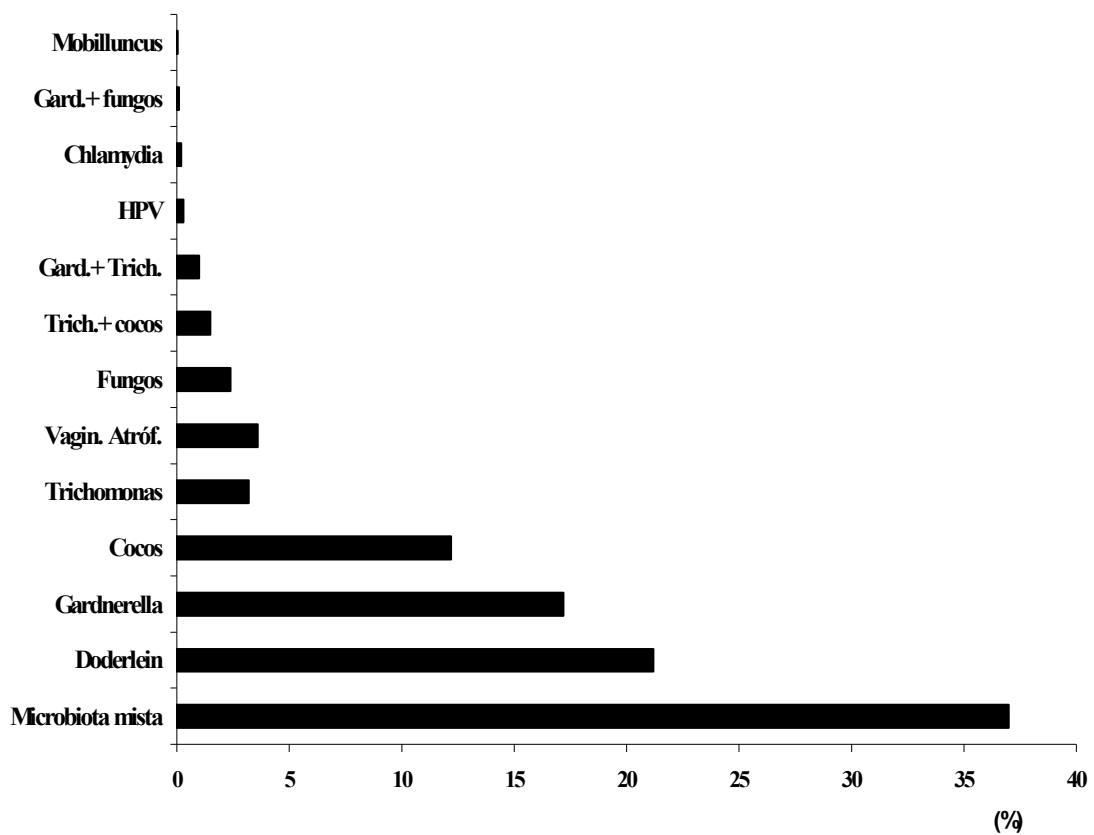
14-Sousa, M.C.B.; Henriques, C.A.& Couto, M.F. Avaliação dos hábitos higiênicos da menina e correlação com a presença de vulvovaginites. *Rev. Bras. Gin. Obst.*, 11(6): 114-117, 1989.

15-Suzuki, L.E.& Gonçalves, S.M.R. Neoplasia intraepitelial cervical: sua incidência no exame laboratorial de rotina. *Rev. Bras. Anal. Clin.*28(3): 119-121, 1996.

16-Temas Médicos BYK. vol. 2-15. Serviço de Citopatologia e Histopatologia do Centro de Diagnóstico Clínico Carlos Chagas, ICMS, SESMG

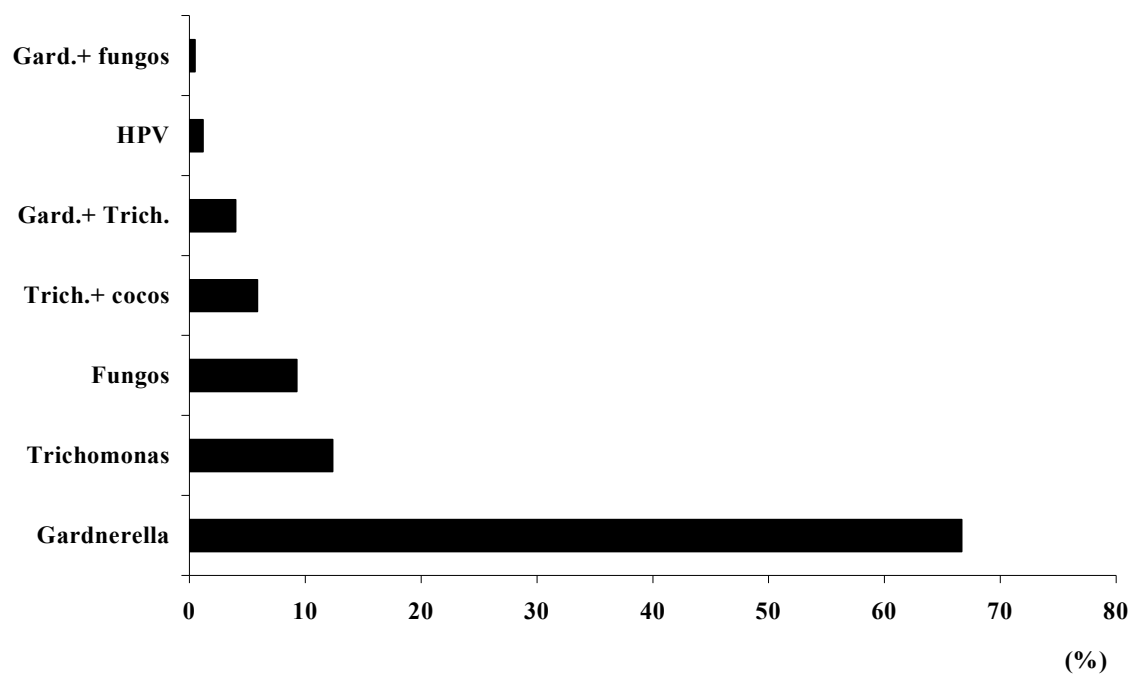
17-Tomioka, E.S.; Imakura, M.M.; Anzal, RY & cols. Como diagnosticar e tratar vulvovaginites. *Rev. Bras. Med.* 46: 119-128, 1989.

Frequência de Microrganismos nos esfregaços cérvico-vaginais



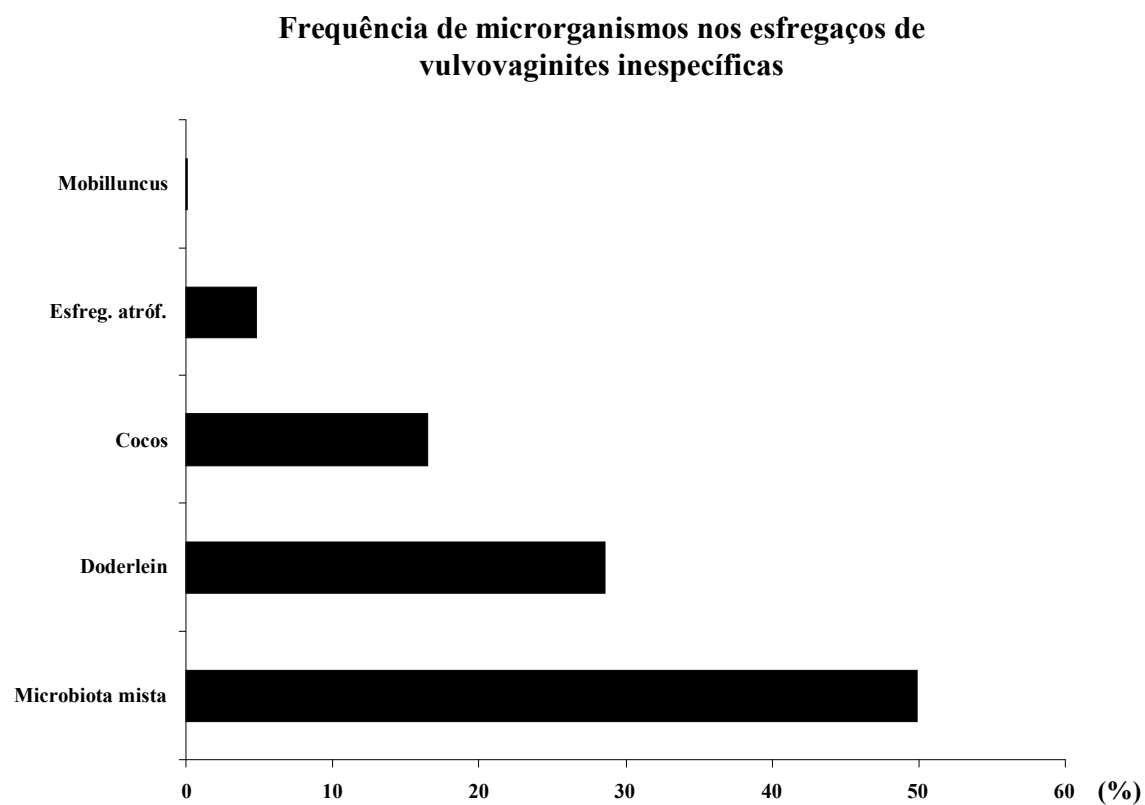
Número de casos- 2976
Figura 1

Frequência de microrganismos nos esfregaços de vulvovaginites específicas



Número de casos- 767

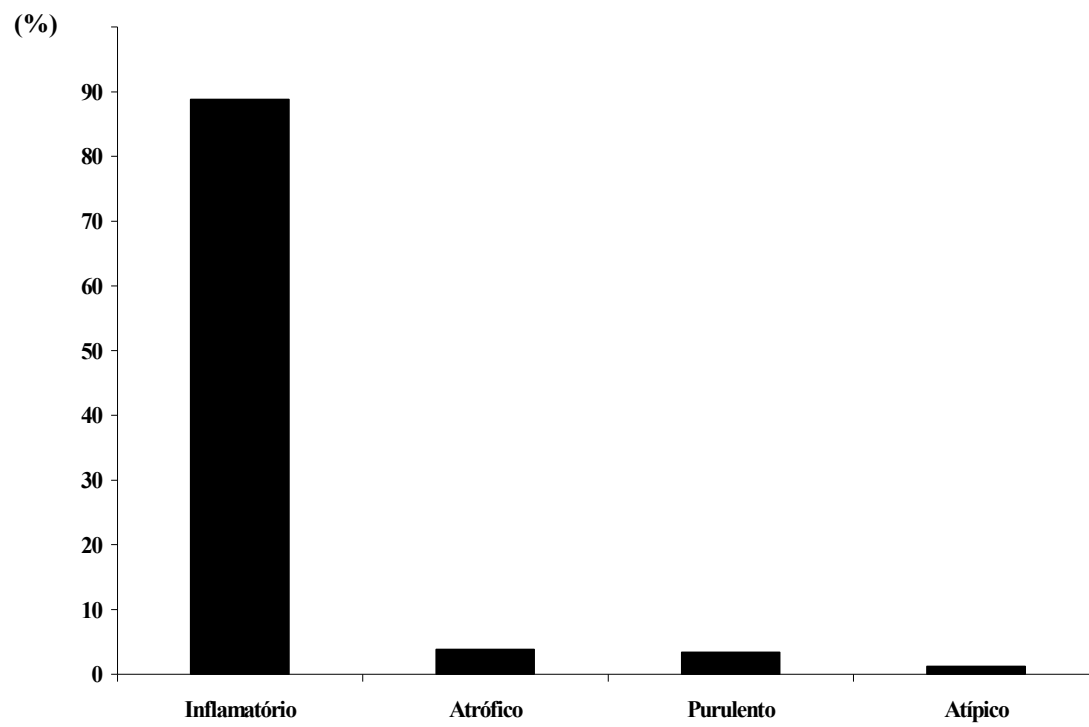
Figura 2



Número de casos- 2203

Figura 3

Classificação dos Esfregaços



Número de casos- 2096

Figura 4

Esfregaços Inflamatórios (Grau de Inflamação)

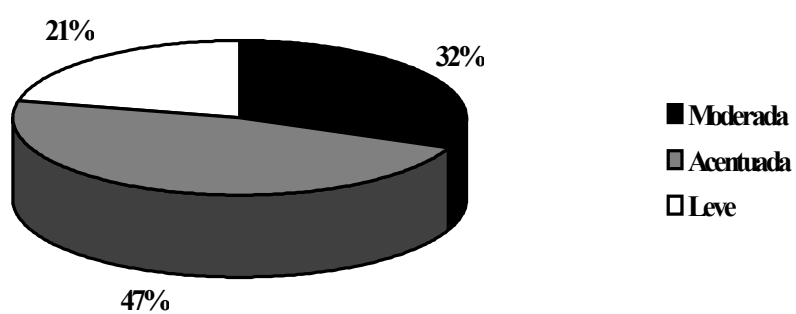


Figura 5

Incidência de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) nos esfregaços vaginais

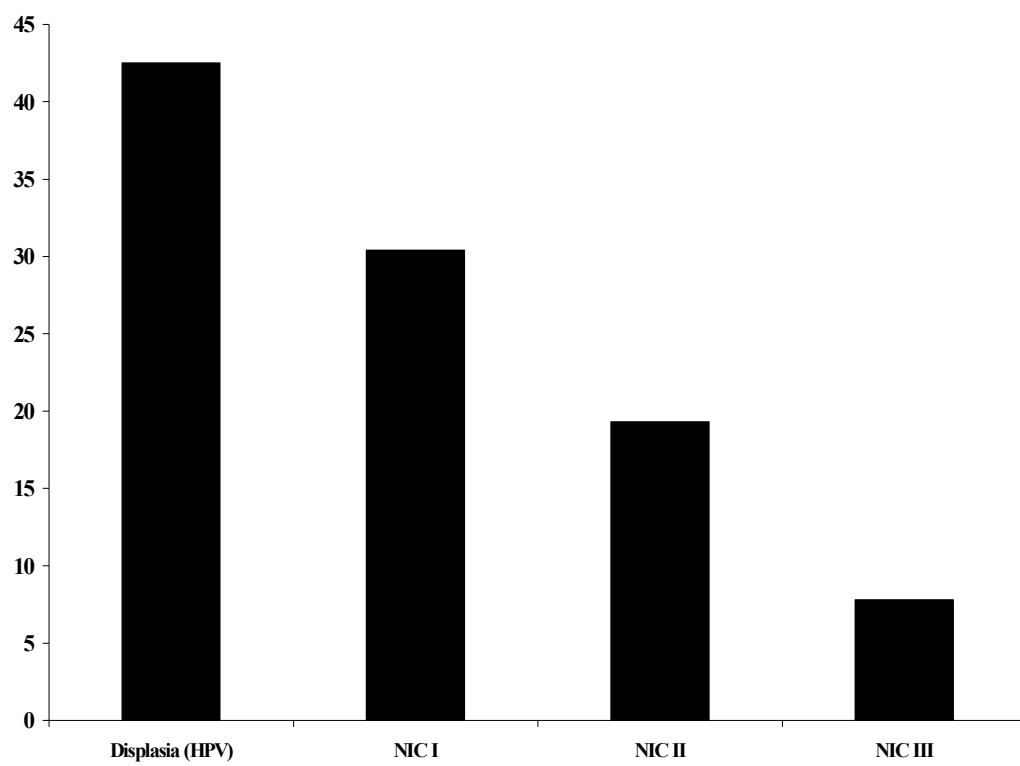


Figura 6

Infecções Hospitalares em Grandes Queimados da Área Pediátrica da Cidade do Hospital Geral da Cidade de Aracaju

Nosocomial infections in big burned of the pediatric area of the general hospital of Aracaju city

Maria Regina Pires Carneiro¹ e Marcélia Garcez Dória²

RESUMO - Uma avaliação da magnitude das infecções hospitalares em grandes queimados da área pediátrica do Hospital João Alves Filho foi realizada de novembro de 1996 a abril de 1997. Neste período foram analisados 74 casos de crianças com idades entre 0 e 12 anos, objetivando verificar a ocorrência de infecções hospitalares (IH), determinar os agentes etiológicos e respectivas sensibilidade e resistência a antimicrobianos. Uma busca aos prontuários forneceu informações sobre os antibióticos empregados como medidas profiláticas. Foi feita análise microbiológica das superfícies do ambiente. Dos 74 pacientes admitidos, 4 (5,4%) apresentaram 14 episódios de infecções nosocomiais (18,97%) causadas por: *Pseudomonas aeruginosa* (54,14%), *Staphylococcus aureus* (7,14%), *Cedecea lapagei* (7,14%), *Klebsiella pneumoniae* (7,14%), *Proteus mirabilis* (14,28%) e *Proteus vulgaris* (7,14%). O patógeno prevalente também nas superfícies, *Pseudomonas sp.*, apresentou sensibilidade a Imipenem (75%), Cefepime, Norfloxacin e Azetreonam (62,5% cada). Os dados indicaram o uso de profiláticos em 100% dos casos.

PALAVRAS-CHAVE: Infecções Hospitalares, queimados, microrganismos multiresistentes e *Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY - An evaluation of the nosocomial infections in a pediatric area of the João Alves Filho Hospital was accomplished in November of 1996 until April of 1997. In this period, 74 cases of children were analyzed with ages between 0 e 12 years, objectifying to verify the occurrence of nosocomial infections to find out the etiological agents, and respective sensibility and the antimicrobial resistance. A search to the handbook supplied information about the antibiotics used as prophylatic measured. It was made microbiological analysis of the surfaces of the ambient. Of the patients admitted, 4 (5,4%) had 14 episodes of nosocomial infections (18,97%), caused by: *Pseudomonas aeruginosa* (54,14%), *Staphylococcus aureus* (7,14%), *Cedecea lapagei* (7,14%), *Klebsiella pneumoniae* (7,14%), *Proteus mirabilis* (14,28%) e *Proteus vulgaris* (7,14%). The prevalent pathogen, *Pseudomonas sp.*, it present sensibility IPM (75%), ATM, NOR and CPM (62% each). The data indicated the profilatics use in 100% of the cases.

Key Words: Nosocomial infections, burneds, multiresistent microorganisms and *Pseudomonas aeruginosa*

INTRODUÇÃO

A partir da década de 70, as infecções hospitalares passaram a representar causa importante de morbi-mortalidade em diversos países devido ao aparecimento de grupos populacionais mais susceptíveis à infecção, uso exagerado de antibióticos, que deu origem a microrganismos multiresistentes, e aos efeitos adversos de procedimentos invasivos e tratamentos com imunossuppressores. Nas últimas décadas um melhor controle das infecções bacterianas se deu pelo emprego da terapia tópica, nutrição adequada e abordagem ostensiva da queimadura^(4,10,12).

No passado, a maioria das infecções hospitalares ou nosocomiais eram causadas por

estafilococos coagulase-positiva. Apesar das cepas destes microrganismos resistentes à oxacilina serem significativamente importantes, atualmente predominam bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, difíceis de controlar com antibióticos pois albergam fatores R, que são portadores de genes que determinam resistência, a qual se torna aumentada quando estes fatores se recombinam originando novos plasmídios. As cepas portadoras de fatores R formam parte da flora normal de pacientes e da equipe hospitalar, os quais passam a constituir um reservatório e, consequentemente, a cadeia de transmissão de organismos resistentes a antibióticos. Se as defesas do hospedeiro forem eficazes estas novas cepas não constituirão problemas^(11,13).

Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia da UNIT. Campus II
Av. Dr. José Thomás d'Ávila Nabuco, 300 - Farolândia — Aracaju — Sergipe — Brasil
CEP 49030-270 Fone: (079) 243-3333 FAX: (079) 243-3661

¹Professora de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UNIT

²Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas mod. Médica da UNIT

De acordo com o agente causal, o grande queimado pode ser vítima de queimaduras

térmicas, químicas, elétricas ou radioativas, sendo mais comum a queimadura térmica^(8,13).

A lesão térmica destrói a barreira natural da pele que representa uma proteção contra a invasão bacteriana. Esta barreira se constitui de componentes mecânicos (queratina), químicos (secreções digestivas e muco), imunitários (IgA secretora e tecido linfático associado às mucosas ou à pele) e biológicos (flora residente normal)^(3,13).

Os tecidos desvitalizados que se originam servem como meio de cultura para os microrganismos. Em sua quase totalidade, as queimaduras são colonizadas ou infectadas por microrganismos endógenos; a colonização se transforma em infecção caso ocorra em número igual ou superior a 10^5 por grama de tecido, estando acima da capacidade de controle das defesas anti-infecciosas locais. A infecção cutânea do paciente queimado é definida pela presença de exsudato purulento na lesão ou no enxerto, acompanhada ou não de septicemia. Se a supuração ocorrer 72 horas após a admissão, ela deverá ser classificada como hospitalar e, em caso contrário, como comunitária⁽¹³⁾.

Diversas alterações imunológicas surgem no paciente após a lesão térmica de grande área, facilitando o desenvolvimento da sepse. As queimaduras alteram as funções celulares que regulam e interconectam o sistema imune específico e o sistema inflamatório não específico. Assim, os eventos desencadeados pela injúria térmica levam a distúrbios metabólicos e celulares, com o aumento das prostaglandinas dos macrófago e da atividade da célula T supressora, a diminuição da ativação dos neutrófilos e da produção do complemento sérico, que resultam em efeitos adversos na resposta imune, com grande propensão à sepse e a morte⁽¹¹⁾.

As manifestações clínicas decorrem de fenômenos locais, como a liberação de exo e endotoxinas bacterianas e o hipermetabolismo em consequência da infecção. Os sinais mais frequentes são febre mantida, leucocitose com grande desvio para esquerda (aparecimento de formas jovens na circulação), taquicardia, taquipnéia, emagrecimento e eventualmente glicosúria⁽³⁾.

A profilaxia das supurações de queimaduras baseia-se em três princípios gerais: a. recuperação das defesas locais (debridamento, excisão cirúrgica, enxertia e cobertura); b. recuperação das defesas sistêmicas (correção das alterações respiratórias e circulatórias, suporte nutricional e imunização); c. redução da contaminação microbiana (aplicação tópica de antimicrobianos, antisepsia das mãos, técnica asséptica no atendimento ao paciente, diminuição da contaminação oral, descontaminação de artigos críticos e semi-críticos, controle da contaminação de germicidas, limpeza e desinfecção do ambiente)^(12,13).

A prevenção da infecção e o tratamento local nos pacientes queimados são princípios fundamentais para evitar que a queimadura superficial se torne profunda. A infecção pode acarretar destruição do epitélio, retardando a cura e tornando a queimadura mais profunda; uma vez instalada, não haverá pega de enxertia, com conseqüente prejuízos de hospitalização e pelo resultado estético^(7,13).

A finalidade do tratamento local de um paciente queimado é simples: manter o doente e a ferida em condições ótimas para o fechamento. Os métodos usados devem eliminar ou pelo menos reduzir a contaminação das áreas queimadas. Como regra, as bolhas devem ser deixadas intactas. A remoção destas expõe a derme desprotegida, podendo causar necrose celular secundária. Se o tamanho da bolha representa um problema no manuseio ou é uma causa de dor, as bolhas podem ser perfuradas, o plasma drenado e a derme-epiderme elevada deve ser deixada como curativo biológico^(12,13).

O método utilizado na prevenção e tratamento das infecções são: o asséptico, mesmo sendo praticamente impossível manter um paciente em ambiente estéril por várias semanas, controlando a infecção dos fômites e da equipe que atende ao paciente bem como o pessoal de serviços gerais; a administração de antibióticos, embora apresente problemas de especificidade, desenvolvimento de cepas resistentes e de tolerabilidade e, uso de antissépticos, que podem destruir o epitélio, inibir o crescimento celular e causar efeitos sistêmicos, se absorvidos⁽⁵⁾.

Um bom antisséptico deve ter os seguintes requisitos: ser um bom antimicrobiano tópico, ideal para banhos e antisepsia cutânea, importante no tratamento e prevenção de infecção no queimado; ter boa tolerância local; não ser alergênico; não ser absorvido; não ser inativado em presença de secreções sero-sanguinolentas⁽⁵⁾.

OBJETIVOS

Fornecer subsídios para o conhecimento da epidemiologia das infecções nosocomiais, em Aracaju.

Verificar a ocorrência de episódios de infecções hospitalares em grandes queimados na área pediátrica do Hospital Geral da Cidade de Aracaju, os respectivos agentes etiológicos bem determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de novembro de 1996 a abril de 1997 foram estudados 74 casos de crianças

com idades entre 0 e 12 anos, internas no Hospital João Alves Filho, Aracaju - SE. Realizou-se análise de prontuários, onde constavam dados pessoais do paciente (nome, idade e procedência), avaliação da queimadura (grau, local, agente causal, tempo decorrido desde o acidente até a hora do atendimento), procedimentos tomados pela equipe médica (medicamentos prescritos, necessidade de ato cirúrgico, exames laboratoriais realizados) e a resposta do organismo ao tratamento⁽⁶⁾.

Foram coletadas amostras de secreção superficial com gaze estéril rolando-se, sobre a superfície da lesão, um swab umedecido em solução estéril de cloreto de sódio a 0,85% que, em seguida, foi colocado em um tubo contendo meio Brain Heart Infusion (Oxoid), encaminhado ao laboratório, onde foi semeado em Agar Sangue (Zeissler) e Eosina Azul de Metileno (Biobrás); incubou-se a 35°C por 24 horas. As colônias desenvolvidas foram isoladas em Agar Nutriente (Biobrás), submetidas aos testes de identificação e de sensibilidade a antimicrobianos. Para a identificação de bastonetes Gram-negativos foram empregados os meios de Rugai (mod. por Pessoa e Silva) e o Bactry (Difco). Foram realizadas hemoculturas para detecção de infecção invasiva sistêmicas da queimaduras. O

mesmo procedimento foi utilizado nas amostras de superfícies.

A sensibilidade a antimicrobianos foi realizada através da técnica de difusão com discos de acordo com o método de Kirby – Bauer⁽²⁾; os discos (Cecon) empregados no teste relacionavam-se com os microrganismos pesquisados.

RESULTADOS

A partir dos dados colhidos elaborou-se a **TABELA I**, que nos permitiu avaliar a frequência dos antibióticos prescritos (**GRÁFICO I**) e de queimados por idade (**GRÁFICO II**). Observou-se, ainda, os casos de IH; agentes etiológicos e respectivas frequências (**GRÁFICO III**). Os seis microrganismos prevalentes foram: *Pseudomonas aeruginosa*, predominante também nas superfícies ambientais analisadas, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Cedecea lapagei* e *Klebsiella pneumoniae*.

Na **TABELA II** os antimicrobianos que apresentaram maior sensibilidade a *P. aeruginosa* foram representados em valores absolutos e relativos, podendo estes últimos serem observados no **GRÁFICO IV**.

TABELA I - PACIENTES OBSERVADOS DE NOV/96 A ABR/97

PACIENTE	IDADE	TOPOGRAFIA	T. interno	ANTIBIÓTICOS
DBN	1 a	Q. 2º grau / Mão D, do 1º ao 4º dedo, inclusive espaços interdigitais, punho e antebraço.	04	Cefalexina
VFS	2 a	Q. 2º grau / Tronco, MSD	05	Keflin
RG	10 a	Q. 2º grau infectada / Abdômen	07	Keflex
WSS	1 a	Q. 2º grau / Tronco anterior	02	Bezantacil
JVSS	2 a	Q. 3º grau / Pé D e E (região plantar)	05	Cefalexina
EGS	1 a	Q. 2º grau / Tronco anterior	06	Keflin
JSS	1 a	Q. 1º e 2º grau / Abdômen e coxa E	05	Keflin
PACIENTE	IDADE	TOPOGRAFIA	T. Interno	ANTIBIÓTICOS

JCVM	1 a	Q.1ºe 2º / Tronco anterior, MSE e mão E	01	Ampicilina
DAA	5 a	Q. 2º grau infectada / Tronco e MID	12	Keflin
AS	1 a	Q. 2º grau / Tronco anterior, punho E, e região mentoniana	06	Keflin, Garamicina, Tienam
JDO*	10 m	Q. 3ºgrau / Tórax ântero-superior e face	84	Keflin, Micostantin, Amicacina, Timetin, Garamicina
ACBR	2 a	Q. 2º grau / MID e MIE	05	Keflex
MAS	6 a	Q. 2º e 3º grau / Face e mão D	03	Keflex, Acefolexina
MBC	1 a	Q. 2º grau / Tórax anterior e pescoço, MSE e coxa E	11	Keflin
RBN	8 a	Q. 3º grau / MIE	16	Ampicilina
TSF	1 a	Q. 2º grau / Antebraço e mão	02	Keflex
TFS*	11 m	Q.1º e 2º grau / Tórax e face; MSD	11	Keflin
JCS	2 a	Q. 2º grau / Antebraço, mão D	05	Keflex
IS	12 a	Q. 2º e 3º grau / Tronco, MSD, MSE e face	24	Keflin, Glutamicina
ECS	11a	Q. 2º grau / Tronco posterior, períneo e coxas	15	Ampicilina, Keflex
EGS	12 a	Q. 2ºe 3º / MSE	05	Keflin
DBS	2 a	Q.1º e 2º grau / Tronco e genitália; antebraço D	09	Keflex
WS	11 m	Q. 1º e 2º grau / Tronco, pescoço e face	05	Keflex
JFSS	10 a	Q. / Pé E	02	Benzetacil
DSO	10 m	Q. 2º e 3º grau / Tronco, MSD, MSE e coxas	11	Keflin
IM	10 m	Q. 2º grau / Tronco posterior e períneo	04	Ampicilina
LSR	1 a	Q. / Pé D e E	03	Keflin
APS	10 a	Q. 1º e 2º grau / Abdômen inferior, genitália, MIE, ombro E e MSE	12	Ampicilina
CSS	6 a	Q. 1º e 3º grau / Face, abdômen e MID e MIE	02	Keflex
PACIENTE	IDADE	TOPOGRAFIA	T. Interno	ANTIBIÓTICOS
JGC	1 a	Q. Face, tórax, MSD	03	Ampicilina

DVS	1 a	Q. 2º e 3º grau / Mão E	09	Keflex
MAS	7 a	Q. 1º e 2º grau / Face e pescoço	02	Keflex
GSA	2 a	Q. 2º grau / Face e tronco	04	Keflex
RAM	2 a	Q. 2º grau / Tronco e MSE	10	Keflin
AS	12 a	Q. 2º grau / MSD	02	Keflin
JDS	1 a	Q. 1º e 2º grau / Tórax e mão E	05	Keflin
GMJ	1 a	Q. 1º e 2º grau / Tórax e MID	05	Keflin, Keflex
GSJ	6 a	Q. 2º grau / Tronco anterior, face, pescoço, genitália, MSD, MSE, MID, MIE, mãos D e E	25	Garamicina, Claforan, Cefalotina, Novamin
TSJ	1 a	Q. 1º e 2º grau / Face, dorso do tórax	04	Keflin, Keflex
TSS	7 m	Q. 2º grau / Face, tronco, coxa, MSD	10	Keflin
SS	1 a	Q. 1º e 2º grau / Tórax posterior e face	07	Keflin, Keflex
LSP	3 a	Q. 2º grau / Tronco, MSE, MIE	11	Keflin, Keflex
WDM	2 a	Q. 2º grau / Tronco, MSD, MID e MIE	11	Keflin
DON	1 a	Q. / Tronco, face e MSD	08	Ampicilina
JCSJ	11 m	Q. 1º 2º grau / Face, tronco e MSD	06	Keflin, Keflex
WSS	1 a	Q. 2º grau / Tronco anterior	02	Benzetacil
EJS	1 a	Q. 2º grau / Face pescoço tronco e membros inferiores	11	Keflin, Keflex
JRM	7 a	Q. 2º 3º grau / Vias aéreas superiores e cavidade oral	02	Sulfadiazina
DSSJ	9 m	Q. 2º grau / Face direita, MSD mão D e tórax D	07	Keflex
DFJ	3 a	Q. 1º 2º grau / Coxa D, tórax D e vulva	06	Ampicilina
JCS	1 a	Q. 2º / Tronco, MIE e MSE	08	Keflin, Keflex
JPSS	1 a	Q. 1º 2º grau / Braço E, tórax e perna E	05	Ampicilina
PAFS	1 a	Q. 2º grau / Tórax e abdômen	03	Ampicilina
ABS	1 a	Q. 2º grau / Pescoço, tronco e face	11	Keflin, Keflex
PACIENTE	IDADE	TOPOGRAFIA	T. Interno	ANTIBIÓTICOS
JLSB	7 a	Q. 2º grau/Abdômen e mão E	02	Keflex

GCB	6 a	Q. 2º grau / Tornozelo, perna e coxa D	13	Ampicilina
MMF	8 a	Q. 2º / Face e mão D	05	Keflin, Keflex
JS	1 a	Q. 2º 3º grau / Antebraço, braço e mão D	08	Keflex
LVS	4 a	Q. 2º grau / Coxa, perna e pé D	11	Keflex
MNS	3 a	Q. 2º 3º grau / Glúteus, períneo e tronco	11	Ampicilina
MS	2 a	Q. 1º 2º grau / Face, tórax, MID e braço E	07	Keflin
CAS	5 m	Q. 2º 3º grau / Face e braço E	02	Keflin
RAS	1 a	Q. 2º grau / Região genital, região perineal, pé D e E	07	Keflex
RSS	8 m	Q. 1º 2º grau / Face, MSD MID e tronco	17	Keflex
RVS*	6 a	Q. 3º grau / Tronco e MSE	09	Keflex, Keflin, Amicacina, Timetin Floxacina e Sulfadiazina
PHS	1 a	Q. 1º 2º grau / Tórax posterior e braço D	07	Keflin, Keflex
JWM	12 a	Q. 1º 2º grau / Perna D	10	Ampicilina
DSS	1 a	Q. 1º 2º grau / Face, pescoço, tronco e MID	08	Keflin, Keflex
CFCS	1 a	Q. 1º e 2º / Tronco e face	08	Keflin
MQS	8 a	Q. 2º 3º / Tronco posterior	08	Keflex, sulfadiazina
DJ	8 a	Q. 2º grau / Tórax e MS	08	Ampicilina
DSL	2 a	Q. 2º grau / Tórax, MS e MID	07	Ampicilina
LS	1 a	Q. 2º grau / Face, região cervical, tronco anterior ombro e braço E	03	Ampicilina
VMXC*	4a	B.2º 3º / Face, MSE, MSD, MIE, MID	104	Keflin, Tienam, Keflex, Amicacina, Ampicilina

* = pacientes que apresentaram episódios de IH; Q= queimadura; D= direita; E= esquerda; MSD= membro superior direito; MSE=membro superior esquerdo; MID= membro inferior direito; MIE= membro inferior esquerdo; MS= membros superiores.

GRÁFICO I - FREQUÊNCIA DOS ANTIBIÓTICOS PRESCRITOS

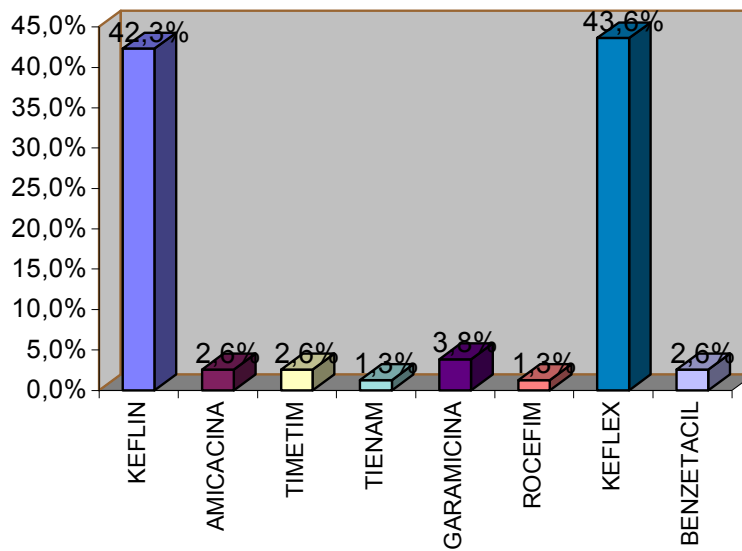


GRÁFICO II - FREQUÊNCIA RELATIVA DE QUEIMADOS POR IDADE

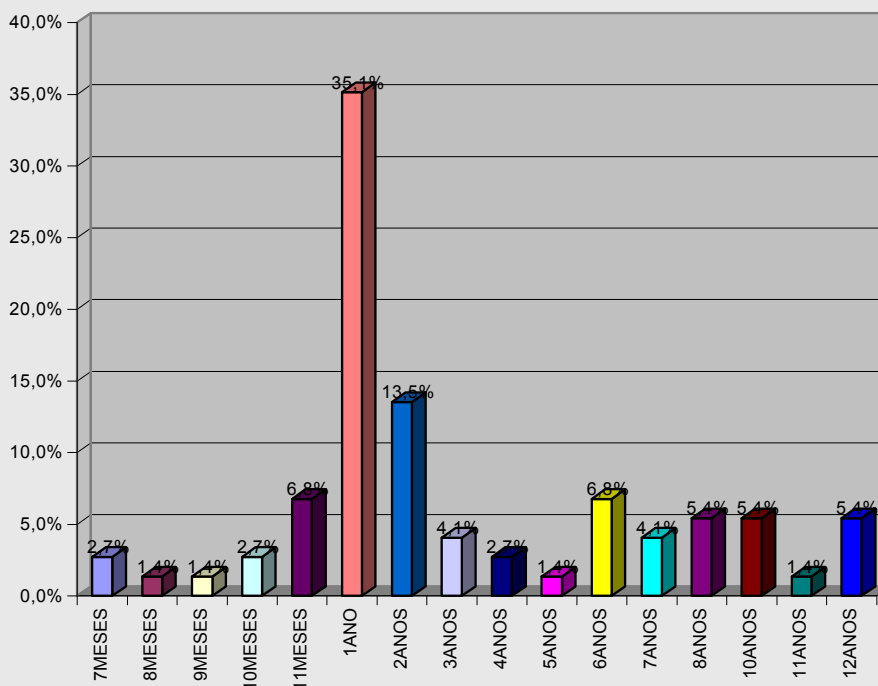


GRÁFICO III - FREQUÊNCIA RELATIVA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

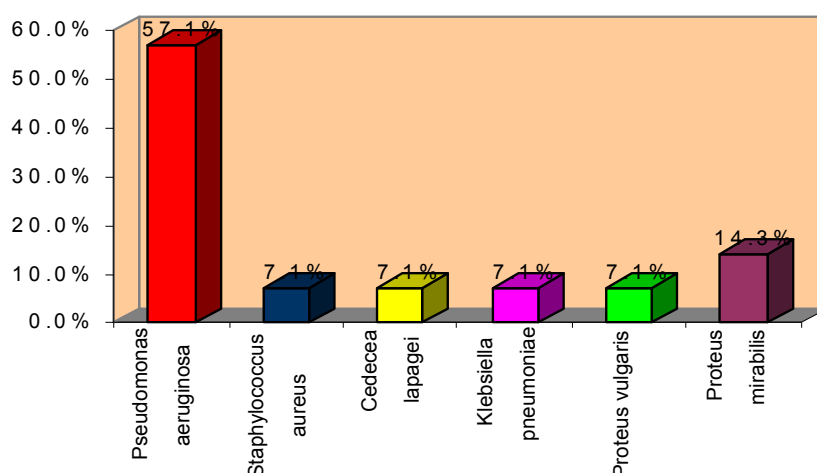
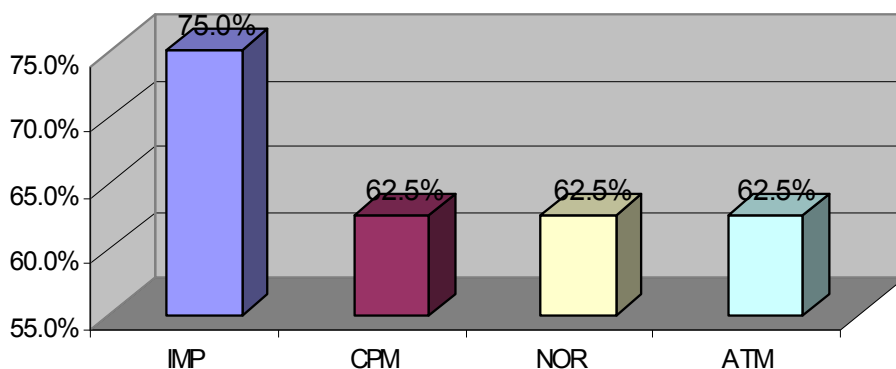


TABELA II - SENSIBILIDADE DAS *Pseudomonas* FRENTE AOS PRINCIPAIS ANTIMICROBIANOS

ANTIMICROBIANOS	FREQÜÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
IMP	6 (75%)
CPM	5 (62,5 %)
NOR	5 (62,5 %)
ATM	5 (62,5 %)

IMP= imipenem; CPM= cefepime; NOR= norfloxacin; ATM= azetreonam

GRÁFICO IV - SENSIBILIDADE DE *Pseudomonas* FRENTE A ANTIMICROBIANOS



DISCUSSÃO

Em relação aos resultados, verificou-se estarem dentro da normalidade, pois 5,4% das

crianças apresentaram infecções hospitalares. Nos países desenvolvidos, onde existem estatísticas oficiais, cerca de 5% dos pacientes admitidos em hospitais gerais contraem infecção durante a

internação ^(1,7). A maior parte das estimativas existentes revelam que, entre 6,5% e 15% dos pacientes internados contraem um ou mais episódios de infecção ^(apud 10). Heck, N.S. et alii, 1988 observaram que mesmo com uso de vários antibióticos associados e, ou doses elevadas, ocorria a infecção hospitalar (44%). No presente estudo, 4 das 74 crianças apresentaram 14 episódios de infecção hospitalar (18,97%).

O índice de mortalidade por nós detectado foi zero, o que podemos considerar com um excelente resultado, já que de acordo com relatório da Organização Mundial de Saúde cerca de 4% dos pacientes que desenvolvem infecção hospitalar têm como causa de óbito tal infecção ^(1,11).

AGRADECIMENTOS

Ao diretor do Hospital João Alves Filho, Dr. Roberto Gurgel, e a todos a quem lá recorreremos, especialmente, à técnica do laboratório do referido hospital Maria Bertolina dos Santos e à acadêmica de Ciências Biológicas mod. Médica da UNIT, Adriana Leila Vieira de Mello, pela colaboração nas práticas laboratoriais. À enfermeira-chefe do CTQ do Hospital do Andaraí-RJ, Berenice, pelo envio de material bibliográfico.

À UNIT pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTAL, G.M. WHO and the Global Problem of Nosocomial Infections. *Burns*, **11**: 48-53, 1984
2. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496, 1966.
3. COELHO, H. S. M., RIBEIRO, T. C. O. & PORTES, R. Infecções e Queimaduras. *Ars Curandi*, **18**(3): 68-76, 1985.
4. DONATI, L. & PERITI, P. Antibiotic treatment of burned patients: an italian multicenter study. *Intensive Care Med.*, **20**(4): 830-834, nov. 1994.
5. FRANÇA, A. L. F. & ASSUNÇÃO, E. A. Prevenção e Tratamento de Queimados com clorhexidina. *F. méd. (Br)*, **84** (1), 265-267, 1985.
6. HECK, N. et alii. Ocorrência de Infecção Hospitalar em Queimados. *HFA publ. téc. cient.*, **3** (4): 383-387, out-dez. 1988.
7. HALEY, R. W. & GARNER, J. S. Infection Surveillance and Control Programs. In: BENNETT, J. V. & BRACHMAN, P. S. *Hospital Infections*. Boston, Toronto, Little, Brown and Co, 1986, cap. **3**, p. 39-50.
8. HERRUZO, C. et alii. Risk factors for local infection in burns. Multivariate study. *Med. Clin. (Barc)*, **106**(3): 91-94, jan. 1996.
9. RABELO, L. de F. D. & GONTIJO FILHO, P. P. Prevalência de infecções hospitalares e fatores de risco intrínsecos e extrínsecos em pediatria, em dois hospitais universitários em Uberlândia e no Rio de Janeiro. *Arquivos Brasileiros de Medicina*, **70**, (8), 399 - 405, 1996
10. RIBEIRO, D. C. de S. *Infecção Hospitalar: Comparação entre dois métodos de vigilância epidemiológica*. Rio de Janeiro, 1989. 185 p., Dissertação de Mestrado, ENSP- Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, Rio de Janeiro.
11. SCHLAGER, T. et alii. Hospital – acquired infections in pediatric burn patients. *South Med. J.*, **87**(4): 481-484, abr. 1994.
12. WURTZ, R. et alii. Nosocomial infections in a burn intensive care unit. *Burns*, **21**(3): 181-184, maio 1995.
13. ZANON, U. e GERMANO, R. L. Infecções Hospitalares no Grande Queimado. In ZANON, U. *Infecção Hospitalar*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1987, p. 697-715.

LEISHMANIOSE VISCERAL EM FEIRA DE SANTANA:
INQUÉRITO SOROLÓGICO EM CÃES E A RELAÇÃO ENTRE A
DISTRIBUIÇÃO DA POSITIVIDADE CANINA POR LOCALIDADE
E OS CASOS HUMANOS

Simone Souza De Oliveira*
Selma Santa Barbara Da Silva**
Joelande Esquivel Correia***
João Francisco Dos Santos****

RESUMO - Tendo em vista o surto epidêmico de L. visceral em Feira de Santana - Ba. em 1994, analisou-se a positividade canina no período de 1995-1996 nas áreas peri-urbanas e rurais do Município. Tomou-se como base a distribuição de casos humanos ocorridos e a relação com a positividade canina por localidade, bem como a comparação entre o diagnóstico laboratorial e o clínico realizado no momento da coleta, fez-se um levantamento de dados do inquérito canino no Distrito Sanitário/ FNS e ficha de notificação de doenças transmissíveis da SESAB/ 2ª DIRES. O levantamento sorológico da população canina num total de 15008 amostras, apresentou um percentual de positividade de 2,53% em 1995 e 0,63% em 1996, estando a maioria dos cães com aparência sadia. Após pesquisa inicial observou-se uma nítida correlação entre a ocorrência de casos humanos e a prevalência canina, o que faz concluir que é grande importância o inquérito sorológico para diagnosticar e medir a extensão do problema.

UNITERMOS: Leishmaniose visceral; surto epidêmico; inquérito canino.

* - Fundação Nacional de Saúde/ Distrito Sanitário - Feira/Ba.

** - Universidade Estadual de Feira de Santana / GUV

***- Universidade Estadual de Feira de Santana - Dptº de Biologia

****- Universidade Estadual de Feira de Santana - Dptº de Biologia

SUMARY - Leishmaniose visceral in Feira de Santana-Bahia: Sorologic inquest in dogs and the relation between the positive in dogs and in human beings in each districts - According the epidemic outbreak of L. visceral in Feira de Santana in 1994, we analysed the positivity in dogs in the period 1995-1996 in the out-skirts of the city and rural areas of the municip. Based on the distribution of cases in human beings occurred and the relation with the positivity in dogs in each district, and also the comparison between the laboratorial diagnosis and the clinical diagnosis made it the moment of the gathering, we made a collection of data of the inquest in dogs in the Distrito Sanitário/FNS and a notification form of the transmittable diseases of SESAB/2^a Dires. The sorologic survey of the population of the dogs in a total of 15008 samples, presented a percentual of positivity of 2,53% in 1995 and 0,63% in 1996, and the dogs had a healthy appearance. After the initial survey we observed a nitid relation between an occurrence in human beings and the prevalence in dogs, what make us conclude that the sorologic inquest is very important to diagnosis and measure the extension of the problem.

UNITERMS; Leishmaniose visceral; epidemic outbreak; inquest in dog.

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista médico e social a Leishmaniose visceral, uma zoonose primariamente rural, vem-se urbanizando de maneira bastante elevada em vários estados brasileiros (anexo1). Esta mudança ecológica deve-se a participação do cão como reservatório da ***Leishmania chagasi***, assim, nos focos endemo-epidêmicos, a doença pode-se manter num ciclo doméstico (cão→ flebótomo→ homem), sem necessitar do reservatório silvestre, a raposa. Isto representa para o nosso país um importante problema de Saúde Pública, pois não se pode deixar de considerar a tendência ao aumento do número de indivíduos expostos, à medida em que a doença atinge áreas urbanas e peri-urbanas.

A doença no cão parasitado pode ter aspecto inteiramente normal, tendo uma evolução lenta de seis meses a dois anos. O sintoma mais frequente é o emagrecimento, em seguida a presença de lesões cutâneas (associada a queda de pêlos, descamação ou ulcerações), que em geral são superficiais e pequenas, localizadas com mais frequência ao nível das articulações, focinho, orelhas e cauda. Em fase mais adiantada da doença este animal apresenta conjuntivite, ceratite, edema das patas, unhas alongadas, diarreia e em fase final paresia das patas posteriores, caquexia, tendo febre em todos os casos.

Nos inquéritos epidemiológicos é necessário examinar tanto os animais suspeitos quanto aqueles que aparentemente não apresentam sintomas característicos da Leishmaniose visceral. Tendo em vista o surgimento de casos autóctones da doença, em 1994, na zona periférica da cidade de Feira de Santana, iniciou-se em 1995 inquérito canino na área de foco.

Este trabalho tem como finalidade analisar a prevalência canina para Leishmaniose visceral no período de fevereiro de 1995 a dezembro de 1996, utilizando como base a distribuição de casos humanos nos bairros periféricos e zona rural do Município de Feira de Santana, bem como a relação entre a positividade canina e o aspecto clínico do cão compatível com a doença.

MATERIAL E MÉTODOS

. Espaço Geográfico

Feira de Santana, situada no estado da Bahia a 108 Km da capital Salvador, possui uma área de 1.344 Km², localizada entre as coordenadas geográficas 12° 15'34" de latitude sul e 38° 57'53" de longitude oeste gr. fuso horário a menos de três horas, sua altitude é de 242 m acima do nível do mar, apresenta vegetação típica de caatinga e clima seco. Sua principal atividade econômica é a agropecuária e o comércio..

O Município de Feira de Santana é considerado o maior entroncamento rodoviário de todo norte e nordeste do país, onde contribui para uma maior movimentação de nosso comércio, aliado a isto, o intenso processo migratório na cidade, principalmente da zona rural e/ou de municípios circunvizinhos, inclusive de outros estados ocasionando o surgimento de favelas e invasões sem nenhuma infra-estrutura sanitária, o que acaba contribuindo para o aparecimento de doenças endemo-epidêmicas..

Apesar de ser considerado um dos maiores Municípios da Bahia, Feira de Santana apresenta grandes problemas na infraestrutura dos serviços públicos, no sistema de esgotamento sanitário e abastecimento de água. Parte da população vive num quadro de pobreza em condições precárias de moradia e alimentação. Muitos são subnutridos, principalmente, os cidadãos moradores dos bairros periféricos.

. Método de Análise

No presente trabalho foram analisadas as informações referentes a Leishmaniose Visceral em áreas peri-urbanas e rurais do Município de Feira de Santana, registradas no Boletim CCL - 21- Campanha Contra Leishmaniose visceral – Ministério da Saúde/ Fundação Nacional da Saúde (FNS) (Anexo 2).

No período de fevereiro de 1995 a dezembro de 1996 foram coletadas 15.008(quinze mil e oito) amostras caninas em papel filtro por agentes de Saúde Pública da Fundação Nacional de Saúde - Distrito Sanitário Feira de Santana - Bahia. O inquérito sorológico foi realizado com 100% dos cães da área de foco reconhecidamente com donos, obedecendo a normatização do programa de Controle da Leishmaniose Visceral, onde o inquérito canino é realizado tomando por base o caso humano positivo,

sendo delimitada uma área cujo raio é de 200 m na zona urbana e 1000 m na zona rural..

Na tentativa de detectar maior número de cães infectados foram adotados alguns critérios clínicos como : alongamento das unhas, emagrecimento, perda de pêlos, feridas no focinho e orelhas e a partir destes critérios os cães foram classificados em dois grupos: cães suspeitos (critério clínico) e cães aparentemente saudáveis.

Depois de coletadas, as amostras de sangue canino foram encaminhadas ao Laboratório de Imunofluorescência do Distrito Sanitário Feira de Santana da Fundação Nacional de Saúde e da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram submetidas a exames pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI - para Leishmaniose visceral canina, cujo kit é produzida pelo Ministério de Saúde/FIOCRUZ - Bio Manguinhos (Laboratório de Reativos).

De posse do número de casos humanos, foi feita uma correlação com a prevalência canina (em porcentagem de positivos) nos anos, registrados no período de 1994 a 1996 e obtidos através da ficha de notificação de doenças transmissíveis da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia/ 2ª DORES, e Distrito Sanitário Feira de Santana da Fundação Nacional de Saúde.

RESULTADOS

No inquérito canino realizado nas zonas peri-urbana e rural do Município de Feira de Santana - Bahia, no período de fevereiro de 1995 a dezembro de 1996 sobre a prevalência da Leishmaniose Visceral canina, sua relação com a distribuição espacial dos casos humanos e a caracterização diagnóstica dos cães submetidos ao levantamento sorológico, obteve-se os seguintes resultados:

- Das 15.008 amostras caninas 5.972 (cinco mil novecentos e setenta e dois) foram examinadas em 1995, apresentaram um percentual de positividade de 2,53%: as 9.036 (nove mil e trinta e seis) amostras examinadas no ano de 1996 apresentaram 0,63% de positividade para Leishmaniose Visceral. (Tabela1)
- Na avaliação das amostras examinadas em 1995, foi observado que das 151 amostras positivas, 76,8% foram coletadas em cães aparentemente saudáveis e apenas 23,2 % em cães

considerados suspeitos. Em 1996 das 57 amostras positivas 89,5% foram coletadas em cães aparentemente saudáveis e 10,5% foram em cães com suspeita da doença. (Tabela 2).

- A distribuição de casos humanos e sua relação com a positividade canina por localidade (bairros, fazendas, vilas, sítios, etc.) no período de 1995 - 1996, mostra que das 21 localidades trabalhadas no primeiro ano, 5 não apresentaram positividade sorológica canina. Em 1996 observou-se que das 49 localidades com registro de casos humanos apenas 22 apresentaram positividade canina. (Tabela 3 e Tabela 4).

TABELA 1 – PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA - FEV/95 A DEZ/96

ANO	AMOSTRAS		
	COLETADAS	POSITIVAS	% POSITIVIDADE
1995	5.972	151	2,53
1996	9.036	57	0,63

FONTE: LABORATÓRIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA - DISTRITO SANITÁRIO FEIRA DE SANTANA/FNS - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE A POSITIVIDADE CANINA E O DIAGNÓSTICO CLÍNICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA - FEV/95 - DEZ/96.

SITUAÇÃO DO CÃO	1995		1996	
	Nº	%	Nº	%
APARENTEMENTE SADIO	116	76,8	51	89,5
SUSPEITO	35	23,2	6	10,5
TOTAL	151	100	57	100

FONTE: LABORATÓRIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DO DISTRITO SANITÁRIO FEIRA DE SANTANA/FNS - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS HUMANOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL E A POSITIVIDADE CANINA POR LOCALIDADE DO MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA - BA. 1995 - 1996.

LOCALIDADES	1995		1996	
	Nº DE CASOS HUMANOS	% POSIT.	Nº DE CASOS HUMANOS	% POSIT.
GABRIELA BR	27	4,7	3	1,6
C.HOMERO FIGUEREDO	1	1,2	0	0,8
PAMPALONA BR	23	3,6	0	1,1
ASA BRANCA BR	10	1,4	3	0,3
SITIO NOVO BR	1	0,6	0	0
NOVA ESPERANÇA BR	4	4,3	2	1,2
GEORGE AMÉRICO BR	1	0,2	1	0
CARAÍBAS BR	6	4	2	0,4
PEDRA DO DESCANSO BR	1	0,4	0	3,2
SOBRADINHO BR	1	0,4	0	0,6
CAMPO DO GADO NOVO BR	4	0	3	0,9
JARDIM CRUZEIRO BR	3	1,2	2	0,8
CONJ.FEIRA IX BR	1	0,5	0	0
CAJUEIRO 4º FAZ	1	9	1	0
PEDRA FERRADA FAZ	3	1,9	0	0
ÁGUA GRANDE FAZ	1	0	6	0
GALHARDO 1º FAZ	1	4,3	#	#
PASSAGEM DO TIGRE FAZ	0	0	2	0
CAPIM 2º FAZ	0	5,5	1	100
MALHADOR 4º FAZ	0	0	4	0
MALHADOR SITIO	0	0	4	11,1
ALECRIM 2º FAZ	0	0	1	0
SANTA ROSA 2º FAZ	1	4,3	0	10
SANTO ANTÔNIO 5º FAZ	0	4,3	1	0
LARANJEIRA 1º FAZ	0	0	1	0
TIGRE FAZ	0	0	2	0
NOVA IPUAÇU VILA	1	0	2	1,6
BURDÃO 1º FAZ	1	0	0	0
CANDEIAS FAZ	1	0	0	0
CHAPADA 1º FAZ	0	0	1	0
EST. PEDRA FERRADA FAZ	0	0	1	0
CALDEIRÃO 2º FAZ	0	2,4	1	1,3

Fonte: M.S/Distrito Sanitário Feira de Santana - FNS
SESAB / 2º DIRES
sem coleta

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DE CASOS HUMANOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL E POSITIVIDADE CANINA NO MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA – BA – 1996.

LOCALIDADES	19	95	19	96
	Nº DE CASOS HUMANOS	% POSIT.	Nº DE CASOS HUMANOS	% POSIT.
CALDEIRÃO 1º FAZ	#	#	1	1,7
MANTIBA VILA	#	#	1	0
MARIA PRETA FAZ	#	#	1	0
LAGOA DA VÁRZEA FAZ	#	#	2	3,5
CASA NOVA FAZ	#	#	1	2,5
SANTA ROSA 1º FAZ	#	#	1	10
LAGOA DAS VARINHAS FAZ	#	#	1	0
BARBOSA FAZ	#	#	1	0
ESCUTA FAZ	#	#	1	0
COQUEIRO 2º FAZ	#	#	1	0
IPOEIRA FAZ	#	#	1	0
HUMILDES VILA	#	#	1	0
SERGIO CARNEIRO BR	#	#	3	1,5
CIS BR	#	#	1	0
MANGABEIRA BR	#	#	1	0
QUEIMADINHA BR	#	#	1	0
GALILÉIA BR	#	#	1	0

Fonte: M.S/Distrito Sanitário Feira de Santana - FNS
SESAB / 2º DIRES
sem coleta

DISCUSSÃO

Para a ocorrência de epidemias de doenças parasitárias é necessário a concomitância de três fatores: presença do agente etiológico, o reservatório (fonte de infecção) e transmissor.

Os primeiros casos de Leishmaniose Visceral notificados no município de Feira de Santana dataram de agosto de 1994, procedentes da zona peri-urbana da cidade, onde o ambiente natural (desmatamento, surgimento de favelas , invasões, presença do mosquito transmissor, cães positivos), aliado a falta de infra estrutura sanitária , e o intenso processo migratório . propiciaram o desencadear do surto epidêmico.

Partindo-se do inquérito canino inicial realizado em 1995 observou-se uma nítida correlação entre as localidades com casos humanos de Leishmaniose visceral e prevalência canina,

pois das 21 localidades com notificação de casos humanos 75,2% apresentaram também cães com sorologia positiva.

Após a implantação do Programa de Controle da Leishmaniose em 1995, ocorreram transformações que ocasionaram mudança no perfil epidemiológico refletida no ano de 1996 onde a prevalência canina diminuiu consideravelmente em função das medidas profiláticas adotadas como a eliminação de cães positivos, diminuição da densidade do vetor através da borrifação residual com inseticida Piretróide.

Como o ciclo biológico da Leishmaniose visceral pode ser de 2 semanas a 2 anos, atribuiu-se que os casos humanos diagnosticados em 1996 tenha sido adquiridos em anos anteriores.

Ademais, o estudo mostra ainda que o índice de positividade, usando como critério diagnóstico cães classificados como aparentemente sadios apresentou-se mais elevado do que naqueles considerados suspeitos, o que reforça a importância do exame laboratorial dos cães da área de foco, pois, muitas vezes estes podem se mostrarem assintomáticos, além de que o inquérito epidemiológico baseado na sorologia da população canina sob o risco de transmissão da Leishmaniose visceral, se faz necessário para diagnosticar e avaliar a extensão do problema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ALENCAR, J.E. - Calazar Canino, Contribuição para o estudo da Epidemiologia do Calazar no Brasil. Fortaleza, Imprensa Oficial.
- 02 - CONTROLE, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL (CALAZAR), - Normas Técnicas, 1ª ed. Brasília Ministério da Saúde - FNS, 103p.: il , 1994.
- 03 - COSTA, C. H. N., PEREIRA, H.F. ; ARAUJO, M.V. – Epidemia de Leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, -- 1980-86 Rev. Saúde, São Paulo, 24: 361-372, 1990.
- 04 - COUTINHO, J. O. Geografia Médica das Protozooses. In: Lacaz CS, Baruzzi, RG; Siqueira JR Introdução à Geografia Médica do Brasil. p 259-304. Edgard Blucher, Ed. da Universidade de São Paulo, SP, 1972
- 05 - FOX, J.P; et all Herd immunity: basic concepts and relevance to public health immunization practices, Amer. J. Epidem., 94: 179- 89, 1971.
- 06 - LILIENFELO, A. M. & LILIENFELD, D. Foudation of Epidemiology. New York, Oxford Universit Press, 1980.
- 07 - MANSON, Philip. H. Doenças Tropicais - Manual das doenças dos climas quentes, ed. Guanabara Koogan , Rio de Janeiro, p, 161-194, 1943.
- 08 - MARZOCHI, M. C. A. et all. Leishmaniose visceral (calazar), J.M.B., 41(5), nov. 1981.
- 09 - NEVES, D.P. - Parasitologia Humana, 9ª ed. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 63-72, 1994.
- 10 - PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. Brasil -Médico , 46: 949-950, 1934.

- 11 - PRATA, A . Estudo Clínico e Laboratorial do Calazar. Tese, Salvador, Fac. De Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1957.
- 12 - REY,L. Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro , Ed. Guanabara Koogan, p, 215 a 226, 1991.
- 13 - RODRIGUES, J. da S. - Leishmaniose visceral(Calazar). Tese. Rio de Janeiro. Serviço Nacional de Educação Sanitária.
- 14 - SANTOS, M. dos et all. Leishmaniose visceral em Santarém Pará Aspectos Gerais do Controle - Inquérito Sorológico de Cães e Tratamento dos Casos Humanos. Hiléia Médica, Belém, 7(2): 23-32, dez, 1996.
- 15 - SILVA,J.R. da - Leishmaniose visceral (calazar) - Serviço Nacional de Educação Sanitária: Rio de Janeiro, Brasil, 1956.
- 16 - SOUNIS, Emílio. Epidemiologia Aplicada, 2º volume, Livraria Atheneu, Rio de Janeiro. São Paulo, p. 209-213, 1985.
- 17 - TEIXEIRA, R. - Experiências vividas com a Leishmania visceral 1954-1980. Aspectos Epidemiológicos, Sorológicos e Evolutivos. Tese de Mestrado Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1980.
- 18 - VERONESI, R. Doenças - Infecciosas e parasitárias.- 8ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 724-738, 1993.
- 19 - VIEIRA, J. B. F. O. - Controle das Leishmanioses no Brasil. Rev. Fundação SESP, v. 31, n.2, p. 65-85, 1986.

TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA: DESENVOLVIMENTO DE REAGENTE ESTÁVEL UTILIZANDO ANTÍGENO HETERÓLOGO.

Andréia P. FERREIRA^{1,2}, Adelaide J. VAZ^{1,2}, Paulo M. NAKAMURA³, José A. LIVRAMENTO⁴, Luis R. MACHADO⁴

¹Laboratório Bio-Ciência Lavoisier. Av Angélica 1832. 01228-200. São Paulo, SP. ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. ³Instituto Adolfo Lutz. ⁴Faculdade de Medicina, USP.

RESUMO

Foi padronizado o teste de hemaglutinação (HA) empregando hemácias de ganso formolizadas, taninizadas e sensibilizadas com extrato antigênico de líquido vesicular de *C. longicollis* (HA-CI) e extrato salino total de *C. cellulosae* (HA-Cc). Foram ensaiados 61 LCR de dois grupos: 41 de pacientes com neurocisticercose e 20 de grupo controle, respectivamente, reativos e não-reativos no teste ELISA empregando *C. cellulosae*. Nos LCR do grupo controle não foi observada reatividade e 34 (82,9%) e 35 (85,4%) LCR de doentes foram reativos, respectivamente, nos testes HA-CI e HA-Cc. O estudo da estabilidade dos reagentes pronto para uso mostrou vantagens para o armazenamento a 4°C, em glicerol a 50%, por até 6 meses. Os resultados obtidos indicam que o reagente utilizando *Cysticercus longicollis* e estabilizado com glicerol pode ser empregado como alternativa no diagnóstico imunológico da neurocisticercose.

Palavras-Chave: Neurocisticercose, Teste de Hemaglutinação, Líquido Cefalorraquiano.

SUMMARY

"Hemmagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using heterologous antigens." A hemagglutination (HA) test was standardized using formalin- and tannin-treated gander red blood cells sensitized with a total salt extract of *C. cellulosae* (HA-Cc) and an antigenic extract of *Cysticercus longicollis* (HA-CI) vesicular fluid. A total of 61 cerebrospinal fluid (CSF) samples were assayed, 41 from patients with neurocysticercosis and 20 from a control group, which were, respectively, reactive and non-reactive to ELISA using *C. cellulosae*. The CSF samples from the control group did not react and 35 (85.4%) and 34 (82.9%) CSF samples from patients were reactive to the HA-Cc and HA-CI tests, respectively. The reagents ready for use were stable up to 6 months when stored at 4°C in 50% glycerol. The present results suggest that the reagent using *Cysticercus longicollis* stabilized with glycerol can be used as an alternative in the immunological diagnosis of neurocysticercosis.

KEYWORDS: Hemagglutination test; Neurocysticercosis; Cerebrospinal fluid.

INTRODUÇÃO

A neurocisticercose (NC), infecção com a forma larvária da *Taenia solium*, *Cysticercus cellulosae*, é a mais freqüente infecção parasitária do sistema nervoso central, ocorrendo em países de condições sanitárias deficientes ou que recebam imigrantes de regiões endêmicas (MAHAJAN, 1982).

A sintomatologia clínica não é específica e o diagnóstico é auxiliado por exames de neuroimagem e do líquido cefalorraquiano (LCR). Os métodos imunológicos de detecção de anticorpos em LCR têm sido amplamente aplicados, já que em função da localização do parasita, há restrições para o diagnóstico direto (SPINA-FRANÇA et al., 1993). A hemaglutinação indireta (HA), apesar da dificuldade de obtenção de lotes homogêneos e estáveis de hemácias sensibilizadas, permanece como importante metodologia pela facilidade de execução, baixo custo e relativa eficiência.

Na padronização de reagentes para diagnóstico da NC tem sido limitante a obtenção de parasitas a partir de suínos infectados. As reações cruzadas observadas entre os antígenos de cisticercos de *Taenia solium* e *Taenia crassiceps*, cepa ORF (FREEMAN, 1962) indicam que os parasitas partilham epítomos importantes para o uso como fonte de antígeno no diagnóstico imunológico da NC (KUNZ et al., 1989; LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1991; ANDRADE et al., 1996; VAZ et al., 1996).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento do teste HA para pesquisa de anticorpos em LCR na NC humana empregando cisticercos de *Taenia crassiceps*, cepa ORF, hemácias de aves e estabilizantes para o reagente final.

MATERIAL E MÉTODOS

Cisticercos

Cisticercos de *Taenia crassiceps*, *Cysticercus longicollis*, cepa ORF, foram mantidos por inoculação intraperitoneal em camundongos fêmeas BALB/c. Os animais foram sacrificados 90 dias após o inóculo e os parasitas removidos com auxílio de PBS (0,0075 M Na₂HPO₄, 0,0025 M NaH₂PO₄, e 0,14 M NaCl, pH 7.2) contendo um pool de (2.5×10^{-3} mM) inibidores de proteases (PBS-I) e armazenados a -20 °C após exaustivas lavagens em solução salina (0.15M NaCl). Os inibidores (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) usados foram PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), aprotinina, leupeptina, antipaina e TLCK (N-p-tosyl-lysine-chlormethylketone).

Cisticercos de *Taenia solium*, *Cysticercus cellulosae*, foram obtidos de músculos de suíno naturalmente infectado, exaustivamente lavados em solução salina e aqueles em processo de degeneração ou calcificados foram desprezados. Os parasitas foram armazenados a -20°C em PBS-I.

Antígenos

Extrato salino total de *Cysticercus cellulosae* (Cc): cerca de 200 parasitas foram homogeneizados com 2 ml de água destilada e a mistura foi tratada com ultrassom (3 ciclos de 2 minutos cada, 1mA, 20kHz). Após adição de 2 ml de NaCl 0,3M e repetição da sonicação, o extrato foi centrifugado a 15.000g por 30 minutos a 4°C e repetida a centrifugação com o sobrenadante obtido. Ao segundo sobrenadante foi adicionado pool de inibidores de proteases (0,25M).

Líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* (Ci): cerca de 800 parasitas íntegros foram rompidos com auxílio de bastão de vidro e centrifugados a 15.000g por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido a tratamento com ultrassom, foi repetida a centrifugação e adicionado pool de inibidores (0.25M) ao sobrenadante obtido.

Os antígenos foram aliquotados e armazenados a -20°C, sendo caracterizados quanto a concentração de proteínas (LOWRY et al., 1951) e composição de peptídeos por SDS-PAGE, sob condições redutoras, sistema descontínuo, gel a 12% (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973).

Teste de Hemaglutinação (HA)

A uma suspensão a 10% (v/v) em solução salina de hemácias de ganso adulto macho foi adicionado igual volume de p-formaldeído a 10% em PBS e a mistura mantida a 37°C por 18 horas, sob agitação ocasional. As células foram centrifugadas, lavadas quatro vezes em solução salina (2000 rpm por 3 minutos), ressuspensas a 20% em PBS contendo 4% (p/v) de p-formaldeído e armazenadas a 4°C por até 2 meses.

As hemácias foram sensibilizadas de acordo com a metodologia descrita por HOSHINO-SHIMIZU et al., 1978, e algumas modificações. Alíquotas de 2ml de hemácias a 1,5% em solução salina foram lavadas três vezes e ressuspensas no volume original. Igual volume de ácido tânico a 1:10.000 (p/v) em salina foi adicionado, a mistura foi incubada por 15 minutos a 56°C e repetidas as lavagens. Sobre a papa de hemácias foram adicionados 2 ml do antígeno diluído em PBS 6,4 (0.05 M KH_2PO_4 , 0.025 M NaH_2PO_4 , and 0.075 M NaCl, pH 6,4) e a mistura incubada por 50 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 2ml de glutaraldeído 0,1% em salina, continuando a incubação por mais 30 minutos. As hemácias foram lavadas e ressuspensas em solução estabilizante Eo (HOSHINO-Shimizu et al., 1978): glicina (1,3%), tioglicolato de sódio (0,03%), mertiolate (0,03%), leite desnatado (0,9%) e glutamato de sódio (0,7%) em PBS 6,4. Igualmente, foram preparadas hemácias-controle sem adição de antígeno no processo de sensibilização. Por titulação em bloco foram ensaiadas suspensões de hemácias de 1% a 3% e concentrações de antígeno de 15µg/ml a 75µg/ml.

O teste foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno, fundo "V" (Inlab, Brasil), homogeneizando-se 50µl das amostras de LCR e suas diluições seriadas em PBS 6,4, a partir de 1:2, e 50µl de hemácias sensibilizadas. Após 45 minutos à temperatura ambiente foi realizada a leitura.

Foram ensaiadas três condições de preservação do reagente pronto para uso: Eo, E1 (glicerol a 50% em Eo) e E2 (Etilenoglicol a 40% em Eo). Silicone (0,08%) foi introduzido nas soluções para minimizar o efeito espumante. Glicerol e etilenoglicol foram escolhidos a partir de descrições de seu emprego na preservação de soros humanos (FRAJOLA & Mauruka, 1976; CAMARGO & GUIMARÃES, 1980) e na estabilização de hemácias sensibilizadas (Sasaki et al., 1996). Alíquotas de reagente estabilizado foram conservadas a 4°C e a 37°C e ensaiadas a cada 15 dias utilizando-se LCR padrão positivo e negativo.

Amostras de Líquido Cefalorraquiano (LCR)

Foram ensaiadas 61 amostras de LCR divididas em dois grupos:

Grupo A - 41 de pacientes com NC (síndromes clínicas e exames de imagens sugestivos de NC e LCR reativo no teste ELISA para anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae*).

Grupo B - 20 amostras de pacientes sem cisticercose (9 aparentemente normais, 4 com epilepsias, 2 com neurosífilis e 5 com meningite bacteriana), todos negativos no teste ELISA.

RESULTADOS

As concentrações de proteína obtidas para os antígenos Cc e Ci foram, respectivamente, de 3,45 mg/ml e 3,20 mg/ml. A análise dos resultados de SDS-PAGE mostrou a presença das bandas de 98-94kDa, 72-68kDa, 62kDa, 57-56kDa, 46-44kDa, 40-38,5kDa, 37-34kDa, 32-30kDa e 27-26kDa no antígeno Cc, e 200kDa, 160kDa, 143kDa, 115kDa, 108kDa, 95-92kDa, 70-68kDa, 41kDa, 38,5kDa, 37,5kDa, 36kDa, 26kDa e 10-15kDa (difusa) no antígeno Ci.

O melhor aspecto do teste ocorreu com hemácias a 1,5% e leitura final em 45 minutos para o estabilizante Eo e 60 minutos para E1 e E2. As concentrações ideais dos antígenos Cc e LV foram, respectivamente, 35µg e 30µg por mililitro de reagente.

Não foram observadas aglutininas inespecíficas no teste com hemácias controle. Das 41 amostras de LCR do grupo de doentes, 35 (85,4%) e 34 (82,9%) foram reativas, respectivamente, com os antígenos Cc e Ci, com média geométrica dos títulos de $18,0 \pm 6,8$ no teste HA-Cc e $11,4 \pm 6,1$ no teste HA-Ci. Não foi observada reatividade nas amostras de LCR do grupo controle. Os índices de concordância obtidos foram e HA Cc x HA Ci = 98,3%, ELISA x HA-Ci = 88,5% e ELISA x HA-Cc = 90,2%. A aplicação dos testes Q de Cochran e de McNemar (SIEGEL, 1975) confirmou a vantagem do teste ELISA e demonstrou não haver diferença significativa entre os antígenos Cc e Ci no teste HA.

Os resultados dos ensaios de estabilidade do reagente mostraram vantagens para o uso de glicerol e armazenamento a 4°C por até 6 meses (figura 1).

DISCUSSÃO

Foi objetivo deste trabalho a padronização do teste HA utilizando hemácias de ganso formolizadas e taninizadas, atendendo recomendações do Ministério da Saúde de não utilizar derivados de sangue humano na produção de reagentes. Empregamos antígeno de líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps*, cepa ORF, de manutenção em animais de laboratório e comparação com o uso de antígeno homólogo.

Foi utilizada a concentração de 60µg de CI para 2ml de hemácias (1,5µg por teste), semelhante à do antígeno Cc. Essa concentração é variável e depende da escolha das hemácias, do antígeno e das condições de sensibilização (UEDA e cols., 1988; PIALARISSI e cols., 1987). Na caracterização dos antígenos foram observados os peptídeos descritos como imunodominantes em Cc e CI (VAZ et al., 1997).

Foi obtida 100% de negatividade nas amostras de LCR do grupo controle. No grupo de pacientes com NC foram observados sete (17,1%) LCR não-reagentes no teste HA-CI e seis (14,6%) empregando antígeno Cc, estabelecendo índices de sensibilidade satisfatórios. Em todos os testes imunológicos da NC, dependendo da metodologia utilizada, têm sido observados resultados falso-negativos (PIALARISSI et al., 1987; ANDRADE et al., 1996; VAZ et al., 1997). O teste HA padronizado é de simples execução e baixo custo, principalmente para laboratórios de baixa complexidade.

Nossos resultados foram semelhantes aos descritos na literatura. UEDA et al. (1988), empregando antígeno Cc, obtiveram índices de sensibilidade e especificidade, respectivamente, de 88,7% e 96,6% com hemácias de carneiro e de 81,7% e 94,4% com hemácias humanas. PIALARISSI et al. (1987) aplicaram o teste em 125 LCR de pacientes com NC obtendo 87,2% de positividade, comparável ao teste de imunofluorescência indireta com vantagens de menor custo e facilidade de execução.

A adição do glicerol à solução estabilizadora (HOSHINO-Shimizu et al., 1978) aumentou a estabilidade do reagente por até 6 meses quando armazenado a 4°C. Embora o glicerol aumente a viscosidade do meio, a utilização de hemácias nucleadas de ganso manteve um tempo adequado para a leitura final. Outras soluções estabilizantes devem ser avaliados.

Não foi observada diferença significativa entre os antígenos, indicando que antígenos de *Taenia crassiceps* podem ser empregados alternativamente no teste HA para detecção de anticorpos em LCR na NC.

AGRADECIMENTOS

A. P. Ferreira foi bolsista do CNPq-PIBIC/FCF/USP - 1995/96. Agradecemos ao Dr. A. Walter Ferreira, Biolab-Mérieux SA, por permitir o uso do biotério e ao Sr Calixto Correia da Silva pela assistência técnica na manipulação dos animais. Também agradecemos ao Dr Álvaro T. Sasaki pelas sugestões técnicas.

REFERÊNCIAS

- Andrade, A. P. F., Vaz, A. J., Nakamura, P. M., Palou, V. S. E. B., Cunha, R. F. & Ferreira, A. W. (1996). Immunoperoxidase for the detection of antibodies in cerebrospinal fluid in neurocysticercosis: use of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus longicollis* particles fixed on microscopy slides. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*, , .
- Camargo, M. E. & Guimarães, C. S. (1980). Conservação de alíquotas de soro de toxoplasmose e chagásicos por adição de glicerina. In: *Proceedings of the 16th Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Natal, Brazil, p. 357.
- Frajola, W. J. & Maurika, J. (1976). A stable liquid human reference serum. *Heath Laboratory Science*, **13**, 25-33.
- Freeman, R. S. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. *Canadian Journal of Zoology*, **40**, 969-990.

- Hoshino-Shimizu, S., Camargo, M. E. & Nagasss, T. K. (1987). A stable polysaccharide hemagglutination reagent for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infections. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **20**, 208-212.
- Kunz, J., Kalinna, B., Watschke, V. & Geyer, E. (1989). *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralb fur Bakteriologie*, **271**: 510-520.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laralde, C., Sotelo, J., Montoya, R. M., Palencia G., Padilla, A., Govezensky, T., Diaz, M. L. & Sciutto, E. (1990). Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **114**, 926-928.
- Lowry, H. L., Rosebrough, N. J. & Farr, A. L. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Mahajan, R. C. (1982). Geographical distribution of human cysticercosis. In: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, Flisser, A. (editor). New York: Academic Press, pp. 39-46.
- Ministério da Saúde, Brasil. *Normas Técnicas para Coleta, Processamento e Transfusão de Sangue e Derivados*. (1989). Diário Oficial da União, Portaria nº 721, de 11 de Agosto.
- Pialarissi, C. S. M., Vaz, A. J.; Souza, A. M. C., Nakamura, P. M., Camargo, E. D., Silva, M. V. & Ueda, M. (1987). Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **2**, 367-373.
- Sasaki A. T., Hoshino-Shimizu S., Nakamura P. M., VAZ A. J., Camargo E. D., Silva M. V. (1996) Sorodiagnóstico da Doença de Chagas: novo reagente para o teste de hemaglutinação indireta. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*, **29**, 1377-1344.
- Siegel, S. (1975). *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo: McGraw-Hill, pp. 183-188.
- Spina-França, A., Livramento, J. A. & Machado, L. R. (1993). Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1962). *Arquivos de Neuropsiquiatria*, **51**, 16-20.
- Studier, F. W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *Journal of Molecular Biology*, **79**, 237-248.
- Ueda, M., Vaz, A. J.; Camargo, E. D., Souza, A. M. C., Benelli, R. M. F. & Silva, M. V. (1988) Passive haemagglutination test for human neurocysticercosis immunodiagnosis. II - Comparison of two standardized procedures for the passive haemagglutination reagent in the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluids. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **30**, 57-62.
- Vaz, A. J., Machado, A. B. B., Nunes, C. M., Silva, M. V. & Piazza, R. M. F. (1991) Utilização de líquido vesicular de *Cysticercus longicollis* no teste ELISA para o imunodiagnóstico da neurocisticercose humana (comunicação). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **24**(supl I), 176.
- Vaz, A. J., Nunes, C. M., Piazza, R. M. F., Livramento, J. A., Silva, M. V., Nakamura, P. M., Ferreira, A. W. (1997) Immunoblot in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. (1996). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **57**: 354-357.