

# RIBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

## SUMÁRIO

<b>Avaliação da soroconversão pós vacina recombinante de hepatite B em alunos do curso de enfermagem da Universidade do Oeste do Paraná</b> .....	2
<i>A. Largura; N. M. Gioppo; M. Piccoli; E. D. Gonçalves; A. M. Costa; T. Costa; I. C. Suldołski; C. R. Bortoli; D. Marcon; F. A. Kurscheidt; D. P. Costa &amp; M. A. Largura</i>	
<b>Evaluation of the seroconversion rate after hepatitis B recombinant vaccine given to nursing students at the Universidade do Oeste do Paraná</b> .....	5
<b>Ação redutora da vitamina C em bioquímica clínica</b> .....	5
<i>Antenor H. P. Pedrazzi; Elcio Rivelino Rodrigues &amp; Antonio Zanardo Filho</i>	
<b>Vitamin C reduction on clinical biochemistry</b> .....	
<b>Positividade de culturas microbianas durante o processamento da medula óssea e de células-tronco periféricas</b> .....	7
<i>Celso Massumoto; Luciana A.G.Silva; Sally Mizukami; Maria F.Campos; Clarisse Machado &amp; Dalton Chamone</i>	
<b>Positivity of microbial culture during the processing of bone marrow and peripheral blood stem cells</b> .....	
<b>Níveis plasmáticos de ácido ascórbico em pacientes infectados pelo HIV após suplementação com acerola (Malpighia glabra L.)</b> .....	9
<i>Sônia de Lucena Mioranza; Maria José de Carvalho Costa; Maria Amélia Amado Rivera &amp; Joana D'arc da Silveira Frade</i>	
<b>Plasmatic levels of ascorbic acid in patients infected by HIV after the supplementation with "acerola" (Malpighia glabra L.)</b> .....	
<b>O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina III - Testes para função espermática</b> .....	13
<i>Fernando Tadeu Andrade-Rocha</i>	
<b>The role of semen analysis in the male infertility III- Sperm function tests</b> .....	
<b>Ocorrência de leveduras do gênero Candida em urina de pacientes diabéticos no Hospital Universitário, Florianópolis, Santa Catarina</b> .....	22
<i>Jairo Ivo dos Santos; Michele Lyssandra Masutti; Vanessa Regina Berenhauser; Berenice Pagani Nappi &amp; Edney Rovere da Silveira</i>	
<b>Yeasts occurrence of Candida genera in urine from diabetic patients in the Hospital Universitário, Florianópolis, Santa Catarina</b> .....	
<b>Distribuição da microbiota anemófila em ambiente hospitalar (Campina Grande, PB)</b> .....	25
<i>R. M. R. Catão; E. O. Lima; K. V. M. Vieira; L. F. V. A. Gomes &amp; B. S. O. de Ceballos</i>	
<b>Anemophilic microbiota distribution in a hospital environment (Campina Grande, PB)</b> .....	
<b>Freqüência de Cryptosporidium sp associada à pacientes com diarréia em Ribeirão Preto - SP</b> .....	31
<i>Carlos Henrique Gomes Martins; Fabiola Attié de Castro; Vanda Roseli dos Santos &amp; Roberto Martinez</i>	
<b>Frequency of Cryptosporidium sp among patients with diarrhea in Ribeirão Preto- SP</b> .....	
<b>Determinação simultânea de VMA, 5HIAA e HVA urinários sem extração</b> .....	33
<i>Cheng M.H.; Lipsey A.I.; Lee J. &amp; Gramache P.H.</i>	
<b>Simultaneous determination of urinary VMA, 5HIAA and HVA without extraction</b> .....	

1

# **Ação Redutora da Vitamina C**

## **em Bioquímica Clínica**

Antenor H.P. Pedrazzi \*  
Élcio Rivelino Rodrigues \*\*  
Antonio Zanardo Filho \*\*\*

# **Vitamina C Reduction on Clinical**

## **Biochemistry**

\* Professor Titular em Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

\*\* Mestrando em Análises Clínicas

\*\*\* Técnico Especialista de Nível Superior da Disciplina de Bioquímica Clínica FCFRP/USP.

## RESUMO

A vitamina C é consumida consciente e inconscientemente em larga escala pela população, quer seja na forma de medicamentos individuais ou associados, na forma de conservante de alimentos, na forma de frutas, entre outras.

Devido ao acentuado poder de redução do sal, pode, quando presente no soro de pacientes, alterar “In vitro”, os resultados de análises laboratoriais levando a um falso diagnóstico clínico.

Os resultados nos mostram que metodologias analíticas empregadas para a quantificação de parâmetros bioquímicos séricos podem ser sensíveis “In vitro” à presença da vitamina C, sendo a ação interferente influenciada pelo nível sérico do medicamento.

## ABSTRACT

Vitamin C is consumed conscious and unconsciously in a large quantity by the population, in form of associated medicaments or not, in form of conservative of foods, in form of fruits, and so on.

Due to the high capacity of reduction of the salt, it can, when present in patient's serum, to modify “In Vitro”, the results of the laboratorial analysis, occasioning a false clinical diagnostic.

The results show us that analytical methodologies used for the quantification of the seric biochemical parameters can be sensible “In Vitro” to the presence of the vitamin C, and the interfering action influenced by seric level of the medicament.

Palavras Chave

**Vitamina C, Bioquímica Clínica,  
Ação Interferente de Medicamentos,**

**Key words.**

**Vitamin C, Clinical Biochemistry,  
Interfering Action, Medicaments,**

## INTRODUÇÃO

A vitamina C tem, nos dias de hoje, sido intensa e inconscientemente consumida pela população. Como medicamento é consumida em altas doses (comprimidos de até 2,0 gramas) conteúdo de um único comprimido, como é também consumida em associações medicamentosas juntamente com a aspirina e outros antigripais. Além desta forma a vitamina C é bastante empregada como eficiente conservante de alimentos devido ao poder redutor da substância, sendo desta forma consumida inconscientemente em larga escala pela população. Este alto consumo pode não por em risco a saúde dos pacientes, mas em determinadas circunstâncias, pode alterar significativamente o resultado de uma análise laboratorial levando o clínico à um falso diagnóstico, que se não corrigido em tempo pode leva-lo inclusive ao óbito.

O nível terapêutico da vitamina C como agente terapêutico é de 0,8 mg/dl (0,045 mmol/l) que é obtido pela ingestão diária de 60mg de fármaco<sup>1,2</sup>. Portanto cada comprimido de 500mg eleva acentuadamente o nível sérico e, devido ao baixo limiar de excreção renal do sal (1,5mg/dl - 0,085mmol/l) há eliminação urinária de aproximadamente 40mg/dl (2,87 mmol/l) quantidade esta suficiente para tornar negativa a quantificação de uma glicosuria de 100mg/dl (5,4 mmol/l) quando quantificada pela tira de reagentes com metodologia segundo Trinder<sup>3,4</sup>.

Níveis séricos em torno de 10mg/dl (2.88 mmol/l) de vitamina C provocam trinta e noventa por cento de inibição na determinação de glicemia e uricemia respectivamente, propiciando, falsos resultados quando a quantificação é feita pelas tiras reagentes fundamentadas na reação de Trinder<sup>5</sup>.

## OBJETIVO

Avaliar a ação redutora da vitamina C, em diferentes níveis terapêuticos, sobre metodologia analítica laboratorial empregada para a quantificação de parâmetros bioquímicos séricos “ In vitro”.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi preparado um “pool” de soros humanos de indivíduos sem uso de medicamentos e sem suspeita de algum estado patológico, sendo a vitamina C adicionada em níveis terapêuticos de 5,0mg/dl (0,28mmol/l) e de 10,0mg/dl (0,56mmol/l). O mesmo “pool”, sem a presença do medicamento foi usado como controle. As quantidades do medicamentos foram adicionadas ao “pool”, imediatamente antes do início das quantificações, para evitar a decomposição natural da substância.

Os parâmetros bioquímicos séricos avaliados e respectiva metodologia de quantificação foram: glicose quantificada pelo sistema glicose e oxidase peroxidase (Trinder, 1969)<sup>6</sup>, pela hexoquinase (Widdowson & Penton, 1972)<sup>7</sup> e glicose desidrogenase (Banauch, 1975)<sup>8</sup>. Urea quantificada por Berthelot ( Fawcett & Scott, 1960)<sup>9</sup> e pela urease no método UV ( Talke & Schubert, 1965)<sup>10</sup>. Creatinina por Caraway (1962)<sup>11</sup>, Cinético ( Heinegard & Tiderström, 1973)<sup>12</sup> e da creatinina verdadeira (Lustgarten & Wenk, 1972)<sup>13</sup>. Ácido úrico pela uricase oxidase DHBS (Fossati et al.,1980)<sup>14</sup> e Caraway (1955)<sup>15</sup>. Colesterol pelo colesterol oxidase e peroxidase.

As análises foram desenvolvidas em quintuplicatas em autoanalisadores de marca Abbott modelo Abba VP e os cálculos estatísticos foram pela análise não paramétrica de Welch (1973)<sup>17</sup> com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados nos mostra que a presença de vitamina C em amostras de soro pode alterar, “in vitro” alguns resultados das determinações levando o clínico à um possível erro de diagnóstico. Nos mostra também, que a ação interferente ocorre em função do nível sérico do medicamento e principalmente da metodologia analítica empregada para a quantificação do parâmetro bioquímico estudado.

A quantificação da glicose não mostrou ser sensível aos níveis séricos da vitamina C quando foram empregadas as metodologias fundamentadas nos sistemas hexoquinase e glicose desidrogenase. No entanto quando quantificadas pelo sistema enzimático glicose-oxidase-peroxidase (Trinder, 1969)<sup>9</sup>, os resultados estatísticos foram significativos para ambos níveis de vitamina C avaliados (Figura 1). Considerando-se a variação percentual dos resultados pode-se perceber que o sistema enzimático de Trinder foi inibido pela presença de vitamina C provocando um falso resultado com até 15% de inibição para o maior nível do medicamento estudado (Figura 1).

A quantificação da uréia pelo método enzimático colorimétrico - reação de Berthelot também apresentou resultados estatisticamente significativos embora a inibição da reação na ordem de aproximadamente 3 a 5%, tenha sido somente para a maior concentração do medicamento (Figura 1).

A análise dos resultados da quantificação da creatinina pelos três métodos propostos nos mostram uma semelhança com a quantificação da glicose. Foram estatisticamente sensíveis à ação da vitamina C a metodologia que quantifica a creatinina verdadeira (Heinegard e Triderström, 1973)<sup>12</sup> e a metodologia proposta por Caraway (1962)<sup>11</sup> sendo a metodologia cinética não sensível porquanto os resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 2). A análise da variação percentual dos resultados mostrou, ao contrário do ocorrido com a determinação da glicose, que o poder redutor da vitamina C provocou o aparecimento de discretos resultados falsamente positivos com um percentual de 5% somente para a maior concentração do medicamento (Figura 1).

As quantificações do ácido úrico, colesterol e triglicérides foram sensíveis ao poder redutor da vitamina C às reações fundamentadas no sistema enzimático de Trinder baseados na ação da uricase oxidase, colesterol oxidase e glicerol oxidase, respectivamente. O poder redutor da vitamina C exerceu ação inibidora sobre os sistemas enzimáticos provocando o aparecimento de resultados falsamente negativos sendo a uricase oxidase e a glicerol oxidase as enzimas mais sensíveis, apresentando os maiores percentuais de inibição para ambas as concentrações dos medicamentos (Figura 1).

## CONCLUSÕES

A vitamina C interfere “In vitro” em parâmetros bioquímicos em função do nível sérico e em função da metodologia analítica empregada para a quantificação do parâmetro, havendo diferente sensibilidade entre elas, fato este que permite ao analista clínico fornecer um resultado laboratorial que não tenha influência do medicamento, empregando a adequada metodologia laboratorial, procedimento este de extrema valia para a saúde do paciente e tranquilidade de trabalho para o clínico e analista clínico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - Gilman, A. G. Goodman and Gilman's. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. MacGrawHill ed. 9ª ed. p. 453-65 e 1212-93, Rio de Janeiro, 1996.
- 02 - Reynolds, J.E F. Martindale. The Extra Pharmacopeia. *Pharmaceutical Press*, 30ª ed. p. 10-2, London, 1993.
- 03 - Khol, N. Stormnengen der glucosen - anzerg durch ascorbinsaure sei teststreifen laboratorium sb/latter *Bol. Inf. Behringwerke* 27: 103, 1973.
- 04 - Pedrazzi, A.H.P. Interferência de medicamentos nos resultados das análises clínico-laboratoriais *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v. 18, n. 2, p. 33-7, 1986
- 05 - Pedrazzi, A.H.P.; Rodrigues, E.R.; Franco, J.J.; Zanardo Filho, A. Ação Interferente do Ácido Ascórbico no Doseamento da Glicose Sérica e Urinária e do Ácido Úrico Sérico, "In Vitro". *Laes & Haes*, vol. 106, p. 98-106, 1997.
- 06 - Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, v. 6, p. 24, 1969.
- 07 - Widdowson, G.M.; Penton, J.R. Determination of serum or plasma glucose on the "AutoAnalyzer II" by use of the hexokinase reaction. *Clin. Chem.*, v. 18, n. 3, p. 299-300, 1972.
- 08 - Banauch, D. et al. Glucose desidrogenase for the determination of glucose concentrations in body fluids. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, v. 13, p. 101-107, 1975.
- 09 - Fawcett, J.K.; Scott, J.E. A rapid and precise method for determination of urea. *J. Clin. Pathol.*, v. 13, n. 1, p. 156-9, 1960.
- 10 - Talke, H.; Schubert, G.E. Enzymatische harnstoffbestimmung in blut ind serum in optischen test nach warburg. *Klin. Woch.*, v. 43, p. 174-5, 1965.
- 11 - Caraway, W.T. Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests. Effect of hemolysis, lipemia, anticoagulants, medications, and other variables. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 37, n. 5, p. 445-64, 1962.

- 12 - Heinegard, D. & Tiderström, G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 43: 305-310, 1973.
- 13 - Lustgarten, J.A.; Wenk, R.E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. *Clin. Chem.*, v. 18, n. 11, p. 1419-22, 1972.
- 14 - Fossati, P.; Prencipe, L. & Berti, G. Use of 3,5-dicloro-2-hydroxy benzene sulfonic acid/4-aminophenazine acid in serum and urine. *Clin.Chem.*, 26: 2, 227-231, 1980.
- 15 - Caraway, W.T. Determination of uric acid in serum by a carbonate method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 25, n. 7, p. 840-5, 1955.
- 16 - Huang, C. et. al. A stable reagent for the Lieberman-Burchard reaction, application to rapid cholesterol determinations. *Anal. Chem.*, v.33, n. 10, p. 1405-7, 1961.
- 17 - Welch, B.L. The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika*, v. 29, n. 4, p. 350-61, 1973.



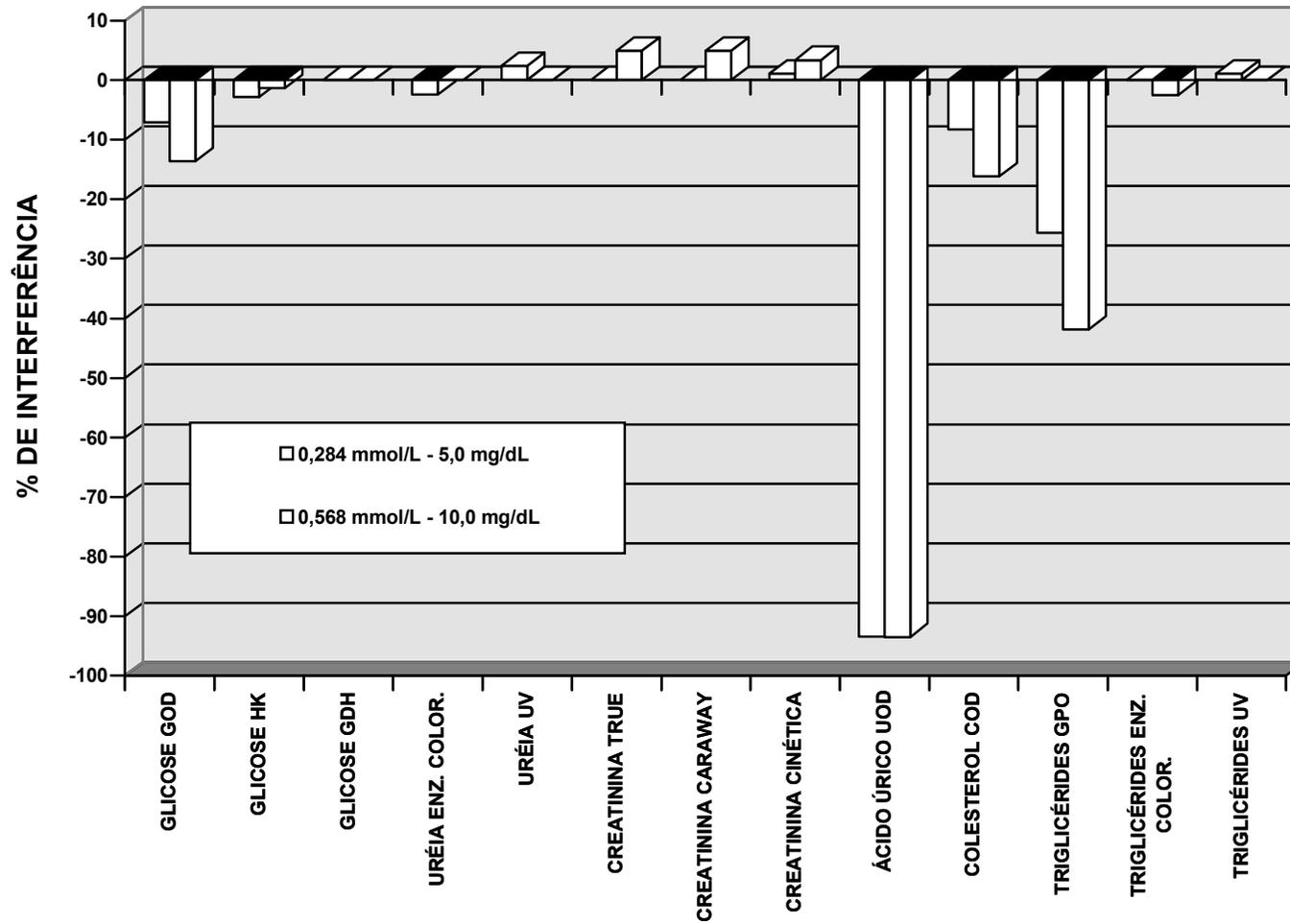


Figura 1 - VALOR PERCENTUAL DA INTERFERENCIA "IN VITRO" DE DIFERENTES NÍVEIS TERAPÊUTICOS DA VITAMINA C.

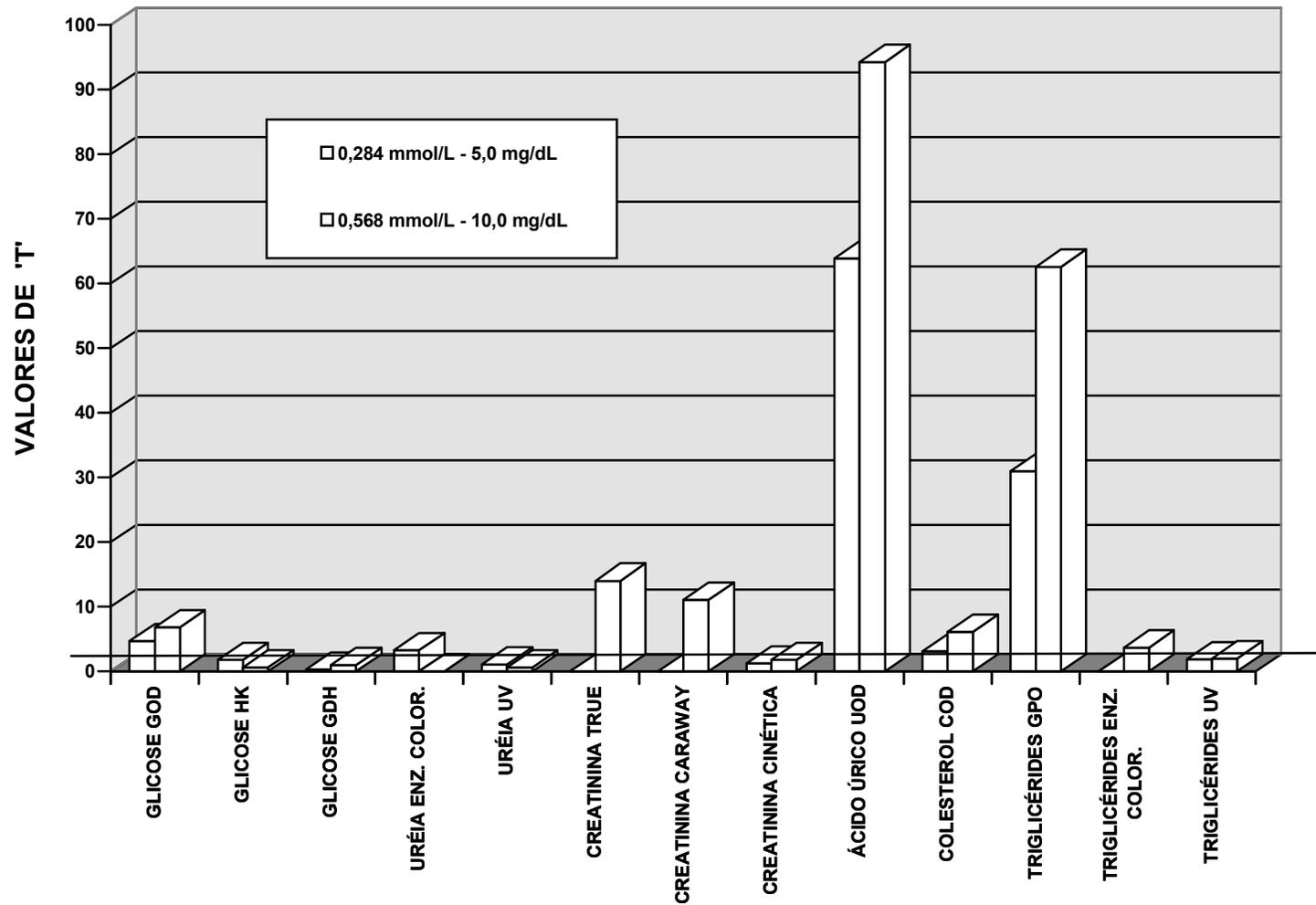


Figura 2 - VALORES 'T' PARA INTERFERÊNCIA DA VITAMINA C EM DIFERENTES NÍVEIS TERAPÊUTICOS



## **AVALIAÇÃO DA SOROCONVERSÃO PÓS VACINA RECOMBINANTE DE HEPATITE B EM ALUNOS DO CURSO DE ENFERMAGEM DA UNIVERSIDADE DO OESTE DO PARANÁ**

Largura, A.<sup>1</sup> ; Gioppo, N.M.<sup>2</sup> ; Piccoli, M.<sup>2</sup> ; Gonçalves, E.D.<sup>1</sup>; Costa, A.M.<sup>1</sup>; Costa, T.<sup>1</sup>; Suldofski, I.C.<sup>1</sup>; Bortoli, C.R.<sup>1</sup>; Marcon, D.<sup>1</sup>; Kurscheidt, F.A.<sup>1</sup>; Costa, D.P.<sup>1</sup>; Largura, M.A.<sup>1</sup>

### **RESUMO**

Profissionais e estudantes da área de saúde (PEAS), são grupos de risco suscetíveis a contaminação com o vírus da hepatite B (VHB). A vacinação sistemática é altamente recomendada, no entanto os exames sorológicos pré e pós vacinas não são indicados por alguns serviços de saúde pública no Brasil. Neste estudo foram avaliados os resultados dos marcadores sorológicos de 63 alunos do curso de Enfermagem da Universidade do Oeste do Paraná, pré e pós vacina contra a hepatite B. Nos resultados das análises pré vacina, foram encontrados 11 (17,5 %) com um ou mais marcadores positivos para o HBV, assim distribuídos: 06 (9,5 %) anti HBc positivo, 01 (1,6 %) anti HBc e anti HBe positivo, 02 (3,2 %) anti HBc, anti HBe e anti HBs positivo, 02 (3,2 %) anti HBc, anti HBe e HBs Ag positivo. Os demais 52 (82,5 %) todos os marcadores foram negativos. Após a terceira dose da vacina, a taxa de soroconversão foi de 80,7 %. Os autores concluem que para populações de risco onde as taxas de soroconversão são baixas, é prudente a realização de testes pré e pós vacina para o VHB.

**PALAVRAS CHAVE :** Hepatite B Imunização . Vacina contra a hepatite B . Profissionais da área de saúde . Estudantes de Enfermagem.

<sup>1</sup> Laboratório Álvaro, Cascavel, PR

<sup>2</sup> Curso de Enfermagem, Odontologia e Medicina da Univ. do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR.



## **EVALUATION OF THE SEROCONVERSION RATE AFTER HEPATITIS B RECOMBINANT VACCINE GIVEN TO NURSING STUDENTS AT THE UNIVERSIDADE DO OESTE DO PARANÁ**

Healthcare workers and healthcare students (HCWS) are risk groups which are susceptible to contamination with the hepatitis B virus (HBV). Systematic vaccination is highly recommended, but serologic tests before and after vaccination are not indicated for some public health services in Brazil. The purpose of this study was to evaluate the results of the serologic markers of 63 students taking the Nursing course at the Universidade do Oeste do Paraná, before and after hepatitis B vaccination. The results of the analysis before vaccination were as follows: 11 persons (17.5%) had one or more positive HBV markers, of whom 6 (9.5%) had positive anti-HBc, 1 person (1.6%) had positive anti-HBc and anti-Hbe, 2 (3.2%) had positive anti-HBc, anti-Hbe and anti-HBs, 2 (3.2%) had positive anti-HBc, anti-Hbe and HBs Ag. Of the other 52 persons all the markers were negative. After the third dose of vaccine the seroconversion rate was 80.7%. The authors come to the conclusion that for the risk groups with low seroconversion rates it is sensible to conduct tests before and after vaccination.

Key words: hepatitis B immunization. hepatitis B vaccine. healthcare workers. Nursing students.

## INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e as suas consequências agudas e crônicas são problemas relevantes de saúde pública em todo o mundo. Anualmente morrem 1 milhão de pessoas com cirrose, doença crônica do fígado e carcinoma hepatocelular em consequência da infecção pelo VHB<sup>1</sup>.

A transmissão do vírus do VHB é feita pelas vias parenteral, sexual e vertical. Diversos mecanismos de transmissão foram descritos em ambiente hospitalar. A transmissão pela via percutânea é a mais comum, podendo ocorrer com quantidade mínima de sangue infectado. Pacientes que são HBe Ag positivos representam um grande risco devido a altos níveis de VHB circulante. A transmissão após exposição percutânea é de aproximadamente 30 %<sup>2</sup>. Outros mecanismos incluem o contato de sangue infectado com mucosas, ou pele com soluções de continuidade, acidentes durante o ato cirúrgico e contaminação por fômites<sup>3</sup>.

A vacinação sistemática de indivíduos suscetíveis a infecção pelo HBV é a maneira mais segura de controlar a morbidade e mortalidade associadas à hepatite B<sup>4</sup>.

A infecção pelo VHB é reconhecida como a infecção de maior risco ocupacional em PEAS<sup>5</sup>. No público em geral o risco é de 5 % e de 15 a 20 % em PEAS<sup>6</sup>.

Níveis protetores de anticorpos são produzidos em 95 % dos adultos sadios após a terceira dose da vacina contra o VHB<sup>7,8,9</sup>. Devido ao alto nível de soroconversão e presumida imunogenicidade, a rotina de testes pós vacinação não é recomendada<sup>7</sup>. Habitualmente testar a suscetibilidade em adultos fazendo teste pré-vacinação não é indicado. A decisão para o teste deve ser baseada na possibilidade dos custos dos mesmos serem compatíveis com os custos da

vacina economizadas pela não vacinação das pessoas já infectadas. O teste pós vacinação deve ser considerado para pessoas em risco ocupacional que podem estar expostas a lesões com instrumentos pontiagudos, porque o conhecimento de suas resposta imune irá ajudar na determinação da profilaxia adequada na pós exposição<sup>10,11</sup>.

Entre os vacinados que desenvolvem adequados níveis de anticorpos a efetividade é virtualmente 100 %. Os níveis de anticorpos decrescem com o tempo. Após 7 anos, 50 % dos vacinados apresentam baixos ou indetectáveis níveis de anticorpos. A necessidade de uma dose de reforço após o decaimento dos títulos de anticorpos é ainda objeto de discussão e debate internacionalmente<sup>8</sup>.

Todos os estudos de soroconversão após vacina preparada com tecnologia de DNA recombinante tem mostrado que 5 a 10 % da população sadia é imunoincompetente e não respondem produzindo anticorpo ( anti HBs ) ao componente antigênico de superfície ( HBs Ag) presente nas preparações ou que respondem fracamente. Considera-se imunocompetentes os indivíduos que produzem níveis de anti HBs maiores que 100 mUI/mL, fracamente competentes os níveis entre 10 e 100 mUI/mL e imunoincompetentes os que produzirem níveis abaixo de 10 mUI/mL<sup>12, 13, 14</sup>.

O trabalho realizado tem como objetivo avaliar os padrões sorológicos encontrados pré e pós-vacinação contra o VHB, o percentual de soroconversão e a necessidade da realização de testes pré e pós-vacinação em uma população de jovens estudantes do curso de enfermagem potencialmente suscetíveis a contaminação pelo VHB.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na região Oeste do Paraná (Cascavel) onde há alta prevalência de hepatite B<sup>15</sup>. Foram vacinados 63 estudantes voluntários do curso de Enfermagem da Universidade do Oeste do Paraná ( UNIOESTE), atualmente residentes em Cascavel, provenientes de 38 cidades dos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Ceará. Eram 59 mulheres e 4 homens com idades variando entre 18 e 36 anos. Nenhum dos indivíduos estudados apresentou história clínica pregressa de infecção pelo VHB . Foram vacinados com 3 doses ( 20 ug de proteína antigênica em 1,0 mL de suspensão) da vacina contra o VHB aos 0, 1 e 6 meses aplicados intra-muscular na região do deltóide. A vacina usada foi a Engerix-B, do Laboratório SmithKline Beecham, um preparado de DNA recombinante que contém o antígeno de superfície purificado do vírus, produzido em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente manipuladas, que levam o principal gene do antígeno de superfície do vírus da hepatite B ( 20 µg de HBs Ag adsorvido em hidróxido de alumínio como adjuvante com 1:20000 de tiomersal). A primeira coleta de sangue foi realizada imediatamente antes da administração da primeira dose da vacina e a segunda coleta, 90 dias após a terceira dose da vacina. Em todos os indivíduos foi realizada a pesquisa dos seguintes marcadores sorológicos do VHB, por técnica imunoenzimática de micropartículas (MEIA): Determinação qualitativa do Antígeno de superfície do VHB (AxSym HBs Ag), determinação quantitativa do Anti HBs Ag (AxSym Ausab), determinação qualitativa do Anti HBc (AxSym Core) e determinação qualitativa do Anti HBe ( AxSym anti HBe), do Laboratórios Abbott

(North Chicago, IL - USA).

## **RESULTADOS**

A TABELA 1 apresenta os diversos perfis sorológicos encontrados na população estudada. Das 63 amostras de soros analisadas pré imunização com a vacina da hepatite B, 52 (82,6 %) apresentaram todos os marcadores sorológicos do VHB negativos, 6 (9,5 %) com anti HBc positivo, 1 (1,6 %) com anti HBc e Anti HBe positivo, 2 (3,2 %) com anti HBc, anti HBe e Anti HBs positivo e 2 (3,2 %) com anti HBc, Anti HBe e HBs Ag positivo.

A TABELA 2 apresenta os níveis sorológicos de anti HBs após a imunização, das 52 amostras de soros, 42 (80,7 %) mostram níveis de anti HBs maiores que 10 mUI/L (ímmunes), 3 (5,8 %) com níveis entre 10 e 100 mUI/mL (parcialmente ímmunes) e 10 (19,2 %) com níveis inferiores a 10 mU/L (não ímmunes).

Dos 9 soros que apresentaram um ou mais marcadores positivos (TABELA 3), pré imunização, em somente 1 caso (anti HBc e anti HBe positivos) houve soroconversão (anti HBs > 2.000 mU/L).

**TABELA 1 - PREVALÊNCIA DOS MARCADORES SOROLÓGICOS DO VHB PRÉ IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DE HEPATITE B.**

<b>Testes</b>	<b>Resultado</b>	<b>N<sup>o</sup></b>	<b>%</b>
Anti HBc	Positivo	06	9,5
Anti HBc e Anti HBe	Positivo	01	1,6
Anti HBc, Anti HBe e Anti HBs	Positivo	02	3,2
Anti HBc, Anti HBe e HBs Ag	Positivo	02	3,2
Todos marcadores para Hepatite B	Negativo	52	82,5

**TABELA 2 - NÍVEIS SOROLÓGICOS DE ANTI HBs APÓS A IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DE HEPATITE B DOS 52 ALUNOS QUE APRESENTARAM TODOS OS MARCADORES SOROLÓGICOS NEGATIVOS PRÉ IMUNIZAÇÃO**

<b>Anti HBs (mUI/mL)</b>	<b>N<sup>o</sup></b>	<b>%</b>
0 -10	10	19,2
10 - 100	03	5,8
100 - 200	01	1,9
200 - 500	07	13,5
500 - 1000	08	15,4
1000 - 2000	06	11,5
> 2000	17	32,6

**TABELA 3 - NÍVEIS SOROLÓGICOS DE ANTI HBs APÓS IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DE HEPATITE B DOS 9 ALUNOS QUE APRESENTARAM UM OU MAIS MARCADORES SOROLÓGICOS POSITIVOS PRÉ IMUNIZAÇÃO.**

<b>Testes</b>	<b>Resultado</b>	<b>N<sup>o</sup></b>	<b>Anti HBs(mUI/mL)</b>
Anti HBc	Positivo	06	< 10
Anti HBc e Anti HBe	Positivo	01	> 2000
Anti HBc, Anti HBe e HBs Ag	Positivo	02	< 10

## **DISCUSSÃO**

A prevalência de anti HBc isolado nas diversas populações varia de 0,1 a 20 %. Altas taxas têm sido encontradas em populações onde a infecção pelo VHB é endêmica<sup>15,16,17</sup>. As estatísticas do HEMEPAR ( Instituto de Saúde do Paraná – Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná) mostram uma prevalência de anti HBc positivo em 1995 e 1996 de 33,8 % e 31,1 % na região Oeste do Paraná<sup>15</sup>. No presente estudo encontrou-se 17,4 % ( 11/63) anti HBc positivo, sendo que 9,5 % ( 6/63) apresentaram somente este marcador isolado. A diferença entre os dados do HEMEPAR<sup>15</sup> ( 33,8 % e 31,1 % de anti HBc positivo ) e os dados encontrados entre os 63 alunos do curso de enfermagem da UNIOESTE ( 17,4 %) deve-se a origem dos alunos, quase na totalidade ( 90 %) provenientes de diversas cidades do estado do Paraná e do Brasil.

A incidência de portadores assintomáticos do VHB ( HBs Ag positivo) é variável nas diversas regiões do estado do Paraná, em Curitiba 0,5 %, Londrina 0,7 %, Maringá 0,5 % e Cascavel 2,5 %<sup>15</sup>. No presente estudo encontrou-se 3,2 % (2/63) portadores assintomáticos do VHB com HBs Ag positivos .

Nos programas de imunização dos PEAS, um aspecto controverso é a indicação dos testes pré vacina para verificar a suscetibilidade a infecção e os testes pós vacinação para verificação das respostas imunológicas. No estado do Paraná, a secretaria de Saúde Pública tem

implementado programas de vacinação em toda a população de risco, no entanto os testes pré e pós vacinação não são realizados devido aos altos custos gerados pelos exames imunológicos. Estas análises de custos ao serem reavaliadas normalmente omitem os custos decorrentes do tratamento e consequências de uma hepatite crônica ativa (HCA) pelo VHB. Os custos diretos e indiretos da hospitalização, ausência ao trabalho atingem cifras de US\$ 1.734 (um mil e setecentos e trinta e quatro dólares americanos), para cada internamento<sup>8</sup>.

Diversos autores descrevem que níveis adequados de anticorpos são produzidos em 90 a 100 % de adultos sadios que receberam as três doses de vacinação contra a hepatite B<sup>7,8,9</sup>. A análise dos resultados apresentados neste trabalho mostram que somente 80,7 % (42/52) dos indivíduos vacinados obtiveram uma resposta imune adequada (níveis de anti HBs maiores que 10 mUI/mL) e que 19,2 % (10/52) não desenvolveram imunidade (níveis de anti HBs menores que 10 mUI/mL). Dos 42 casos considerados como imunes pós vacina, 3 (5,8 %) destes apresentaram níveis de anti HBs entre 10 e 100 mUI/mL, considerado uma resposta imunológica fraca. Alguns estudos discutem os resultados que apresentam níveis de anti HBs formados após a vacina contra o VHB, principalmente quando os mesmos estão entre as faixas de 10 a 100 mUI/mL, considerando-os fracamente imunocompetentes, permanecendo estes, potencialmente suscetíveis a infecção pelo VHB<sup>4,13,14,19</sup>. Infecção assintomática pelo HBV foi observada após a imunização em profissionais que trabalham em unidades de nefrologia (índices de 0,8 %), os quais tinham níveis de anti HBs menores que 50 mUI/mL<sup>20</sup>. Foi demonstrado que as respostas fracamente imunocompetentes (níveis de anti HBs entre 10 mUI/mL e 100 mUI/mL), quando vacinados com uma dose adicional, após 4 dias os níveis de anti HBs aumentam rapidamente<sup>21</sup>. Existem numerosos trabalhos descritos na literatura demonstrando que após a aplicação de 4,5,6 ou mais doses adicionais da vacina em

imunoincompetentes ou fracamente imunocompetentes, resultam em soroconversão em 50 % dos casos<sup>13,19,22</sup>.

Diversos fatores devem ser levados em conta na avaliação da resposta imune e são complexas e pouco conhecidas as razões pelas quais indivíduos adultos sadios não respondem de forma satisfatória a vacinação contra a hepatite B, alguns estudos incluem: o sítio da injeção, idade, sexo, fumo, imunossupressão, fatores genéticos e psíquicos<sup>4,23,20,24</sup>.

Aproximadamente 80 a 90 % dos PEAS imunocompetentes mantêm níveis protetores de anti HBs durante 9 anos<sup>25</sup>. A necessidade de uma reavaliação futura do estado imune para avaliar o decaimento dos títulos de anti HBs devem ser consideradas tendo em vista o alto risco ocupacional dos PEAS e a possibilidade da aplicação de doses adicionais da vacina anti VHB.

Demonstrado no presente trabalho a alta prevalência de resposta imunes inadequadas (19,3 %) e em alguns casos respostas fracamente imunocompetentes (5,8 %), os autores concluem que os testes pré e pós vacina são úteis e imprescindíveis na avaliação imunológica dos PEAS, tanto para identificar portadores assintomáticos do VHB, como para avaliar a soroconversão e sugerem uma avaliação sorológica quantitativa (anti HBs) em todos os profissionais da área médica de Cascavel e região Oeste do Paraná que foram vacinados contra o VHB.



## AGRADECIMENTOS

Aos alunos do curso de enfermagem da UNIOESTE pela colaboração no fornecimento dos dados e a coleta de sangue e ao LABORATÓRIO ABBOTT que colocou à disposição do Laboratório Álvaro todos os kits para as análises dos marcadores sorológicos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Progress in the control viral hepatitis. Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO, 66, p. 443-445, 1988.
2. **Alter, H.J.; Seef L.B.; Kaplan PM. & cols.** Type b hepatitis : the infectivity of blood positive for e antigen and DNA polymerase after accidental needlestick exposure. NEJM ; 295:909-13, 1976.
3. **Maynard, J.E.** Nosocomial viral hepatitis. American Journal of medicine, 70 p. 439-444, 1981.
4. **Zuckerman, J.N.** Nonresponse to Hepatitis B Vaccines and the Kinetics of Anti-HBS. J. Med Virol, 50. p. 283-288, 1996.
5. **Chew, T.** Prevention of Hepatitis B in Health care workers. NZ Med J, 110(1047):258,1997.
6. **Murray, D.Z. & cols.** Protecting tomorrow's health care professionals against hepatitis B today. Arch Intern Med., 151, p. 1069-70, 1991.
7. **Dahl-Hansen, E.; Siebke, J.C.; Froland, S.S. & Degree, M.** Immunogenicity of yeast-derived hepatitis B vaccine from two different producers. Epidemiol Infec, 104 p. 143-149,1990.
8. **Wood, R.C.; Macdonald, K.L.; White, K.E.; Hedberg, C.W.; Hanson, M. & Osterholm, M.T.** Risk factors for lack of detectable antibody following hepatitis B vaccination of Minnesota health care workers. Jama, 270, p. 2935-2939, 1993.
9. **Marshall, B.I.** Screening and Vaccination for Hepatitis B in Hong Kong University Students. J. Am Coll Health, 44(2). p.59-62, 1995.
10. CDC. Public Health Service inter-agency guideline for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis C. MMWR. 40:5-6,1991.
11. CDC. Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public-safety workers.MMWR, 38(suppl 16):5-15, 1989.
12. Center for Disease Control. Update on adult immunization: Recommendations of the Immunization. Practices Advisory Committee (ACIP). MMWR. 40( no. RR-12):1-94,1991.
13. **Craven, D.E.; Awdeh, Z.L; Kunches, L.M.; Yunis, E.J.; Diestag, J.L.; Werner, B.G.;**

- Polk, F.; Snyderman, D.R.; Platt, R.; Crumpacker, C.S.; Grady, G.F. & Alper, C.A.** Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in health care workers. *Annals of Internal Medicine*, 105, p. 356-360, 1986.
14. **Dienstag, J.L.; Werner, B.G.; Polk, F.; Snyderman, D.R.; Craven, D.E.; Platt, R. & cols.** Hepatitis B vaccine in health care personnel : Safety, immunogenicity, and indicators of efficacy. *Annals of Internal Medicine*, 101, p. 30-34, 1984.
  15. **Largura, M.A.** Ausência do HBV-DNA por PCR em soros de doadores de sangue com HBs Ag negativo e anti HBc positivo em região de alta prevalência de hepatite B. Monografia experimental – tit. Especial. *Imunologia – UFPR*, 1996.
  16. **Coursaget, P.; Yvonnet, B.; Chotard, J.N.; Sarr, N.; Vincelot, P. & Chiron, J.P.** Seven-year study of hepatitis B vaccine efficacy in infants from an endemic area (Senegal). *Lancet* 2:1143-1145, 1986.
  17. **Taylor, P.E. & Stevens, C.E.** Persistence of antibody to hepatitis B surface antigen after vaccination with hepatitis B vaccine. "Viral Hepatitis in Liver Disease". New York : Alan R. Liss, pp 995-997, 1988.
  18. **Margolis, H.S. & Kane, M.A.** Development of recommendations for control of hepatitis B virus infections: the role of cost analysis. *Vaccine*, 8 –S81 – S94, 1990.
  19. **Westmoreland, D.; Player, V.; Heap, D.C. & Hammond, A.** Immunization against hepatitis B – what can we expect? *Epidemiological Infection*, 104, p. 499-509, 1990.
  20. **Jabaaij, L.; Grosheide, P. M.; Heijntink, R. ; Deivenvoorden, H .J. & cols.** Influence of perceived psychological stress and distress on antibody response to low dose rDNA hepatitis B vaccine. *J. Psychosom. Res.* 37,361-369, 1993.
  21. **Jilg, W.; Schmidt, M. & Deinhardt, F.** Immune response to hepatitis B vaccination. *Journal of Medical Virology*, 24:377-384, 1988.
  22. **Pasco, M.T.; Pharm, D. & Beam, T.R.** Persistence of anti HBs among health care personnel immunized with hepatitis B vaccine . *American Journal of Public Health*, 80:590-593, 1990.
  23. **Zuckerman, J.N.; Sabin C.; Craig F.M. & cols.** Immune response to a new hepatitis B vaccine in health care workers who had not responded to standard vaccine: randomised double blind dose-response study. *BMJ* ; 314:329-33, 1997.
  24. **Louagie, H.; Delanghe, J.; Desombere, I.; De Beryzere, M., Hauser, P. & Leroux-Roels, G.** Haptoglobin polymorphism and the immune response after hepatitis B vaccination. *Vaccine*, 11,1188-1190, 1993.

25. **Hollinger, G. B.** Factors influencing the immune response to hepatitis B vaccine, booster dose guidelines and vaccine protocol recommendation. *Am J Med*, 97:36-40 suplem 32<sup>A</sup>, 1989.

# Distribuição da Microbiota Anemófila em Ambiente Hospitalar (Campina Grande, PB)

**Anemophilic Microbiota distribution in an Hospital Environment  
(Campina Grande, PB)**

*Catão, R.M.R.<sup>1</sup>; Lima, E.O.<sup>2</sup>; Vieira, K.V.M.<sup>1</sup>; Gomes, L.F.V.A.<sup>1</sup>; Ceballos, B.S.O. de<sup>3</sup>*

*SUMMARY - The presence of anemophilic opportunistic pathogens was analyzed in 15 sections of a private hospital (Campina Grande – PB), because they frequently causes severe intrahospital out-breaks. Samples were collected four times in each room and analyzed for bacteria and fungi diversity. Cirurgical center, UTI and nurserie were the places with higher frequency of isolations and higher genera diversity. Penicillium, Cladosporium and NSF were the most frequent fungi. Staphylococcus aureus resistant to oxacilin was isolated from several different places. Nearly all the strains Gram positive and Gram-negative were sensitive to Netilmicina and Amicacina and not to Ampicilin. It was suggest a most efficient method of dessinfection in the hospital and an investigation between the presence of oportunic microrganisms and climate conditions.*

**RESUMO -** No ambiente hospitalar é freqüente a presença de microorganismos oportunistas que ao infectar pacientes imunodeprimidos, idosos e crianças

causam surtos hospitalares severos. Todavia, os microorganismos selecionados neste ambiente apresentam multi-resistência aos antimicrobianos de uso rotineiro, dificultando a antibioticoterapia. Neste trabalho foi avaliada a distribuição e a diversidade da microbiota anemófila de 15 salas de um hospital da rede privada (Campina Grande, PB), e analisado o padrão de resistência das bactérias isoladas. Os resultados de 4 coletas mostraram uma diversidade de 20 gêneros de fungos e 10 de bactérias (5 grupos de Gram-positivos e 5 de Gram-negativos). O centro cirúrgico, o berçário e a UTI-adulto foram os locais de maior contaminação. *Penicillium* spp, *Cladosporium* spp e FNE foram os fungos de maior freqüência de isolamento. Dentre as bactérias, *Staphylococcus aureus*, oxacilina resistente esteve presente na maioria dos ambientes. Netilmimica e Amicacina foram os antibióticos com maior sensibilidade e Ampicilina com o menor. Recomenda-se intensificar a desinfecção e assepsia do hospital assim como investigar a relação entre as freqüências de isolamento de microorganismos patogênicos e oportunistas com as condições climáticas.

---

<sup>1</sup> CCBS/FFB – Universidade Estadual da Paraíba

<sup>2</sup> CCS/LIAC e <sup>3</sup> AESA-DEC-CCT- Universidade Federal da Paraíba

## INTRODUÇÃO

No ambiente hospitalar é freqüente a presença de microrganismo no ar, no solo, nas paredes e nos sistemas de refrigeração, entre outros, que tem como origem os vários materiais contaminados de uso diário (bandagens, fraldas, descartes de peças anatômicas, etc.). Estes microorganismos comportam-se como oportunistas, em particular nos pacientes imunodeprimidos, queimados e idosos, porém podem tornar-se patogênicos causando infecções intrahospitalares severas (Zanon,1987).

O grande número de doenças adquiridas em hospitais constitui um problema preocupante tanto para pesquisadores quanto para profissionais da área de saúde (Silva, 1983, Riley e col, 1984). Todavia, os microorganismos patogênicos selecionados no próprio ambiente

hospitalar tendem a apresentar multi-resistência aos antimicrobianos mais usados na rotina, dificultando o tratamento (Ceballos, 1984).

O assunto é de interesse daqueles que se dedicam ao estudo dos aspectos microbiológicos, profiláticos e terapêuticos das infecções oportunistas, especialmente a partir do momento em que ficou estabelecido que um microorganismo, normalmente considerado saprófita, em condições adversas do hospedeiro (desnutrido, imunodeprimido, etc.) pode desenvolver a doença (Mameri et col., 1989; Cucé, 1993).

A ocorrência de infecções por fungos anemófilos é bastante conhecida na literatura médica e os esporos inalados do ar têm sido incriminados como responsáveis por diversos problemas alérgicos. Ambientes contaminados favorecem sua disseminação (Furtado, 1982).

Nos trópicos, as condições de temperatura e umidade elevadas estimulam a proliferação de uma microbiota abundante e diversificada, e dentro dela, dos microrganismos oportunistas e patogênicos do ambiente hospitalar, favorecendo a instalação e disseminação de infecções intra-hospitalares. A escassez de dados regionais justifica a realização de um estudo sobre a composição da flora anemófila hospitalar.

Este trabalho teve como objetivos principais (1) avaliar a diversidade da microbiota anemófila em vários locais de um hospital, em particular de fungos e de bactérias; (2) determinar a sensibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos usados na rotina, (3) avaliar a distribuição da diversidade da flora fúngica e a frequência de gêneros conforme o local estudado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi desenvolvida num hospital da rede privada da cidade de Campina Grande – PB, Nordeste do Brasil.

Sua execução ocorreu em dois períodos: (1) agosto – outubro/1994 e (2) abril/1995

**1. Ambientes Estudados** – Foram selecionados nove ambientes dentro do hospital, totalizando quinze salas assim distribuídas: centro cirúrgico (5 salas), enfermarias (2 salas),

sala de parto, UTI-adulto, UTI-infantil. UTI-neo natal, berçário, sala de preparo de materiais e cozinha (1 sala de cada).

**2. Coleta das amostras** – A coleta das amostras foi feita mediante a exposição ao ar e a 30 cm do chão, durante 5 a 10 minutos e em cada uma das salas, de placas de Petri com os meios de cultura específicos. Foram realizadas quatro exposições das placas de Petri em cada uma das salas.

**3. Meios de Cultura** – Para o isolamento de fungos foi usado o meio Ágar-Sabouraud e para o isolamento de bactérias o meio de Ágar-Sangue, ambos distribuídos em placas de Petri. As placas de Agar Sabouraud foram incubadas a temperatura ambiente durante 5 a 10 dias e as de Agar Sangue a 37°C durante 24 horas.

**4. Identificação** – Para a identificação dos fungos foram feitas observações macro e microscópicas das colônias. O método de micro-cultivo em lâmina utilizando-se Ágar batata-dextrose foi empregado para identificar a micromorfologia de fungos filamentosos (bolors). Este meio estimula a esporulação, às vezes insuficiente ou ausente em Ágar-Sabouraud (Almeida, 1988).

Para as colônias de bactérias crescidas em Ágar-Sangue, usou-se os procedimentos de identificação bacteriológica de rotina: bacterioscopia (coloração de Gram) e testes bioquímicos.

**5. Antibiograma** – o antibiograma foi realizado de acordo com a metodologia recomendada segundo as normas da OMS (1981) usando-se o método de Kirby & Bauer (1966) e discos de antibióticos padronizados pela CEFAR.

## RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes à distribuição de gêneros e espécies de bactérias anemófilas isoladas do ambiente hospitalar nas quatro colheitas, permitindo comparar sua frequência nos diversos locais amostrados. Da microbiota bacteriana presente, tiveram uma ampla distribuição os gêneros: *Staphylococcus* e *Bacillus*, que foram isolados de todos os

locais. Observou-se também a presença de: Enterobactérias (*Serratia* sp., *E.coli* e *Enterobacter* sp.), *Micrococcus*, *Pseudomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*, Germes difteróides e Bastonete Gram-Negativo (BGN)-não fermentador.

A Tabela 2 mostra a diversidade bacteriana ao longo das 4 coletas. Observou-se que a maior riqueza de gêneros foi encontrada na 3ª amostragem (outubro/94), correspondendo a 80% do total dos gêneros identificados. Dentre eles, 54% correspondeu a bactérias Gram-positivas e 16% a bactérias Gram-negativas. Das bactérias Gram-positivas, a maior incidência foi de *Staphylococcus* coagulase-positiva (54 cepas – 39%), seguido de *Staphylococcus* coagulase-negativa (40 cepas – 31%). Em relação as bactérias Gram-negativas a maior incidência foi de BGN não fermentador (10 cepas – 50%) seguido por *Enterobacter* sp. (5 cepas – 25%).

A Tabela 3 apresenta o padrão de sensibilidade aos antimicrobianos. Observa-se que a Amicacina e a Netilmicina foram os antimicrobianos mais eficazes: das bactérias Gram positivas: 100% foram sensíveis a ambos antibióticos, e das bactérias Gram negativas: 95,83% foram sensíveis ao primeiro e 93,75% ao segundo. O antimicrobiano menos eficaz para ambos grupos de bactérias foi Ampicilina: foram sensíveis apenas 38,22% das cepas Gram-positivas e 20,83% das cepas Gram-negativas.

A Tabela 4 apresenta a relação percentual dos gêneros fúngicos isolados em relação com os locais amostrados. Observa-se que dos 20 (100%) gêneros fúngicos isolados, 16 (80%) foram encontrados no centro cirúrgico. A maior incidência foi do gênero *Penicillium* (9 locais – 100%), seguido de *Cladosporium* (7 locais – 77,77%), Fungo Não Esporulado ou FNE (6 locais – 66,66%), *Mucor* e *Cephalosporium* (5 locais – 55,55%), *Aspergillus* e *Rhizopus* (4 locais – 44,44%).

A Tabela 5 mostra a incidência e diversidade fúngica no Centro Cirúrgico, em relação ao período (mês) do isolamento, constatando que a maior diversidade fúngica foi encontrada no mês de setembro/94, quando foram isolados 10 gêneros (*Penicillium*, *Fusarium*, FNE, *Monília*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Gliocadium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* e *Rhizopus*). A menor diversidade correspondeu a o mês de outubro, com 8 gêneros.

O Gráfico 1 apresenta a relação percentual dos gêneros fúngicos isolados no ambiente hospitalar durante o período deste estudo.

O Gráfico 2 apresenta a frequência do aparecimento de fungos nos diversos locais amostrados.

## DISCUSSÃO

Os fungos isolados nas diferentes salas do ambiente hospitalar são ubiqüitários e alguns gêneros podem causar infecções oportunistas em condições especiais do hospedeiros, particularmente imunodeprimidos, queimados, crianças desnutridas e idosos (Silva, 1983).

Dentre os diferentes locais estudados, as salas do centro cirúrgico apresentaram a maior frequência de aparecimento de bactérias e fungos (80%) assim como a maior diversidade (7 gêneros de bactérias e 16 de fungos), seguidos pelo berçário e UTI adulto (6 gêneros de bactérias no primeiro e 4 no segundo; e 9 gêneros de fungos em ambos, com 45% de frequência de aparecimento para cada um). A contaminação observada pode ser associada com o fluxo humano, com a metodologia de limpeza e com uma provável baixa eficiência dos desinfetantes utilizados.

A microbiota mostrou-se bastante rica, com uma diversidade de 20 gêneros. Os fungos mais freqüentes foram *Penicillium* spp, cosmopolita que esteve presente em todos os ambientes (100% de frequência), *Cladosporium* (77,7%), FNE (66,6%) e *Cephalosporium* spp, *Mucor* spp, *Monília* spp e *Rhizopus* (55,5%). Estes resultados correspondem com os achados de Farias (1967) o qual observou em Belo Horizonte, processos alérgicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Furtado (1961) em Manaus.

A tarefa de eliminar todas as formas viáveis de microorganismos de um determinado ambiente dentro do hospital é bastante complexa e difícil, pois apesar da assepsia e desinfecção rotineiras do local, os fatores que contribuem para a permanência ou penetração de microorganismos são muito variados e dependem do fluxo humano e de suas condições de

higiene, da ventilação, da temperatura e da umidade ambiental, entre outros (Lacaz; 1977; Silva, 1983).

Com relação às amostragens ao longo de diferentes épocas, os resultados das freqüência de aparecimento e da diversidade de gêneros não mostraram modificações significativas. Estes resultados evidenciam que apesar de sua periodicidade, os processos de limpeza, desinfecção e assepsia não foram melhorados ao longo do período de duração deste estudo. De fato, no mês de setembro, a maior diversidade e freqüência de isolamentos de vários fungos pode ser associada com reformas que estavam sendo executadas no hospital.

Das bactérias identificadas, as que mais despertaram interesse médico foram os *Staphylococcus* MRSA (oxacilina-resistentes). Constatou-se que das 54 (33,33%) cepas isoladas 17 foram MRSA. Estas distribuíram-se no centro cirúrgico (6), UTI-adulto (4), UTI-infantil e enfermaria (2 em cada local), UTI-neo natal, berçário e sala de preparo de medicamento (1 em cada local).

O padrão bacteriano de sensibilidade-resistência aos antibióticos caracterizou-se pela maior sensibilidade para Netilmicina (100% das bactérias Gram-positivas e 95,83% das Gram-negativas) e Amicacina (10% das Gram-positiva e 93,75% das Gram-negativas). A menor sensibilidade foi para a Ampicilina: apenas 38,2% das cepas Gram-positivas e 20,8% das Gram-negativas. Vancomicina foi bastante ativa para Gram-positivos: 99,51% das cepas foram sensíveis.

## **CONCLUSÕES**

A grande diversidade e a elevada freqüência de isolamento dos fungos e bactérias encontradas no centro cirúrgico, berçário, sala de parto e UTI adulto e infantil, entre outros locais, é preocupante visto que nestes ambientes deve-se esperar ausência de microrganismos ou presença bastante reduzida com escassa freqüência de isolamento.

A maior diversidade fúngica observada no mês de setembro de 1994, no início do verão ou estação seca, se relacionou com reformas no hospital, evidenciando pouca eficiência das

medidas preventivas adotadas para evitar a entrada de poeira dentro dos ambientes mais delicados, como UTI e centro cirúrgico. A maior diversidade de bactérias foi detectada no mês de Outubro de 1994, um mês após ter ocorrido a máxima diversidade de fungos e pode ser relacionada com os ventos secos deste período.

A contaminação observada pode ser associada com o fluxo humano, com a metodologia de limpeza e com uma provável baixa eficiência dos desinfetantes utilizados.

Sugere-se que sejam adotados métodos de desinfecção e assepsia mais eficientes para reduzir a microbiota desses ambientes e eliminar os *Staphylococcus aureus*, particularmente os oxacilina resistente (MRSA).

Recomenda-se a realização de um estudo mais amplo e dirigido à identificação de fungos filamentosos e leveduriformes patogênicos presentes no ambiente hospitalar assim como a avaliação entre sua presença e diversidade em relação com as condições climáticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Almeida, M.E.S. et all.** Identificação da Microbiota Fúngica de Ambientes Considerados Assépticos. *Ver. Saúde Pública*, São Paulo, 22: 201-6, 1988.
- 2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turbe, M.** Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disc Methodology. *Amer. J. Clin. Path.* 45:493, 1966.
- 3. Ceballos, B. S. O.** *Salmonelose endêmica da criança em São Paulo. Sorotipos, clones e origem nosocomial.* Dissertação de mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 103 pág., 1984.
- 4. Cucé, L.C. et all.** Flora Anemófila em Ambiente Hospitalar (PS e UTI). *An. Bras. Dermatol.*, São Paulo, 68 (4): 201-204, 1993.

5. **Faria, A.** *Aspectos Ecológicos e Clínicos da Flora Micótica Anemófila de Belo Horizonte.*  
Tese de Doutorado. Belo Horizonte, Fac. De Medicina UFMG, 1967.
6. **Furtado, M.S.S. e Ferraroni, J.J.** Fungos Anemófilos em Ambientes Hospitalares da Cidade de Manaus. Amazonas, Brasil. *Ver. Ciência e Cultura*, 34 (12): 1642-1647, 1982.
7. **Lacaz, C.S.** *Infecções por Agentes Oportunistas.* São Paulo, Edgar Beucher, 1977.
8. **Mameri, A.C.A. et all.** Manifestações Cutâneas em Transplantados Renais. *An. Bras. Dermatol.*, São Paulo, 64 (3): 165-170, 1989.
9. **OMS – Comité d’Expert sur la standardization biologique –** Rapport Technique, série 673 – OMS, Genève, 1971, 156-192 (Normes nº 26 pour les substances biologiques, revision 1981).
10. **Riley, L.W.; Ceballos, B.S.O. de; Trabulsi, L.R.; Toledo, M.R.F.; Black, P.A.** The Significance of Hospital as reservoirs for Endemic Multiresistent Salmonella typhimurium Causing Infection in Urban razilian Children. *J. of Infect. Dis.* 150 (2) pp.: 236-241, 1984.
11. **Silva, M.G.** Flora Fúngica do Ar e do Piso no Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte, Brasil, *Ver. Microbiol.*, São Paulo 14 (3): 215-222, Jul/Set, 1983.
12. **Zanon, U. e Neves, J.** *Infecções Hospitalares – Prevenção, Diagnóstico e Tratamento.* MEDSI, Rio de Janeiro, 1987.

---

Endereço para Correspondência: Raissa Mayer Ramalho Catão

Rua: Benedito Mota, 702 – Alto Branco

Campina Grande – PB (CEP: 58102-520)

Fone: (083) 322-3942 Fax: (083) 322-8834

TABELA 1a  
Distribuição de bactérias anemófilas de ambiente hospitalar (Campina Grande – PB)

LOCAIS		BACTÉRIAS ISOLADAS (Agar Sangue)			
		A M O S T R A G E M			
		1ª (29/08/94)	2ª (15/09/94)	3ª (26/10/94)	4ª (07/04/94)
CENTRO CIRÚRGICO	Sala A	St. Coag. + St. Coag. -	<i>Bacillus</i> spp.	St. Coag. + St. Coag. - <i>Micrococcus</i> spp	St. Coag. + St. Coag. -
	Sala B	<i>Bacillus</i> spp	Não houve crescimento em nenhuma das placas	BGN não fermentador St. Coag. + <i>Bacillus</i> spp <i>Enterobacter</i> spp	St. Coag. + St. Coag. -
	Sala C	St. Coag. +	St. Coag. - <i>Ps. maltophilia</i>	St. Coag. + St. Coag. - <i>Bacillus</i> spp	St. Coag. + St. Coag. -
	Sala D	St. Coag. +	<i>Bacillus</i> spp	St. Coag. + St. Coag. -	St. Coag. + St. Coag. -
	Sala E	St. Coag. +	St. Coag. -	St. Coag. + <i>Micrococcus</i> spp <i>Bacillus</i> spp	St. Coag. + St. Coag. - <i>Bacillus</i> spp

φ Não Examinado

TABELA 1b  
Distribuição de bactérias anemófilas de ambiente hospitalar (Campina Grande – PB)

LOCAIS		BACTÉRIAS ISOLADAS (Agar Sangue)			
		A M O S T R A G E M			
		1ª (29/08/94)	2ª (15/09/94)	3ª (26/10/94)	4ª (07/04/94)
SALA DE PARTO		St. Coag.+	*	Germes Difteróides <i>Bacillus</i> spp <i>E. coli</i> <i>Enterobacter</i> spp BGN não fermentador	<i>Bacillus</i> spp BGN não fermentador
BERÇÁRIO		St. Coag. + <i>St. Coag. -</i> <i>Bacillus</i> spp	*	St. Coag. + <i>St. Coag. -</i> <i>Enterobacter</i> spp	<i>Bacillus</i> spp BGN não fermentador
UTI	Adulto	St. Coag. + <i>St. Coag. -</i> <i>Bacillus</i> spp	St. Coag. + <i>St. Coag. -</i> Germes Difteróides <i>Bacillus</i> spp	St. Coag. + <i>St. Coag. -</i> <i>Bacillus</i> spp	*
	Infantil	<i>St. Coag. -</i>	<i>St. Coag. -</i> <i>Serratia</i> spp	St. Coag. + <i>St. Coag. -</i> BGN Não fermentador	*
	Neo-Natal	<i>St. Coag. -</i>	*	St. Coag. + <i>St. Coag. -</i> BGN não fermentador	*

φ Não Examinado

TABELA 1c  
Distribuição de bactérias anemófilas de ambiente hospitalar (Campina Grande – PB)

LOCAIS		BACTÉRIAS ISOLADAS (Agar Sangue)			
		A M O S T R A G E M			
		1ª (29/08/94)	2ª (15/09/94)	3ª (26/10/94)	4ª (07/04/94)
SALA DE PREPARO DE MATERIAIS		*	<i>Bacillus</i> spp	St. Coag. + St. Coag. – <i>Bacillus</i> spp BGN Não fermentador	*
SALA DE MEDICAMENTOS		*	*	St. Coag + Germes Difteróides <i>Enterobacter</i> spp	*
COZINHA		*	*	St. Coag. + <i>Bacillus</i> spp BGN Não fermentador <i>Enterobacter</i> spp	*
	Queimados	*	St. Coag. – <i>Bacillus</i> spp	*	*
ENFERMARIAS	Ramal 1101	*	St. Coag. – <i>Bacillus</i> spp	*	*

φ Não examinado

TABELA 2  
Diversidade Bacteriana de Ambiente Hospitalar, no período de agosto/94 a abril/95

	GRAM POS. (130)	AMOSTRAGEM/Nº DE CEPAS ISOLADAS				Nº Total de Cepas / (%)	
		1ª / (33)	2ª / (25)	3ª / (54)	4ª / (21)	130	(86,70%)
M I C R O O R G A N I S M O S	<i>St. Coag. +</i>	9	4	26	5	54	(39,23%)
	<i>St. Coag. -</i>	10	6	12	12	40	(30,76%)
	<i>Micrococcus spp</i>	—	—	2	—	2	(1,53%)
	<i>Bacillus spp</i>	4	12	11	4	31	(23,84%)
	Germes Diferóides	—	3	3	—	6	(4,60%)
	GRAM NEG. (20)	1ª / (0)	2ª / (3)	3ª / (16)	4ª / (1)	20	(13,30%)
	<i>Ps maltophilia *</i>	—	1	—	—	1	(5,00%)
	BGN ñ fermentador	—	—	9	1	10	(50,00%)
	<i>E. coli</i>	—	—	2	—	2	(10,00%)
	<i>Enterobacter spp</i>	—	—	5	—	5	(25,00%)
	<i>Serratia spp</i>	—	2	—	—	2	(5,00%)
	Total de Gêneros Identificados (%)	10 (100%)	3 (30%)	6 (60%)	4 (40%)	150	(100,00%)

\* Atualmente: *Xanthomonas maltophilia*

TABELA 3  
Padrão de Comparação de Sensibilidade aos antimicrobianos

ANTIBIÓTICOS  TESTADOS	AMOSTRAGENS								PERCENTUAL DE SENSIBILIDADE	
	1ª		2ª		3ª		4ª			
	AGOSTO/94		SETEMBRO/94		OUTUBRO/94		ABRIL/95		130 (%)	20 (%)
	31	0	24	3	54	16	21	1	GRAM +	GRAM -
	GRAM +	GRAM -	GRAM +	GRAM -	GRAM +	GRAM -	GRAM +	GRAM -	GRAM +	GRAM -
Cloranfenicol (CLO)	75,75	—	79,16	66,66	70,59	62,50	90,47	100,00	78,99	76,38
Gentamicina (GEN)	96,90	—	91,66	33,33	92,16	93,75	95,23	100,00	93,98	75,93
Netilmicina (NET)	100,00	—	100,00	100,00	100,00	87,50	100,00	100,00	100,00	95,83
Tetraciclina (TET)	75,75	—	83,33	33,33	78,44	87,50	61,90	100,00	74,85	73,61
Tobramicina (TOB)	93,93	—	100,00	33,33	84,32	87,50	95,23	100,00	93,37	73,61
Amicacina (AMI)	100,00	—	100,00	100,00	100,00	81,25	100,00	100,00	100,00	93,75
Ampicilina (AMP)	60,60	—	41,66	0,00	45,10	62,50	9,52	0,00	38,22	20,83
Carbenicilina (CAR)	92,12	—	83,33	66,66	92,16	81,25	76,19	100,00	85,95	82,63
Cotrimoxazol (SUT)	51,51	—	58,33	100,00	49,02	56,25	80,95	100,00	59,95	85,41
Lincomicina (LIN)	81,81	—	66,66	—	39,22	—	47,61	—	58,82	—
Oxacilina (OXA)	75,75	—	50,00	—	47,06	—	89,71	—	65,63	—
Eritromicina (ERI)	72,72	—	45,83	—	58,33	—	52,38	—	57,31	—
Penicilina G (PEN)	60,60	—	41,66	—	45,10	—	9,52	—	39,22	—
Cefalotina (CFL)	92,12	—	87,50	—	41,18	—	28,57	—	62,34	—
Ceftriaxona (CRO)	—	—	—	0,00	—	50,00	—	100,00	—	50,00
Ciprofloxacim (CIP)	—	—	—	100,00	—	81,25	—	100,00	—	93,75
Aztreonama (ATM)	—	—	—	66,66	—	25,00	—	0,00	—	30,55
Cefotaxina (CTX)	—	—	—	0,00	—	50,00	—	100,00	—	50,00
Cefoxitina (CFO)	—	—	—	0,00	—	56,25	—	100,00	—	52,08
Cefoperazona (CPZ)	—	—	—	0,00	—	56,25	—	100,00	—	52,08
Vancomicina (VAN)	100,00	—	100,00	—	98,04	—	100,00	—	99,51	—

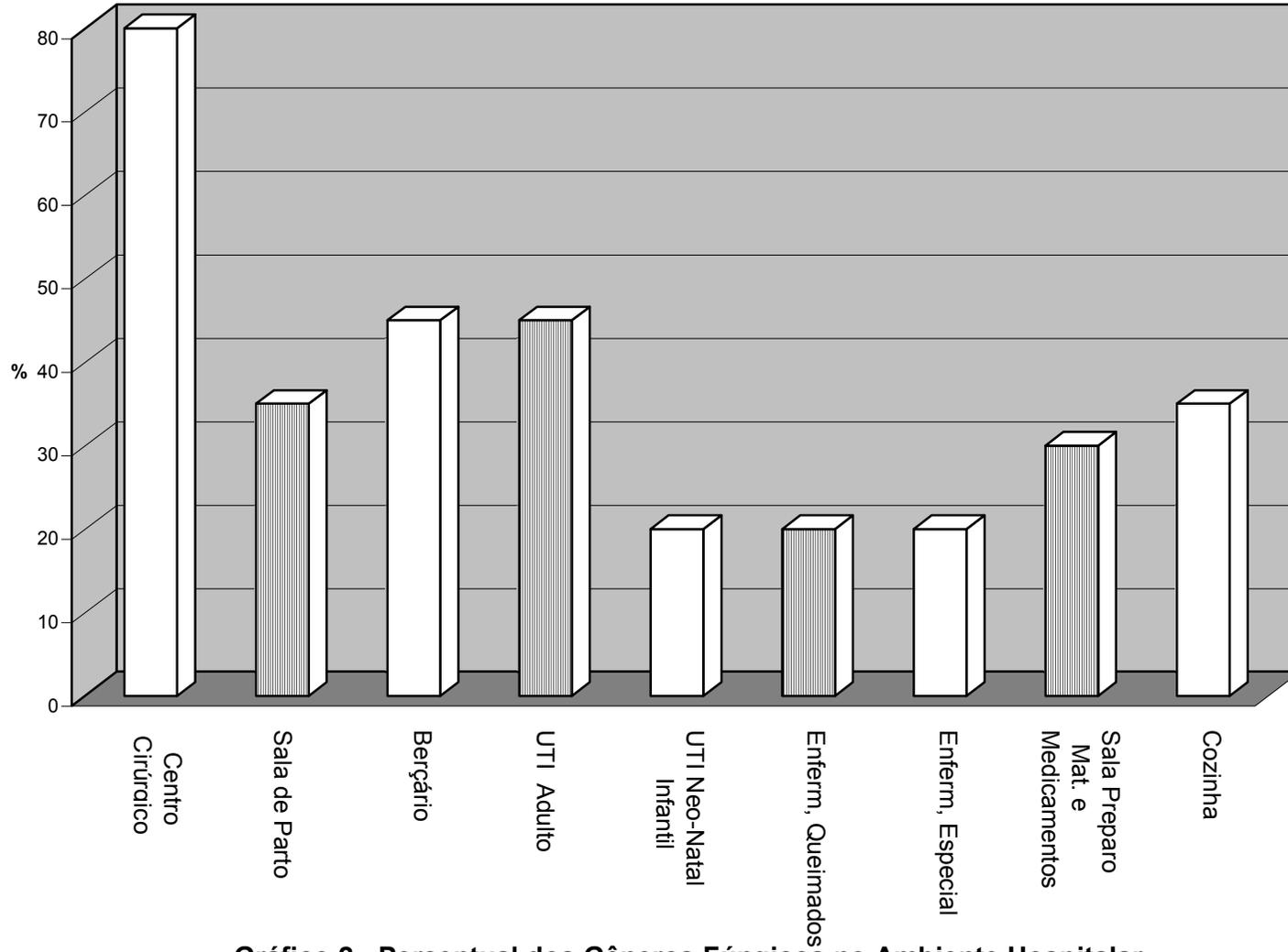
TABELA 4  
Relação do percentual dos Gêneros fúngicos isolados e dos locais amostrados

Nº	GÊNERO DE FUNGOS ISOLADOS	LOCAIS USADOS PARA AMOSTRAGEM									TOTAL DE AMBIENTES = 9
		Centro Cirúrgico	Sala de Parto	Berçário	UTI Adulto	UTI Neo-Natal e Infantil	Enferm. Queimados	Enferm. Especial	Sala Preparo Mat. e Medicamentos	Cozinha	Nº e % dos Gêneros Fúngicos no Ambiente Hospitalar
01	<i>Aspergillus</i>	X	X			X			X		4=44,44%
02	<i>Penicillium</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9=100,00%
03	<i>Cephalosporium</i>	X	X	X	X					X	5=55,55%
04	<i>Mucor</i>	X	X	X	X				X		5=55,55%
05	<i>Fusarium</i>	X									1=11,11%
06	<i>Cladosporium</i>	X		X	X		X	X	X		7=77,77%
07	<i>Monília</i>	X		X	X		X	X			5=55,55%
08	<i>Glilocadium</i>	X			X						2=22,22%
09	<i>Paecilomyces</i>	X				X					2=22,22%
10	<i>Rhizopus</i>	X	X	X		X			X		5=55,55%
11	<i>Curvularia</i>	X		X	X					X	4=44,44%
12	<i>Epicoccum</i>	X									1=11,11%
13	<i>Trichoderma</i>	X									1=11,11%
14	<i>Geotrichum</i>	X	X								2=22,22%
15	<i>Syncephalastrum</i>	X		X							2=22,22%
16	F.N.E.	X			X		X	X	X	X	6=66,66%
17	Levedura				X					X	2=22,22%
18	<i>Sporobolomyces</i>									X	2=22,22%
19	<i>Scapulariopsis</i>		X								1=11,11%
20	<i>Phoma</i>			X							1=11,11%
<b>Total de Gêneros Fúngicos=20 Nº e % por Local</b>		<b>16 (80%)</b>	<b>7 (35%)</b>	<b>9 (45%)</b>	<b>9 (45%)</b>	<b>4 (20%)</b>	<b>4 (20%)</b>	<b>4 (20%)</b>	<b>6 (30%)</b>	<b>7 (35%)</b>	

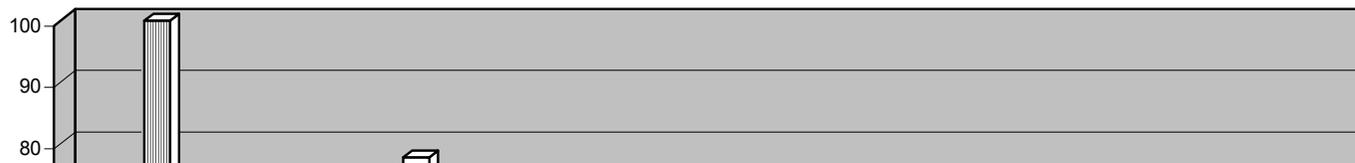
TABELA 5  
 Incidência e diversidade fúngica no Centro Cirúrgico, em relação ao período (mês) do Isolamento

LOCAL	MICROORGANISMOS ISOLADOS			
	Agosto/94	Setembro/94	Outubro/94	Abril/95
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Aspergillus</i></li> <li>• <i>Penicillium</i></li> <li>• <i>Cephalosporium</i></li> <li>• <i>Mucor</i></li> <li>• <i>Fusarium</i></li> <li>• F.N.E.</li> <li>• <i>Cladosporium</i></li> <li>• <i>Scapulariopsis</i></li> <li>• <i>Geotrichum</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Penicillium</i></li> <li>• <i>Fusarium</i></li> <li>• F.N.E.</li> <li>• <i>Monília</i></li> <li>• <i>Cephalosporium</i></li> <li>• <i>Mucor</i></li> <li>• <i>Gliocadium</i></li> <li>• <i>Cladosporium</i></li> <li>• <i>Paecilomyces</i></li> <li>• <i>Rhizopus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• F.N.E.</li> <li>• <i>Curvularia</i></li> <li>• <i>Cladosporium</i></li> <li>• <i>Penicillium</i></li> <li>• <i>Rizopus</i></li> <li>• <i>Epicoccum</i></li> <li>• <i>Fusarium</i></li> <li>• <i>Trichoderme</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Cladosporium</i></li> <li>• <i>Curvularia</i></li> <li>• <i>Penicillium</i></li> <li>• <i>Epicoccum</i></li> <li>• <i>Geotrichum</i></li> <li>• <i>Syncephalastrum</i></li> <li>• <i>Cephalosporium</i></li> <li>• <i>Mucor</i></li> <li>• F.N.E.</li> </ul>
<b>Nº DE GÊNEROS DE FUNGOS ISOLADOS</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>9</b>

**Gráfico 1 - Frequência de Aparecimento de Fungos no Ambiente Hospitalar**



**Gráfico 2 - Percentual dos Gêneros Fúngicos no Ambiente Hospitalar**





***Frequência de Cryptosporidium sp Associada a Pacientes com  
Diarréia em Ribeirão Preto – SP\****

***Frequency of Cryptosporidium sp Among Patients with Diarrhea in  
Ribeirão Preto- SP***

**Carlos Henrique Gomes Martins<sup>1</sup>**

**Fabiola Attié de Castro<sup>2</sup>**

**Vanda Roseli dos Santos<sup>3</sup>**

**Roberto Martinez<sup>4</sup>**

PALAVRAS CHAVE: *Cryptosporidium* sp, diarréia, enteropatógenos

KEY WORDS: *Cryptosporidium* sp, diarrhea, enteropathogens.

\* Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - SP

---

<sup>1</sup> Pós-Graduando em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

<sup>2</sup> Pós-Graduanda em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

<sup>3</sup> Biologista Responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da FMRP - USP

<sup>4</sup> Prof. Dr. do Depto. de Clínica Médica e Chefe do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

## SUMMARY

Cryptosporidiosis is caused by a protozoan that can produce enteritis in humans. The disease is mainly diagnosed in immunocompromised individuals, but is known to attack also healthy persons. The authors analyzed 3,365 fecal samples obtained from patients with diarrhea of etiology to be clarified from June 1990 to June 1997 at the Emergency Unit of the University Hospital in Ribeirão Preto - SP. Positivity for *Cryptosporidium* was 14.00% in children and 24.30% in adults. Of the 409 positive samples from children, 21.50% (85 samples) also showed the associated presence of other enteropathogens. The same association was observed in 14.50% (16 samples) of the 110 positive samples from adults. These data indicate that *Cryptosporidium* is one of the most frequent etiologic agents of diarrhea in children and adults, associated or not with other enteropathogens.

## RESUMO

A criptosporidiose é causada por um protozoário que pode produzir enterite em humanos. A doença é diagnosticada principalmente em indivíduos imuno-comprometidos, mas sabe-se que este protozoário acomete também pessoas hígidas. Os autores analisaram no período de junho de 1990 a junho de 1997, na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP. 3.365 amostras de fezes destinadas a pesquisa de *Cryptosporidium* sp em pacientes com quadro diarréico a esclarecer. A positividade para *Cryptosporidium* foi de 14,00% em crianças e 24,30% em adultos. Das 409 amostras positivas em crianças, verificou-se associação com outros enteropatógenos em 21,50% (85 amostras) dos casos. Essa mesma associação foi observada nas 110 amostras positivas em adultos, cuja porcentagem foi de 14,50% (16 amostras). Esses dados indicam que este protozoário é um dos mais freqüentes agentes etiológicos da diarréia em crianças e adultos, com ou sem associação de outros enteropatógenos.

## INTRODUÇÃO

Denomina-se criptosporidiose a infecção causada por coccídeos do gênero *Cryptosporidium* e tem sido descrita em animais (pássaros, peixes e mamíferos) e no homem, sobretudo em crianças, adultos não imunes e em imuno-comprometidos.<sup>3, 6, 13, 20</sup> O *Cryptosporidium* sp foi identificado pela primeira vez na mucosa gástrica de camundongos assintomáticos em 1907 por Tyzzer<sup>19</sup>, mas o primeiro caso de criptosporidiose humana foi descrito em 1976.<sup>12, 14</sup> O *Cryptosporidium* sp passou a ser incriminado como um dos agentes causadores da diarreia persistente e de difícil tratamento, especialmente em indivíduos imuno-comprometidos. De localização peculiar nos enterócitos, a presença desse coccídeo está relacionada a um desequilíbrio hidroeletrólítico em decorrência da atrofia dos vilos e hiperplasia das criptas, provocando sintomas como uma diarreia profusa, podendo ser acompanhada ou não de cólica, náusea, vômito e desidratação.<sup>1, 5, 16</sup>

A espécie detectada em mamíferos é o *C. parvum*, o qual tem habilidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros e capacidade de se desenvolver em diferentes tecidos.<sup>3, 6, 22</sup>

A criptosporidiose destacou-se na década de 80, com o surgimento da AIDS, pois a associação entre AIDS e *Cryptosporidium* em pacientes imuno-comprometidos é muito freqüente.<sup>22</sup> Atualmente, sabe-se que é freqüentemente transmitida de pessoa a pessoa e por água e alimentos.<sup>3, 18</sup> Meinhardt & cols<sup>11</sup> incluem na população de risco pessoas que tiveram contato com familiares e parceiros sexuais contaminados, profissionais da saúde, usuários de piscinas públicas e viajantes de regiões endêmicas.

O *Cryptosporidium* sp pode ser identificado por várias técnicas de triagem e investigação laboratorial. O diagnóstico da criptosporidiose entérica depende principalmente da detecção do oocisto nas fezes de pacientes infectados. Várias colorações convencionais têm sido adaptadas para melhor detecção desse protozoário. Os métodos imunológicos têm sido desenvolvidos usando anticorpos monoclonais marcados, mas essas

preparações são caras para a rotina. Alguns métodos de triagem são mais sensíveis que outros e demandam habilidade, experiência e controle de qualidade do laboratório.<sup>7, 11</sup>

Esse trabalho visa avaliar a prevalência de *Cryptosporidium* sp em pacientes com quadro diarréico à esclarecer, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC - FMRP-USP), esperando-se também contribuir para os dados da infecção nesta população.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1) Material

Foram analisadas amostras de fezes de pacientes atendidos, na Unidade de Emergência do HC - FMRP-USP, distribuídas entre 452 de adultos e 2.913 de crianças. Esta população inclui pacientes imuno-competentes com diarreia aguda e crônica e também imuno-comprometidos por diversas causas, como neoplasias, AIDS e outras doenças. As amostras foram coletadas e analisadas entre junho de 1990 e junho de 1997.

### 2) Metodologia

#### 2.1) Análise das fezes

A pesquisa de *Cryptosporidium* sp, foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Unidade de Emergências do HC - FMRP-USP. Concomitantemente foram realizadas a pesquisa de outros enteropatógenos como rotavírus e os microorganismos clássicos causadores de diarreia, através da análise bacteriológica das fezes.

A pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp nas fezes foi realizada pelo método de concentração Formol Acetato de Etila (FAE), seguida da coloração pelo método de Kinyoun modificado, após fixação e preservação pela formalina a 10%.<sup>7</sup>

Paralelamente foram realizadas a coprocultura com as mesmas amostras de fezes. Parte desse material foi semeado nos meios (MacConkey, *Salmonella-Shigella* [SS] e caldo Selenito) preconizados para a realização da coprocultura.

Para isolamento do *Campylobacter* sp a metodologia utilizada foi a descrita por Skirrow, 1977,<sup>17</sup> enquanto que, a detecção do rotavírus foi feita através de um teste de aglutinação pelo látex, utilizando um Kit comercial do Laboratório BioMérieux (Slidex Rota-Kit 2®), cujo princípio baseia-se nas observações de Sambourg & cols 1985.<sup>15</sup>

## RESULTADOS

Num período de 7 anos foram examinadas 3.365 amostras de fezes diarréicas, sendo que a positividade de *Cryptosporidium* sp foi de 14,00% (409 amostras) para o grupo de crianças e 24,30% (110 amostras) para adultos (Tabela 1). Verificou-se em 110 amostras positivas para *Cryptosporidium* sp em adultos a associação com outros enteropatógenos em 16 (14,50%) casos e nas 409 amostras em crianças houve associação em 85 (20,70%) casos (Tabela 2).

As principais associações verificadas em crianças foram: 47 com EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica clássica), 17 com *Salmonella* sp, 10 com *Shigella* sp, 8 com *Campylobacter* sp e 3 com rotavírus (Tabela 2). Em relação aos adultos não observamos predominância de qualquer associação (Tabela 2).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Observou-se significativa positividade de *Cryptosporidium* sp em fezes diarreicas de adultos (24,30%) e crianças (14,00%), detectou-se também a freqüente associação com outros patógenos intestinais considerados clássicos.

Em relação aos pacientes “negativos”, ou seja, que tiveram suas fezes analisadas laboratorialmente e onde não foram isolados nenhum agente potencialmente patogênico, acreditamos que representam um grupo distinto que inclui casos de origem viral e bacteriana, conforme já sugerido por Uhnoo & cols em 1987.<sup>21</sup>

A taxa de positividade detectada possivelmente está relacionada a múltiplos fatores como por exemplo, idade dos pacientes, nível sócio-econômico e cultural, além da procedência da população (áreas rurais),<sup>10</sup> pois a população atendida pelo HC – FMRP-USP é em sua grande maioria formada por indivíduos de baixa renda, que vivem na periferia da cidade ou em áreas rurais. A presença de pacientes imuno-comprometidos na amostragem, certamente contribuiu para a positividade observada.

A participação do *Cryptosporidium* sp na diarreia em crianças foi avaliada inicialmente em 1983 por Tizpori & cols.<sup>20</sup> Semelhantemente às bactérias, sua expressividade nos países desenvolvidos é discreta, entretanto assume grande importância nos países em desenvolvimento, com uma prevalência de até 5 a 20%, dado esse concordante com os nossos resultados.<sup>9, 20</sup> Em relação aos adultos, a alta positividade de criptosporidiose em nossa casuística deve-se ao fato dos pacientes analisados terem baixo nível sócio-cultural, residirem em áreas rurais ou na periferia da cidade, como afirmamos acima. A incidência em adultos pode aumentar em surtos devido a contaminação de águas ou alimentos.

Analisando separadamente os grupos de crianças e adultos, observa-se no grupo de crianças, que a taxa de associação de enteropatógenos foi de 20,70%. Nos adultos a mesma associação foi de 14,50%. Essa associação já foi observada por outros pesquisadores

sugerindo que a presença de infecções mistas produz efeitos sinérgicos, podendo aumentar a duração do quadro diarreico, e predispondo o indivíduo a outras infecções. Em populações pobres de países em desenvolvimento é habitual a presença dessas associações, pois os indivíduos são expostos precocemente a uma variada gama de enteropatógenos.<sup>23</sup> A associação de enteropatógenos promove a exacerbação do quadro clínico do paciente, podendo ser causa imediata de óbito, septicemia, hipoglicemia, hipocalemia, desidratação, dentre outros.<sup>9,24</sup>

Apesar dessas observações quanto a frequência de infecções mistas, Cecarelli & cols em 1993<sup>4</sup> discordam da sua importância, tendo em vista a baixa percentagem na sua casuística, apenas 1,2%.

A despeito desses fatos, a detecção da associação de agentes etiológicos na diarreia é de extrema importância para o clínico, na condução do tratamento do paciente. Cabe ao laboratório de microbiologia o conhecimento dessa associação e a implantação de testes microbiológicos capazes de isolar os múltiplos agentes etiológicos das diarreias.

O presente trabalho demonstra que os enteropatógenos constituem um problema de saúde pública, sendo a criptosporidiose uma doença emergente em nosso meio que requer uma vigilância e prevenção efetiva, demandando um trabalho coordenado entre médicos, epidemiologistas, microbiologistas e autoridades públicas. Propomos então a análise rotineira desse protozoário, bem como, os outros enteropatógenos, principalmente em crianças que apresentem fezes diarreicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERKOWITZ, C. D.; SEIDEL, J. S. Spontaneous resolution of cryptosporidiosis in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Dis. Child.*, 139: 967, 1985.
2. CASEMORE, D. P.; SANDS, R. L.; CURRY, A. *Cryptosporidium* species a “new” human pathogen. *J. Clin. Pathol.*, 38: 1321-36, 1985.
3. CASEMORE, D. P. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.*, 104: 1-28, 1990.
4. CECCARELLI, V. R. S. M.; VINAGRE, A. C. P.; YARA, T. I. Frequência de enteropatógenos intestinais isolados no período de julho de 1991 a julho de 1993, no Laboratório Bio-Ciência/Lavoisier. *Rev. Bras. Anál. Clín.*, 26: 91-93, 1994.
5. CROSS, J. H.; ALCANTARA, A.; ALQUIZA, L.; ZARASPE, G.; RANOA, C. Cryptosporidiosis in Philippine children. *South. Asian. J. Trop. Med. Public Health*, 16: 257, 1985.
6. CURRENT, W. L. *Cryptosporidium*: its biology and potential for environmental transmission. *Crit. Rev. Environ. Control*, 17: 21-51, 1986.
7. GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A.; BREWER, T. C. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 185-190, 1983.
8. GARCIA-RODRIGUEZ, J. A.; MARTIN SANCHEZ, A. M.; CANUT BLASCO, A.; GARCIA LUIS, E. J.; LUNA RODRIGO, G. Incidence of *Cryptosporidium* sp in patients treated in a general hospital. Technics for the identification of oocysts in feces. *Med. Clin. (Barc)*, 93: 164-168, 1989.
9. MATTIELLO, R. M. A. Prevalência de enteropatógenos em crianças hospitalizadas por diarreia: Aspectos clínicos e epidemiológicos. Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 189p, 1995. (Dissertação de mestrado).

10. MCAULIFFE, J. F.; SHIELDS, D. S.; SOUZA, M. A.; SAKELL, J.; SCHORLING, J.; GUERRANT, R. L. Prolonged and recurring diarrhea in the Northeast of Brazil: Examination of cases from a community-based study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 5: 902-906, 1986.
11. MEINHARDT, P. L.; CASEMORE, D. P.; MILLER, K. B. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiol. Rev.*, 18: 118-136, 1996.
12. MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70: 1156-1160, 1976
13. NEVES, D. P.(ed.) *Parasitologia Humana*. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1979.
14. NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592-598, 1976.
15. SAMBOURG, M.; GOUDEAU, A.; COURANT, C.; PINON, G.; DENIS, F. Direct appraisal of latex agglutination testing, a convenient alternative to enzyme immunoassay for the detection of rotavirus in childhood gastroenteritis, by comparison of two enzyme immunoassays and two latex tests. *J. Clin. Microbiol.*, 21: 622-625, 1985.
16. SEARS, C. L.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: the complexity of intestinal pathophysiology. *Gastroenterology*, 106: 252-267, 1994.
17. SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.*, 2: 9-11, 1977.
18. SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol. Today*, 6: 8-12, 1990.

19. TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic gland of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 5: 12-13, 1907.
20. TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.*, 47: 84-96, 1983.
21. UHNOO, I.; WADELL, G.; SVENSSON, L.; OLDING-STENKVIST, E.; EKWALL, E.; MOLBY, R. A etiology and epidemiology of acute gastro-enteritis in Swedish children. *J. Infect.*, 13: 73-89, 1986.
22. UNGAR, B. Cryptosporidiosis in humans. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. eds. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton, CRC Press, 1990:59-82.
23. WANKE, C. A.; SCHORLING, J. B.; BARRETT, L. J.; SOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. *Pediatr. Infect. Dis.*, 10: 746-751, 1991.
24. WITTENBERG, D. F.; SMITH, E. G.; VAN DEN ENDE, J.; BECKER, P. J. *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in children. *Ann. Trop. Paediatr.*, 7: 113-117, 1987.

Tabela 1 – Frequência de *Cryptosporidium* sp em amostras de fezes na população atendida no HC – FMRP-USP, no período de 1990-97.

Grupo de amostras	Fezes diarréicas	Positividade	
	(N <sup>o</sup> )	(N <sup>o</sup> )	(%)
Crianças	2.913	409	14,00
Adultos	452	110	24,30
Total	3.365	519	15,42

Tabela 2 – Frequência e associações de outros enteropatógenos na população atendida no HC – FMRP-USP, cujas fezes mostraram positividade para *Cryptosporidium* sp.

Grupo de amostras	Associações N <sup>o</sup> (%)		Enteropatógenos									
			<b>EPEC</b>		<b>Salm.</b>		<b>Shig.</b>		<b>Camp.</b>		<b>Rota.</b>	
			N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
Crianças	85	20,70	47	11,50	17	4,20	10	2,40	8	1,90	3	0,70
Adultos	16	14,50	04	3,60	08	7,30	04	3,60	–	–	–	–

**EPEC:** *Escherichia coli* Enteropatógena Clássica; **Salm.:** *Samonella* sp; **Shig.:** *Shigella* sp; **Camp.:** *Campylobacter* sp; **Rota.:** Rotavírus.

# Níveis plasmáticos de ácido ascórbico em pacientes infectados pelo HIV após suplementação com acerola (*Malpighia glabra L.*)\*

Sônia de Lucena Mioranza<sup>1</sup>, Maria José de Carvalho Costa<sup>2</sup>, Maria Amélia Amado Rive-  
ra<sup>3</sup>, Joana D'arc da Silveira Frade<sup>4</sup>.

## RESUMO

Devido à escassez de pesquisas sobre o estado vitamínico C, e, sabendo-se dos efeitos da vitamina C no sistema imunológico, objetivou-se neste trabalho, verificar o impacto de uma suplementação com suco de acerola (*Malpighia glabra L.*) nos níveis plasmáticos de ácido ascórbico de 18 pacientes infectados pelo HIV, de ambos os sexos, classificados em dois grupos: experimental e controle. O grupo experimental recebeu a suplementação, contendo em média 500 mg de ácido ascórbico durante 35 dias consecutivos, e, o grupo controle recebeu um placebo. Realizou-se uma coleta de sangue para mensurar os níveis de ácido ascórbico no 1º e no 36º dia do experimento. Os resultados mostraram que no primeiro dia do experimento 50% dos pacientes do grupo controle apresentaram níveis normais de ácido ascórbico ( $>0,80$  a  $1,60$  mg/dl), 25% carência moderada ( $0,20$  a  $0,80$  mg/dl), 12,5% carência grave ( $<0,20$  mg/dl) e 12,5% níveis acima do normal ( $>1,60$  mg/dl). No final final do experimento, 37,5% apresentaram níveis normais ( $>0,80$  a  $1,60$  mg/dl), 50% carência moderada ( $0,20$  a  $0,80$  mg/dl) e 12,5% níveis acima do normal ( $>1,60$  mg/dl). Antes da suplementação vitamínica, 60% dos pacientes do grupo experimental mostraram carência moderada ( $0,20$  a  $0,80$  mg/dl), 30% níveis normais ( $>0,80$  a  $1,60$  mg/dl) e 10% níveis acima do normal ( $>1,60$  mg/dl). Após a suplementação, 80% dos pacientes acusaram níveis normais ( $>0,80$  a  $1,60$  mg/dl), e 20% carência moderada ( $0,20$  a  $0,80$  mg/dl). Os dados encontrados revelaram que a suplementação com acerola aumentou significativamente os níveis plasmáticos de ácido ascórbico nos pacientes infectados pelo HIV do grupo experimental.

**PALAVRAS-CHAVE** ⇒ AIDS, suplementação com ácido ascórbico, acerola, imunidade, HIV.

---

\* Parte do trabalho de dissertação de mestrado - UFPB

<sup>1</sup> Farmacêutica-Bioquímica

<sup>2</sup> Professora Phd do Departamento de Nutrição-UFPB

<sup>3</sup> Professora Phd do Departamento de Nutrição-UFPB

<sup>4</sup> Médica Infectologista do Hospital Universitário Lauro Wanderley-UFPB

## SUMMARY

Because of scarcity of researches about the vitaminic C state, and, knowing the vitamin C effects in the immunologic system, it was intended, in this work, to verify the impact of a supplementation with “acerola” juice (*Melipighia glabra L.*) in plasmatic level of ascorbic acid in 18 patients infected by HIV, from both sexes, classified in two groups: experimental and control. The experimental group received the supplementation, containing on an average 500 mg of ascorbic acid during 35 consecutive days, and, the control group received a placebo. It was realized a collect of blood for measure the ascorbic acid level in the 1<sup>st</sup> and in the 36<sup>th</sup> day of experiment. The results showed that in first day of experiment 50% control group’s patientes exhibited normal levels of a ascorbic acid (>0,80 to 1,60 mg/dl), 25% moderated lack (0,20 to 0,80 mg/dl), 12,5% serious lack (<0,20 to 0,80 mg/dl) and 12,5% levels above normal (>1,60 mg/dl). In the finish of experiment, 37,5% presented normal levels (>0,80 to 1,60 mg/dl), 50% moderated lack (0,20 to 0,80 mg/dl) and 12,5% levels above normal (>1,60 mg/dl). Before the vitaminic supplementation, 60% of the experimental group’s patientes showed moderated lack (0,20 to 0,80 mg/dl), 30% normal levels (>0,80 to 1,60 mg/dl) and 10% levels above normal (>1,60 mg/dl). After the supplementation, 80% of patients indicated normal levels (>0,80 to 1,60 mg/dl) and 20% moderated lack (0,20 to 0,80 mg/dl). The data found revealed that the supplementation with “acerola” increased considrably the plasmatic levels of ascorbic acid in th patients infected by HIV of experimental group.

**KEY WORDS** ⇒ AIDS, supplementation with ascorbic acid, “acerola”, immunity, HIV

---

## INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a interrelação entre imunidade, infecção e desnutrição citada por diversos autores, entre eles, SOARES et al<sup>43 e 44</sup>, AUGUSTO<sup>2</sup> e WAITZBERG<sup>47</sup> está também presente na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Diversos fatores tem contribuído efetivamente para debilitar o estado nutricional de pacientes com AIDS. Para FERRINI<sup>10</sup> as manifestações presentes no curso clínico da AIDS podem modificar a ingestão oral e o estado nutricional destes pacientes como também a terapia com drogas (AZT, DDI...) pode interferir na absorção e metabolismo de nutrientes. AUGUSTO<sup>2</sup>, descreve, que, por ser o paciente aidético imunodeprimido, e, suas necessidades nutritivas estarem aumentadas, este paciente se torna um desnutrido em potencial, devendo, portanto, receber um aporte médio de 500 calorias acima dos requerimentos energéticos normais.

Trabalhos realizados relatam que a carência subclínica de vitaminas altera várias funções orgânicas, prejudicando a saúde dos indivíduos, deixando-os vulneráveis a determinadas patologias (COSTA<sup>6</sup>).

HALFELD<sup>16</sup> e GUILLAND, LEQUEU<sup>13</sup>, recomenda a utilização de suplementos vitamínicos em situações como *stress*, dietas hipocalóricas, fumantes, alcóolotras, em esquemas de treinamento físico intenso, idosos e absorção alimentar prejudicada. Desta forma, uma suplementação de vitamina C poderá contribuir, repondo as perdas ocorridas e mantendo os níveis séricos de ácido ascórbico destes pacientes dentro dos níveis normais,

tendo em vista que o paciente aidético apresenta uma hiperatividade metabólica (SOARES<sup>44</sup>), fazendo-se necessário, portanto, uma reposição periódica destes elementos.

Segundo SCHWARTZ, WEISS<sup>36</sup> há uma relação estatisticamente significativa entre a quantidade de vitamina C ingerida e a incidência de infecções respiratórias, com efeito protetor no desenvolvimento dos sintomas respiratórios crônicos. Pelos dados do Ministério da Saúde<sup>28</sup>, as infecções oportunistas mais incidentes que acometem os pacientes com AIDS têm sido, entre outras, pneumonia por pneumocistis carinii (31,2%) e tuberculose (19,9%) relacionadas ao trato respiratório, sendo a segunda e terceira mais frequentes, respectivamente, perdendo apenas para a Candidíase (54%).

SCHORAH et al<sup>35</sup>, descreve em seu trabalho que os níveis de vitamina C estão consideravelmente comprometidos, particularmente em processos fisiológicos cuja defesa orgânica está consideravelmente comprometida, como em pacientes graves submetidos à unidade de tratamento intensiva (UTI), acometidos por doenças severas agudas ou crônicas, incluindo, injúrias acidentais, septicemia, pacientes em recuperação pós-cirúrgica e insuficiência orgânica. Vários fatores relacionados ao processo da doença contribuem para uma diminuição das concentrações desta vitamina nestes pacientes.

Conforme os experimentos de SIEGEL et al<sup>38</sup> a vitamina C intensifica a formação de interferon e tem um papel na modulação da resposta imunológica.

ENSTROM et al<sup>9</sup> em seus estudos, relatou a redução geral da mortalidade em pacientes acometidos por várias moléstias após o uso da suplementação com vitamina C.

SILVA et al<sup>40</sup>, descrevem, em crianças desnutridas com deficiência de vitamina C, a importância do ácido ascórbico na atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans*. Após suplementação com acerola houve um aumento significativo da fagocitose e da percentagem de lise das células, provavelmente devido à influ-

ência que a vitamina C exerce sobre os fatores de reconhecimento e atividade enzimática do fagócito.

LEVINE et al<sup>20</sup>, enfatiza os efeitos positivos da vitamina C em doenças coronarianas, mortalidade geral, congestão e no tempo de desenvolvimento da AIDS.

A associação dos efeitos da vitamina C na diminuição da progressão da AIDS, em homens homossexuais/bissexuais infectados pelo vírus HIV-1, foi descrita por TANG<sup>45</sup>. Em seus estudos, durante um período médio de 6-8 anos, estes pacientes foram examinados através de um questionário semiquantitativo de frequência alimentar para análise da ingestão total de micronutrientes (vitamina C, B<sub>1</sub>, niacina, zinco, vitamina A). O pesquisador chegou a conclusão que pacientes com altos níveis de ácido ascórbico, proveniente tanto da dieta como de suplementos nutricionais demoraram mais tempo para desenvolver os sintomas da AIDS.

Sabendo-se dos efeitos da vitamina C a nível do sistema imunológico (MEYDANI et al<sup>26</sup>; WEIMANN, WAISER<sup>48</sup>; OLM, CAMPOS<sup>30</sup>), a manutenção dos níveis normais desta vitamina nos pacientes acometidos pela AIDS, cujo sistema imune está altamente comprometido, torna-se extremamente importante. Logo, objetivou-se neste trabalho, conhecer os níveis de vitamina C no plasma destes pacientes e os efeitos da suplementação com esta vitamina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram incluídos neste estudo 18 pacientes infectados pelo vírus HIV. Esta amostra foi dividida em dois grupos: experimental com 10 pacientes que receberam suplementação

ção com suco de acerola, contendo em média 500 mg de ácido ascórbico, durante 35 dias consecutivos, e, o grupo controle com 8 pacientes que receberam o placebo.

Inicialmente, foi feita uma coleta de sangue com os pacientes em jejum por um período de 10 horas para verificação dos níveis plasmáticos de ácido ascórbico, e, após a suplementação, no 36º dia, foi feita uma nova coleta de sangue seguida da dosagem do ácido ascórbico para avaliar os efeitos desta suplementação.

Durante o período do estudo foi feita uma avaliação diária da ingestão de vitamina C através de inquérito dietético (MAHAN, ARLIN<sup>23</sup>) como também acompanhamento clínico do paciente, controle de medicamentos e consumo de álcool, tabaco e drogas.

A vitamina C plasmática foi dosada pelo método espectrofotométrico de BLUMENKRANTZ<sup>3</sup>, usando-se o 2,4-Dinitrofenilhidrazina como corante.

No tratamento estatístico dos dados utilizou-se o Software estatístico SPSS/PC-Statistical Package for the Social Science for Windows versão 6.0.1 na determinação das médias, desvios padrões e aplicação do teste exato de Fischer (NORUSIS<sup>29</sup>).

## **RESULTADOS**

Através da tabela 1 verificou-se que, no primeiro dia do experimento, 50% dos pacientes do grupo controle apresentaram níveis normais de ácido ascórbico (>0,80 a 1,60 mg/dl), 25% revelaram carência moderada (0,20 a 0,80 mg/dl), e, 12,5% carência grave (< 0,20 mg/dl) e níveis acima do normal (>1,6 mg/dl). No final do experimento, 37,5% destes pacientes mostraram níveis normais de ácido ascórbico (>0,80 a 1,60 mg/dl), 50% da amostra carência moderada (0,20 a 0,80 mg/dl) e 12,5% valores acima do normal (>1,60 mg/dl).

Antes da suplementação 60% dos pacientes do grupo experimental apresentavam carência moderada de ácido ascórbico (0,20 a 0,80 mg/dl), 30% revelaram níveis normais (>0,80 a 1,60 mg/dl) e 10% níveis acima do normal (>1,6 mg/dl). Após a suplementação vitamínica 80% destes pacientes mostraram níveis normais (>0,80 a 1,60 mg/dl) e 20% acusaram carência moderada (0,20 a 0,80 mg/dl).

**Tabela 1 - Distribuição da amostra em relação aos níveis plasmáticos de ácido ascórbico antes e após a suplementação com acerola.**

Níveis Plasmáticos (mg/dl)	Grupo Experimental				Grupo Controle			
	Antes		Após		Antes		Após	
	n	%	n	%	n	%	n	%
< 0,20	-	-	-	-	1	12,5	-	-
0,20 a 0,80*	6	60	2	20	2	25	4	50
>0,80 a 1,60	3	30	8	80	4	50	3	37,5
> 1,60	1	10	-	-	1	12,5	1	12,5
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

Fonte: Hospital Clementino Fraga. João Pessoa, 1996.

\* Teste exato de Fisher para o nível de 0,20 a 0,80 mg/dl, comparando-se ambos os grupos.

Grupos Experimental e Controle:  $p = 0,000518$  (significativo a 1%).

Aplicando-se o teste exato de Fischer os dados fornecem uma probabilidade de 0,000518 associada à hipótese nula que não houve mudança, sendo significativo ao nível de 1%. Isto significa que houve diferença significativa ao nível de 1% ( $p=0,000518$ ) nos níveis plasmáticos de 0,20 a 0,80 mg/dl, quando se comparou os grupos experimental e controle antes e após a suplementação com acerola. Fato este que não ocorreu nos níveis plasmáticos de >0,80 a 1,60 mg/dl, onde a probabilidade associada à hipótese nula foi de 0,1814 (> 10%), não havendo diferença significativa ( $p=0,1814$ ) neste nível.

As tabelas 2 e 3 mostram os valores médios de ácido ascórbico (nos grupos controle e experimental) antes e após a suplementação com acerola, de acordo com os subgrupos formados.

A análise estatística não mostrou diferença estatisticamente significativa dos efeitos da suplementação com suco de acerola sobre os níveis plasmáticos medianos de ácido ascórbico nos indivíduos do grupo experimental, quando os mesmos foram subdivididos de acordo com o consumo de álcool, tabaco, medicação anti-viral, fármacos contendo vitamina C e alterações clínicas graves.

**Tabela 2 -Distribuição das variáveis<sub>1</sub> estudadas e níveis plasmáticos médios de ácido ascórbico no grupo experimental antes e após a suplementação com acerola**

GRUPO EXPERIMENTAL							
SUBGRUPOS	Álcool <sub>2</sub>	Tabaco	Alteração clínica <sub>3</sub>	Medicação anti-viral	Fármacos contendo vitamina C	Níveis Plasmáticos (mg/dl)	
						Antes X±DP	Após
A n=1	**	**	**	**	ENERGIL C (1000mg)	1,6	1,0
B n=3	**	**	**	AZT/DDI AZT/DDI/Crixivam DDI	**	0,77± 0,41	0,90 ± 0,082
C n=2	*	* (20unid)	*	AZT/DDI	**	1,25 ± 0,45	1,1 ± 0,1
D n=3	**	**	*	AZT/DDI AZT/DDI/HIVID AZT/DDI	**	0,93 ± 0,42	1,33 ± 0,25
E n=1	**	**	*	**	**	0,3	0,4

Fonte: Hospital Clementino Fraga. João Pessoa, 1996.

\*\* = Não \* = Sim

1=Durante o período da pesquisa

2= Consome álcool socialmente

3= Grave (presença de infecções oportunistas ⇒ tuberculose, toxoplasmose, câncer secundário)

**Tabela 3 - Distribuição das variáveis<sub>1</sub> estudadas e níveis médios de ácido ascórbico no grupo controle antes e após o experimento**

GRUPO CONTROLE							
SUBGRUPOS	Álcool <sub>2</sub>	Tabaco	Alteração clínica <sub>3</sub>	Medicação anti-viral	Fármacos contendo vitamina C	Níveis Plasmáticos (mg/dl)	
						Antes X±DP	Após
F n=3	**	**	*	**	Energil C (1000mg) Berocca (1000mg)	1,4 ± 0,65	1,2 ± 0,78
G n=2	**	**	**	AZT/DDI/Invirase Hivid/DDI/Invirase	**	0,65 ± 0,55	0,75 ± 0,25
H n=1	**	* (20unid)	*	**	**	1,5	0,9
I n=1	*	* (20unid)	**	AZT/DDI	**	1,2	0,7
J n=1	**	**	**	AZT/DDI	Berocca (1000mg)	0,7	1,0

Fonte: Hospital Clementino Fraga. João Pessoa, 1996

\*\* = Não \* = Sim

1= Durante o período da pesquisa

2= Consome álcool socialmente

3= Moderada (febre,tosse,dor torácica,diarréia)

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Como ficou demonstrado na tabela 1 os pacientes do grupo experimental com níveis plasmáticos de ácido ascórbico situados entre 0,20 e 0,80 mg/dl apresentaram aumento significativo destes níveis, após a suplementação com acerola, em relação aos pacientes do grupo controle. Provavelmente, estes pacientes, inicialmente classificados como carentes subclínicos em ácido ascórbico, e, ao final do estudo pacientes com níveis nor-

mais de ácido ascórbico, demonstraram uma melhor utilização desta vitamina pelo organismo, justificando, desta forma, o estímulo ao uso deste suplemento, considerando-se os efeitos positivos da vitamina C no sistema imunológico.

A ingestão da vitamina C sobre a forma de fármaco influenciou diretamente, aumentando os níveis de ácido ascórbico de quatro pacientes de ambos os grupos. Situação esta citada por vários pesquisadores e demonstrada em pacientes idosos por SIMÕES<sup>41</sup>.

Pacientes do subgrupo C apresentaram um pequeno decréscimo nos níveis de ácido ascórbico, entretanto, estes indivíduos eram fumantes, consumiam bebida alcoólica moderadamente, e, durante o período do estudo, tiveram alterações clínicas significativas (diarréia, febre alta, sudorese noturna, tosse, infecções na pele, entre outras). Fatores que contribuíram, provavelmente, para a redução desta vitamina, fato já demonstrado na literatura (GUILLAND, LEQUEU<sup>13</sup>; LEVINE et al<sup>20</sup>; SCHORAH et al<sup>35</sup>; COSTA et al<sup>6</sup>).

De acordo com alguns autores, estudos científicos comprovam que o fumo têm influência nos níveis desta vitamina no organismo. FRAGA et al<sup>11</sup> falam da importância do ácido ascórbico contra os danos oxidativos, principalmente em fumantes. Da mesma forma, OLM, CAMPOS<sup>30</sup> relatam que o fumo diminui a concentração de ascorbato no plasma e em leucócitos.

As concentrações plasmáticas, leucocitárias e urinárias do ácido ascórbico são significativamente inferiores em indivíduos que consomem bebida alcoólica. Uma ingestão insuficiente desta vitamina é a etiologia mais comumente admitida (GUILLAND, LEQUEU<sup>13</sup>; RISSANEN et al<sup>32</sup>; GUILLAND et al<sup>14</sup>).

Como também, os resultados sugerem o possível efeito das infecções, alterando os níveis plasmáticos do ácido ascórbico (MAHAN, ARLIN<sup>23</sup>; GERSHOFF<sup>12</sup>).

Para SOARES et al<sup>43</sup>, a interação imunidade/desnutrição /infecção na maioria das vezes não permite a dissociação de cada um destes três fatores, dificultando, deste modo, a interpretação clínica e laboratorial, e, criando um ciclo vicioso onde a desnutrição leva à deficiência imunitária que aumenta a susceptibilidade às infecções, com conseqüentes alterações adicionais no estado nutricional e imunitário.

Segundo TSUJI et al<sup>46</sup>, os níveis plasmáticos de vitamina C podem sofrer alterações mesmo na ausência de doença. Fatores como idade, sexo, *stress*, atividade física podem influenciar os valores desta vitamina, entretanto, o mecanismo como isto ocorre não está bem caracterizado. Diante do exposto, seria válido questionar se os pacientes infectados pelo vírus HIV se comportam de uma maneira peculiar em relação a absorção de ácido ascórbico pelo organismo.

Diante do exposto, a origem deste comportamento nos pacientes infectados pelo HIV pode ser multifatorial: anorexia, má absorção intestinal, hipermetabolismo, infecções associadas, alterações nutricionais mistas podem estar associados com a singularidade destes resultados.

Entretanto, mesmo imunodeprimidos, alguns pacientes responderam positivamente à suplementação com acerola, não se descartando a possibilidade de uma intervenção vitamínica precoce e eficiente para manter os níveis séricos destes pacientes dentro das normas recomendadas.

De fato a suplementação com acerola, na amostra estudada, teve um papel relevante e potencialmente importante, aumentando significativamente os níveis plasmáticos de ácido ascórbico em pacientes com carência subclínica, e, mantendo os níveis desta vitamina dentro dos valores normais, mesmo se tratando de pacientes que apresentavam alterações clínicas graves.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANESE, Anthony A. Determination of Leucocyte Ascorbic Acid. Nutrition Reports International, Los Altos, California, v.12. n.5, nov-1975.
2. AUGUSTO, A.L.P., ALVES D.C., MANNARINO I.C., GERUDE M. Terapia Nutricional. São Paulo: Atheneu, 1993, 293 p.
3. BLUMENKRANTZ, N. Fertil Steril, vol. 18, p.801-806, 1977.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS, 1994.6(2): setembro.
5. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Staging classification systems for HIV infection. In: AIDS 90 SUMMARY: A practical synopsis of the VI International Conference. Philadelphia: A Philadelphia Sciences Group Publication, 1991, 322 p.
6. COSTA CARVALHO, MJ et al. Vitamin Status of subjects in Burgundy (France). Annals of nutrition and metabolism. Munchen 2 FRG, Alemanha. v.40: 24-5p, 1996.
7. COSTA M.J.C. et al. Níveis séricos de Vitamina C e suplementação com acerola (*Malpighia Glabra*) em pré-escolares. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF NUTRITION IN PEDIATRICS, 2, 1994, Lisboa. Anais... Lisboa.1994. p.80.
8. DELGADO, Lúcia de Fátima, FISBERG M., CARVALHO, E.S. Infecção e Desnutrição. Pediatria Moderna, v. 31, p.633-640. Julho 1995.
9. ENSTROM, J.E. et al. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. Epidemiology, 1992, vol.3, p.194-202.
10. FERRINI, M.T. et al. Efeito do suporte nutricional na sobrevivência dos pacientes com AIDS-IV C. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo, v.48, n.4, p.161-166, jul-ago. 1993.
11. FRAGA, CG, et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 11003-6.
12. GERSHOFF, Stanley N. Prophylactic vitamin C: misplaced zeal. American Journal of Clinical Nutrition, USA, v.59, n.1, p. 132, january, 1994.
13. GUILLAND, Jean-Claude e LEQUEU, Bruno. As vitaminas: do nutriente ao medicamento. São Paulo: Santos, 1995, 357 p.
14. GUILLAND, Jean-Claude et al. Interrelations of alcohol intake with blood vitamin status in non-alcoholic subjects. Nutrition Research. Ed. Pergamon Press v. 15,p1832-1844,1995.

15. GREEN, C.J. Nutritional support in HIV infection and AIDS. Clinical Nutrition, Scotland, Glasgow, v.14, n.4, p.197-262, august 1995.
16. HALFELD, GERALDO. Normas sobre doses de vitaminas, sais minerais e oligoelementos em medicamentos e suplementos nutricionais. Anais da Academia Nacional de Medicina, 1994, n.3, v.154, p.128-133, julho/setembro, 1994.
17. IMAGAWA, D. T. et al. Human Immunodeficiency Virus Type-1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. The New England Journal of Medicine, Boston, v. 320, n. 22, p.1458-1462, June 1989.
18. JARRETT, R.J. Nutrition and Disease. Grã Bretanha, London: Ed.Croom Helum Ltd, 1979. 218 p. cap.3. p.173-215.
19. JORDÃO, Paulo Ribeiro, BONNAS, Deborah Santesso. Teor de Vitamina C em Polpa de Acerola Extraída com e sem Inativação Enzimática dos Frutos. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS E SIMPÓSIO BRASILEIRO DE QUÍMICA DE ALIMENTOS, 9, 1, 1995, João Pessoa. Anais...João Pessoa. 1995. p.78.
20. LEVINE, Mark et al. Determination of optimal vitamin C requirements in humans. American Journal of Clinical Nutrition, USA, v.62 (suppl), n.6, p. 1347S -56S, december, 1995.
21. LOEFFLER, J.H., Ponting, J.D. Ind. Eng.Chem., Ed., 14; 846 p., 1942.
22. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. Protein measurement with Folin Phenol Reagent. Journal Biol.Chem. Baltimore, n.193: p. 265-275, 1951.
23. MAHAN, L.K. & ARLIN, M.T. Krause. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo: Roca, 1995. p.957
24. MATSUURA, F.C.A.U., MENEZES, H.C. Perdas de Ácido Ascórbico na Pasteurização e Concentração de Suco Integral de Acerola. In: CONGRESSO BRASILEIROS DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador, Bahia. Anais. Salvador, Bahia, 1994. v.1, p.104-105.
25. MEDEIROS, M.G.P.F. et al. AIDS - Boletim Epidemiológico. Ano VIII, nr.3 p.33-35. Semana Epidemiológica. Junho a Agosto, 1995.
26. MEYDANI, S.N., HAYEK, M., COLEMAN, L. Influence of vitamin E and B6 on immune response. In: Sauberlich HE, Machlin LJ (eds), Beyond deficiency: new view on the function and health effects of vitamins. Ann NY, Acad Sci, vol.669, p.125-140, 1992.
27. MIRANDA, José Frederico Granado de. Emprego da Nutrição Parenteral Total (INPT) no Tratamento de Doentes Portadores de Infecção pelo Vírus HIV. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, n. 2, p. 81, abril 1989.
28. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, Boletim Epidemiológico. AIDS, 1994. 6 (2): Setembro.

29. NORUSIS, Marija J. SPSS for windows: Base System User's Guide. Release 5.0, Chicago: SPSS Inc. 1992, 645 p.
30. OLM, Mary Anne Kowal, CAMPOS, Sandra de Oliveira. Vitaminas e Infecção. Infectologia Pediátrica, São Paulo, v.31, Edição Especial, p.650-654 julho, 1995.
31. RAITEN, D. J. Nutrition and HIV Infection: a review and evaluation of the extent knowledge of the relationship between nutrition and HIV infection. Bethesda: Life Sciences Research Office - Federation of American Societies for Experimental Biology, p.99 Nov. 1990.
32. RISSANEN, A; SARLIO, LS; ALFTHAN, G; GREF, CG; KESO, L; SALASPURO, M. Employed problem drinkers = a nutritional risk group? American Journal of Clinical Nutrition, USA, v.45, p. 456-61, 1987.
33. ROE, J.H., KUETHER, Carl A. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. The Journal Biological Chemistry, USA, vol. 147, p.399-407, 1943.
34. RUNDLES, Cunningham Suzana. Effects of nutritional status on immunological function. American Journal of Clinical Nutrition, USA, n.35, p.1202-1210, may. 1982.
35. SCHORAH, Christopher, J. et al. Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients. American Journal of Clinical Nutrition, USA, v.63, n.5, p. 760-765, may, 1996.
36. SCHWARTZ, Joel, WEISS, Scott T. Relationship between dietary vitamin C intake and pulmonary function in the First National Health and Nutrition Examination Survey. American Journal of Clinical Nutrition, USA, v.59, n.1, p.110-4, january 1994.
37. SCHWENK, A. et al. Evaluation of nutritional counselling in HIV-associated malnutrition. Clinical Nutrition, v.13, n.4, p.212-220, august 1994.
38. SIEGEL, Benjamin V. et al. Vitamina C, Interferon e Resposta Imunológica. Roche: Vitaminoterapia, Rio de Janeiro, n. 7, p.11. 1976.
39. SIEGEL, Benjamim V. e LEIBOVITZ, Brian. Vitamina C no Envelhecimento e no Câncer. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE VITAMINA, 2, Roche Serviço, 1976.
40. SILVA, Bosco Christiano M. et al. Avaliação da capacidade fagocitária e lítica de polimorfonucleares (PMN) frente ao antígeno *Candida albicans*, em crianças com hipovitaminose C. In: II ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB. João Pessoa, Paraíba, 1994. Anais. Universidade Federal da Paraíba. Pró-reitoria de Pós- Graduação e Pesquisa, 1994.
41. SIMÕES, Mônica Oliveria da Silva. Efeitos de uma suplementação de vitamina C sobre os níveis séricos de ácido ascórbico em idosos institucionalizados no município de João Pessoa-Pb: um estudo comparativo entre a vitamina C da acerola e sob a forma de fármaco. João Pessoa: UFPB, 1997. (Dissertação de mestrado).

42. SIMPOSIO SOBRE NUTRICION Y SIDA. nov-dezembro 1988, Genebra. Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana. Genebra. Anais... Genebra. 1988, v. 105, n. 5 y 6, p. 751-752.
43. SOARES, Rosa Leonôra Salerno et al. Estudo de Correlação entre o teste da tuberculina (PPD), estado nutricional e imunológico em pacientes infectados pelo HIV. Anais da Academia Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, 1993, nº3, vol.153, p.130-131, julho/setembro 1993.
44. \_\_\_\_\_. Avaliação nutricional em pacientes infectados pelo HIV, estudo de 30 casos. Anais da Academia Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, 1994, nº3, vol.154, p.118-121, julho/setembro 1994.
45. TANG, Alice M. et al. Dietary micronutrient intake and risk of progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus type I (HIV-I)-infected homosexual men. Am J.Epidemiol, 1993, vol.138, p.937-951.
46. TSUJI, Hissachi et al. Efeito de idade, sexo e estresse físico sobre os níveis séricos de Vitamina C em indivíduos saudáveis. Revista Brasileira de Patologia Clínica, Rio de Janeiro, vol.29, nº3, p.83-86, julho/agosto/setembro, 1993.
47. WAITZBERG, Dan L. Nutrição enteral e parenteral na prática clínica. São Paulo: Atheneu, 1990, 434 p.
48. WEIMANN, B.J., WEISER, H. Effects of antioxidant vitamin C, E, and beta-carotene on immune functions in MRL/lpr mice and rats. In Sauberlich HE, Machlin LJ (eds), Beyond deficiency: new view on the function and health effects of vitamins. Ann NY, Acad Sci, vol.669, p.390-392, 1992.
49. YARCHOAN, et al. Aids Therapies. Scientific American, New York, v.259, n.4, p. 88-97, Oct. 1988.
50. ZAHA, Inouye M.M. et al. Comportamento de Parâmetros Imunológicos em Indivíduos Portadores de HIV, Atendidos no HURNP, Segundo Classificação em Grupos I, II, III, IV da AIDS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 20, 1993, São Paulo. Anais... São Paulo: SBAC, 1993. p.47

## **TÍTULO**

O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina.

III- Testes para função espermática.

The role of semen analysis in the male infertility.

III- Sperm function tests.

## **AUTOR**

Fernando Tadeu Andrade-Rocha (Farmacêutico-bioquímico)

## **INSTITUIÇÃO**

Laboratório Dr. Homero Soares Ramos - Petrópolis, RJ

Laboratório Dr. Ivan Mostaro - Juiz de Fora, MG

## **ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA**

Rua Irmãos D'Ângelo 48 sala 101

25.685-330 Petrópolis, RJ

Telefax (024)-237-6173

## **RESUMO**

O autor revisa o papel do exame do sêmen (espermograma) na investigação de infertilidade masculina. Nesta terceira parte aborda o uso de testes para avaliar a capacidade de fertilização dos espermatozóides (testes funcionais), dando ênfase às metodologias disponíveis para esta avaliação. Simultaneamente descreve alguns aspectos estruturais dos espermatozóides e conceitos atuais sobre fertilização humana.

## INTRODUÇÃO

O espermograma é o exame laboratorial mais usado em todo o mundo para investigação de infertilidade masculina. Sua rotina básica inclui a análise das características gerais dos espermatozóides, isto é, densidade, viabilidade, motilidade e morfologia e a avaliação da atividade secretora das glândulas acessórias genitais, esta, através do exame físico do ejaculado e da determinação dos níveis seminais de alguns produtos bioquímicos secretados nestas glândulas, temas que foram revisados anteriormente por este autor.<sup>1,2</sup>

Apesar de sua tradição, questiona-se muito o valor clínico deste exame atualmente. Pesquisadores alegam que o espermograma analisa a qualidade do sêmen, mas não avalia as transformações e a seqüência de eventos que o espermatozóide enfrenta no trato genital feminino, desde a ejaculação até a fusão com o oócito, ou seja, não investiga sua capacidade de fertilização. Para fazer esta avaliação complementar, diversos métodos laboratoriais conhecidos como **testes funcionais** foram então desenvolvidos. Embora sejam mais aplicados em pacientes que se submetem à fertilização in vitro (FIV), alguns testes são recomendados para utilização na rotina do espermograma,<sup>3</sup> pois dão informações importantes sobre o prognóstico de fertilização.

Neste trabalho o autor revisa conhecimentos atuais sobre este tema, dando ênfase às metodologias disponíveis. Simultaneamente descreve alguns aspectos

estruturais dos espermatozóides e os mecanismos da fertilização humana, que foram usados como referência para o desenvolvimento destes testes.

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ESPERMATOZÓIDES**

Para entender a viabilidade dos testes funcionais, inicialmente é preciso considerar alguns aspectos da estrutura anatômica dos espermatozóides, pois alguns testes avaliam características morfológicas internas espermáticas, cuja normalidade é um pré-requisito para a fertilização. Estas características foram amplamente investigadas e identificadas em condições normais e patológicas, através de ultramicroscopia, em vários estudos prévios<sup>4,5,6,7,8,9</sup> e são resumidas a seguir.

## **ANATOMIA GERAL DOS ESPERMATOZÓIDES**

Classicamente, a estrutura anatômica dos espermatozóides divide-se em cabeça ou região cefálica, junção cabeça-flagelo ou pescoço, peça intermediária e flagelo ou cauda (Figura 1).

### **Cabeça ou região cefálica**

O espermatozóide normal apresenta cabeça oval, que é formada pelo acrossoma, núcleo e membrana plasmática.

Acrossoma - anteriormente conhecido como capa cefálica, o acrossoma é uma organela que ocupa cerca de 2/3 da parte anterior da cabeça, cobrindo parcialmente o núcleo. Constitui-se de matriz homogênea, revestida por 2 membranas, uma externa (“outer acrosome membrane”), situada logo abaixo da membrana plasmática e outra interna (“inner acrosome membrane”), esta, mais próxima do núcleo. Sua distribuição é irregular, embora a matriz seja homogênea, sendo mais larga nos  $\frac{3}{4}$  superiores da cabeça, região conhecida como **segmento principal** e mais fina na parte inferior, esta denominada **segmento equatorial**. Segundo Bisson & David,<sup>7</sup> o segmento principal é quase 4 vezes maior que o segmento equatorial. Abaixo deste, junto ao anel nuclear, ainda observa-se uma fina membrana denominada capa pós-acrossomal. O acrossoma desenvolve-se a partir do aparelho de Golgi da espermátide, durante a espermiogênese<sup>10</sup> e sua principal função é a liberação de 2 enzimas hidrolíticas presentes na matriz, a acrosina e a hialuronidase, que são essenciais para a interação do espermatozóide com o oócito.

Núcleo: constitui-se de massa compacta e uniforme de cromatina, composta predominantemente por DNA ligado a proteínas básicas.<sup>11</sup> O núcleo ainda é formado por vacúolos resultantes do processo de condensação da cromatina,<sup>10</sup> pela membrana nuclear e pela placa basal, esta, situada na zona de implantação do flagelo.<sup>7</sup> Sua estrutura desenvolve-se durante toda a espermatogênese, inclusive com redução do número de cromossomas à metade no espermatócito secundário, mas sua maturação somente tem início na espermiogênese, completando-se durante a passagem dos espermatozoides pelos epidídimos. Este processo envolve uma série de modificações,

que inclui a eliminação de RNA e a formação de proteínas e de pontes dissulfídicas, que estabilizam a cromatina,<sup>12</sup> a qual transforma-se de finamente granular em massa compacta, resistente à desnaturação, que protege o patrimônio genético do espermatozóide. O núcleo é visível na microscopia comum, mas parcialmente coberto pelo acrossoma. Sua melhor visualização é através de microscopia eletrônica e há vários estudos com detalhes a respeito,<sup>7,13,14</sup> inclusive sobre a distribuição dos cromossomas na arquitetura nuclear.<sup>15</sup>

Membrana plasmática - é a estrutura que reveste externamente a cabeça do espermatozóide, desde a parte anterior do acrossoma, até o espaço perinuclear posterior, perto da junção com o flagelo. Sua integridade é muito importante para a fertilização, pois precisa manter-se intacta até a reação acrossômica.

### **Junção cabeça-flagelo**

Esta estrutura situa-se logo abaixo do núcleo e coordena o movimento do espermatozóide tornando-o uniforme e harmonioso. Também designada de pescoço ou colo espermático,<sup>13</sup> a junção cabeça-flagelo divide-se em 2 partes, a peça de conexão e o centríolo proximal.

Peça de conexão - é o seguimento do flagelo mais próximo do núcleo. Sua parte anterior, conhecida como capitulum, articula-se com a placa basal e, posteriormente, reveste toda a peça de conexão. O capitulum é suportado por um sistema de 9 colunas segmentadas, que se fundem na extremidade caudal com a correspondente fibra densa externa do flagelo (“outer dense fibrous”).<sup>9</sup> A estrutura

bioquímica da peça de conexão é formada por proteínas de consistência variável, que se repetem ao longo das colunas segmentadas.<sup>16</sup>

Centríolo proximal - situa-se no centro da peça de conexão perto do núcleo, logo abaixo do capitulum, sendo circundado pelas colunas segmentadas. O centríolo proximal é o ponto de origem do flagelo espermático e o sítio mais provável de geração do movimento flagelar.<sup>16</sup>

Ressalta-se que em termos de análise do sêmen, o defeito mais comum na peça de conexão é a separação da cabeça e o flagelo, ou seja, a formação de espermatozoides decapitados (“pin-head”), que são comuns no sêmen. Este defeito é congênito e resulta de um posicionamento errado da placa basal na espermátide durante a espermiogênese,<sup>17</sup> embora também ocorra após a ejaculação.

### **Peça intermediária**

Esta estrutura é constituída pelo axonema, um conjunto de 9 microtúbulos externos e 2 internos que formam o flagelo e por uma camada de mitocôndrias, que é responsável pela geração de energia para movimento flagelar, a qual é produzida através da difusão de adenosina trifosfato (ATP) para os microtúbulos. A camada de mitocôndrias envolve o axonema em toda a peça intermediária e termina em uma região conhecida como anulus, ou anel de Jensen,<sup>7</sup> na qual é substituída por uma camada fibrosa (“fibrous sheath”), que cobre o axonema até a sua porção distal. No anulus, inicia-se a peça principal do flagelo.

## Flagelo

Divide-se em peça principal e porção distal e sua estrutura básica é o axonema, que se estende desde o centríolo proximal até a porção distal. O axonema compõe-se de 9 microtúbulos periféricos (“outer fibers”) dispostos em pares (“doublets”), que circundam 2 microtúbulos internos e simples (“singlets”), um sistema que é denominado **padrão 9+2**. Este sistema apresenta características similares às aquelas observadas em outros cílios e flagelos do organismo humano (cílios respiratórios, do ouvido, do endométrio, etc.) e de todo o reino animal.<sup>18</sup> Cada par externo de microtúbulos constitui-se de uma sub-unidade A circular e completa e de uma sub-unidade B, em forma de C e incompleta, que fixa-se na superfície da sub-unidade A, enquanto que os microtúbulos centrais são completos e circundados por um sistema elíptico de filamentos (“helical” ou “central sheath”). Uma estrutura em forma de raio de roda (“radial spoke”) une cada par de microtúbulos externos ao sistema elíptico central. A sub-unidade A contém 2 braços (“outer” e “inner arms”), que estendem-se em direção à sub-unidade B seguinte, no sentido horário. Estes braços são formados por uma proteína denominada **dineína**,<sup>19</sup> que é essencial para os espermatozoides, pois interage com a ATP para movimentar o flagelo.

Desenvolvido nos epidídimos, o movimento flagelar é feito através de um deslizamento entre os microtúbulos, regulado pelos raios radiais o qual depende da integridade da membrana plasmática e do conteúdo de ATP disponível nas mitocôndrias da peça intermediária. Na presença de íons magnésio ( $Mg^{2+}$ ), a ATP é hidrolisada pela enzima ATPase presente nos braços da sub-unidade A e a energia

liberada nesta reação é convertida em movimentos mecânicos, que ativam o flagelo. No sistema de microtúbulos, cada sub-unidade A é conectada com a sub-unidade B seguinte, através de pontes de conexão (“nexin links” ou “bridge links”), também formada de material proteico.<sup>20</sup> Circundando os microtúbulos, 9 fibras densas (“outer dense fibres”) mantêm a elasticidade do sistema e protege-o durante o trânsito no trato genital feminino.<sup>9</sup> Toda a estrutura do flagelo (veja ilustração na Figura 2) é envolvida pela bainha fibrosa (“fibrous sheath”) e mais externamente pela membrana plasmática.

Na literatura foram reportados casos de astenozoospermias severas causadas especificamente por defeitos na peça principal do flagelo, tais como a ausência de dineína,<sup>21</sup> de microtúbulos periféricos,<sup>22</sup> centrais,<sup>23</sup> ou ambos,<sup>9</sup> ausência<sup>24</sup> ou displasia<sup>25</sup> da bainha fibrosa e alterações generalizadas.<sup>26</sup> Porém ressalta-se, que é comum encontrar algumas deformações em indivíduos férteis, indicando que estas anormalidades também acontecem em condições normais e fazem parte de um processo de instabilidade estrutural do axonema,<sup>27</sup> que não compromete a motilidade espermática.

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE FERTILIZAÇÃO HUMANA**

A união do espermatozóide com o oócito não é um evento simples como parece. Primeiro, há um longo caminho cheio de adversidades que o espermatozóide percorre após a ejaculação, até alcançar o oócito. Neste trajeto o gameta masculino submete-se a 2 processos biológicos, a capacitação espermática e a hiperativação da

motilidade, que modificam inteiramente suas características internas. Posteriormente, quando consegue atingir o sítio de fertilização ainda enfrenta um complexo mecanismo, altamente seletivo, que dificulta ao máximo sua penetração no oolema. E para completar sua função, o espermatozóide ainda deve possuir um patrimônio genético normal, para que o novo ser desenvolva-se satisfatoriamente enquanto dura a gravidez. Nos próximos ítems, o autor revisa conceitos atuais sobre estes eventos.

## **TRANSPORTE DOS ESPERMATOZÓIDES NO TRATO GENITAL FEMININO**

Durante o coito, espermatozóides estocados na cauda dos epidídimos misturam-se com as secreções das glândulas acessórias genitais e formam o sêmen, o qual é depositado no fórnice da vagina e no cérvix. Logo após a ejaculação, o sêmen coagula-se, mas, ao contrário do que acontece in vitro, há uma rápida ação de fibrinolisinases presentes no plasma seminal, que dissolvem o coágulo e liberam a motilidade espermática. Quando as condições do muco cervical são favoráveis, e.g., na metade do ciclo menstrual, alguns espermatozóides penetram no cérvix entre 1 e 3 minutos após a ejaculação e, a maioria, entre 2 e 10 minutos.<sup>28</sup> Esta penetração rápida é uma defesa natural dos gametas masculinos para escapar da acidez vaginal, pois esta torna-os totalmente imóveis poucas horas após o intercursos.<sup>29</sup>

No muco cervical os espermatozóides sofrem um processo de seleção, no qual, as células mais viáveis migram em direção às criptas cervicais para serem

armazenadas e protegidas, enquanto que os espermatozóides anormais são atacados e destruídos por macrófagos.<sup>30</sup> Esta seleção natural reduz consideravelmente o número de gametas presentes no cérvix. Quando há uma reserva adequada nas criptas, os gametas são liberados aos poucos, durante um longo período e então migram para o oviduto, atravessando o útero, a junção útero-tubal, que somente permite a entrada de espermatozóides com motilidade ativa e o istmus, que limita a passagem dos gametas para evitar a polispermia, até atingir a ampola, sítio da fertilização. Espermatozóides que não conseguem penetrar no oócito, ainda migram até a fimbria e se perdem na cavidade peritoneal, onde são destruídos.

## **CONSIDERAÇÕES SOBRE EVENTOS QUE ANTECEDEM À FERTILIZAÇÃO**

Após a ejaculação os espermatozóides ainda não são hábeis para fertilizar, mas, a partir da entrada no muco cervical, estas células passam por um seqüência de eventos que as tornam capazes de contactar o oócito, penetrar em seus revestimentos e fundir com o oolema. Estes eventos são a capacitação espermática, a hiperativação da motilidade e a reação acrossômica.

### **Capacitação espermática**

Este evento promove uma reestruturação interna do espermatozóide, para aumentar a permeabilidade da membrana plasmática, de modo a facilitar o influxo de

cálcio durante a reação acrossômica.<sup>31</sup> Apesar de conhecida há mais de 40 anos (foi descrita simultaneamente por Austin<sup>32</sup> e Chang<sup>33</sup>), até hoje este evento é pouco compreendido. Conhecimentos atuais indicam que este fenômeno ocorre em diversas etapas e envolve modificações no conteúdo de proteínas fixadas nos espermatozoides,<sup>34</sup> ativação da enzima ATPase,<sup>35</sup> decréscimo nos grupos SH e NH<sub>2</sub> livres presentes na membrana plasmática,<sup>36</sup> alterações no conteúdo glicoproteico<sup>37</sup> e a liberação da enzima de conversão da angiotensina, que participa na indução da reação acrossômica.<sup>38</sup> Glicosidases presentes no fluido folicular e no cumulus oophorus também ativam este processo.<sup>31</sup>

O sítio da capacitação espermática não é bem definido, mas há evidências que este processo inicia-se no útero, completando-se no oviduto<sup>39</sup> e dura de 5 a 6 horas in vivo<sup>40</sup> e de 2 a 22 horas in vitro.<sup>34</sup> Como é um fenômeno de trocas moleculares, não há qualquer alteração na estrutura externa dos espermatozoides, não sendo portanto visível na microscopia comum.

### **Hiperativação da motilidade espermática**

Uma característica peculiar aos espermatozoides é a capacidade destas células de alterar seu padrão de motilidade, dependendo do meio ao qual encontram-se expostos, in vivo, ou in vitro. Esta característica é muito importante, pois os espermatozoides precisam manter-se em estado latente nos epidídimos, serem ativos após a ejaculação para alcançar o muco cervical e hiperativos no oviduto, para penetrar nos revestimentos do óócito. A hiperativação da motilidade caracteriza-se por

desenvolver um movimento vigoroso nos espermatozoides, parcialmente irregular, com grande movimentação da cabeça, mas de pouca progressão,<sup>41</sup> cujo objetivo é gerar força propulsora suficiente para a travessia da matriz do oócito. Este evento antecede à reação acrossômica e apresenta correlação positiva com índices de FIV.<sup>42</sup>

### **Reação acrossômica**

Este evento promove alterações significativas na estrutura e na capacidade funcional dos espermatozoides. Há uma exocitose, com destruição parcial da membrana plasmática e da membrana mais externa do acrossoma e a liberação do conteúdo acrossômico.

A reação acrossômica praticamente inicia-se quando os espermatozoides atingem a ampola. Neste sítio, progesterona ligada a proteínas, presente no fluido folicular,<sup>43</sup> fixa-se em receptores da superfície espermática<sup>44</sup> e promove um rápido influxo de íons cálcio nos espermatozoides,<sup>45</sup> o qual induz a uma intrincada seqüência de trocas moleculares, envolvendo alterações no conteúdo intracelular de sódio, íons hidrogênio e, provavelmente, de cloro e bicarbonato.<sup>46</sup> Estas trocas provocam a exocitose das membranas espermáticas, que desenvolve-se apenas na porção anterior do espermatozoide, mantendo-se intacta a região posterior, a partir do segmento equatorial.<sup>47</sup> Há também evidências do envolvimento de uma glicoproteína presente na zona pelúcida conhecida como ZP3,<sup>48</sup> na indução à reação acrossômica. Supõe-se que a progesterona age primeiro promovendo o influxo de cálcio no espermatozoide, sendo seguida pela ação da ZP3.<sup>49</sup> Com a destruição das membranas espermáticas, há uma

liberação do conteúdo acrossômico, com destaque para a acrosina e a hialuronidase. A acrosina exerce um papel importante na penetração do espermatozóide na zona pelúcida,<sup>50</sup> ao passo que a hialuronidase despolimeriza a matriz existente entre as células do cumulus-oophorus facilitando a penetração do espermatozóide.<sup>51</sup>

Ressalta-se que a reação acrossômica inicia-se na ampola, mas somente completa-se após a penetração do espermatozóide na zona pelúcida.

### **CONSIDERAÇÕES SOBRE A INTERAÇÃO ESPERMATOZÓIDE-OÓCITO**

A interação do espermatozóide com o oócito é a etapa final de sua longa caminhada até a fertilização. Nesta etapa também há uma seqüência de eventos, que envolvem um contato inicial, a penetração do espermatozóide nos revestimentos do oócito e a fusão entre os gametas masculino e feminino. O oócito é uma célula formada por um núcleo (oolema), que é envolvido de dentro para fora pelos grânulos corticais, membrana plasmática, espaço perivitelino, zona pelúcida, coroa radiata e cumulus-oophorus (Figura 3). Espermatozóides capacitados fazem o primeiro contato com o oócito logo após atingirem a ampola, atraídos por um sinal quimiostático emitido por uma substância presente no fluido folicular.<sup>52</sup> Há evidências que somente os gametas com capacidade de fertilização fazem este contato, sendo os demais repelidos.<sup>53</sup> A seguir, o espermatozóide inicia a penetração no cumulus-oophorus e na coroa radiata, provavelmente pela ação de enzimas liberadas durante a reação acrossômica e pelo fluido tubal.<sup>31</sup> A penetração espermática nestas estruturas ainda

depende da força propulsora do flagelo e de outras alterações que ocorrem no padrão de motilidade do espermatozóide, induzidas pelo cumulus-oophorus.<sup>54</sup>

Depois que atravessa o complexo cumulus-oophorus/coroa radiata o espermatozóide alcança a zona pelúcida. Nesta etapa, ainda apresenta o acrossoma intacto, embora haja evidências que espermatozóides pós reação acrossômica também fazem esta interação.<sup>55</sup> A fixação na zona pelúcida é mediada pela ZP3,<sup>48</sup> que fixa-se em receptores presentes na membrana plasmática. Posteriormente, outra glicoproteína, a ZP2, faz uma segunda fixação, desta feita, após a reação acrossômica.<sup>56</sup> Uma terceira glicoproteína, a ZP1, também participa deste processo,<sup>57</sup> mas sua função é pouco conhecida. Ressalta-se que a ação destas glicoproteínas é crucial para a fertilização.

Depois desta etapa, o espermatozóide penetra e permanece no espaço perivitelino durante algum tempo, até sua fusão com o oolema. Esta, inicia-se pela região acrossômica com membrana plasmática intacta, através da emissão de movimentos do tipo pseudópodo, que permite o oolema envolver o espermatozóide. Simultaneamente, há uma contração das estruturas celulares envolvidas neste processo e o espermatozóide praticamente é “empurrado” para o interior do oolema. Posteriormente o oócito libera enzimas proteolíticas presentes nos grânulos corticais, cuja ação provoca profundas alterações na superfície celular para evitar a penetração de outros espermatozóides. Este fenômeno é conhecido como **bloqueio de polispermia**.

Considerações sobre os eventos que ocorrem após a fusão entre os gametas não são objetos de estudo do presente trabalho, mas podem ser consultadas em artigos publicados anteriormente.<sup>31,58,59</sup>

## **APLICAÇÃO DE TESTES FUNCIONAIS EM REPRODUÇÃO HUMANA**

### **1. TESTES PARA AVALIAR OUTRAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS**

#### **Avaliação do “status” do acrossoma**

O melhor método para esta avaliação é a microscopia eletrônica,<sup>9</sup> mas este procedimento é inviável para a rotina do exame do sêmen. Há outras técnicas disponíveis,<sup>60,61,62</sup> mas também são complexas e demoradas sendo usados somente em centros de pesquisa sobre reprodução humana. As vantagens e desvantagens destas metodologias foram investigadas em ampla revisão feita por Cross & Meizel,<sup>63</sup> que pode ser consultada.

Recentemente foi reportado um método para determinar um índice acrossômico, que pode ser usado na rotina do espermograma para esta avaliação.<sup>64</sup> Este método compara espermatozoides com cabeça oval e acrossoma normal (que ocupa de 40-70% da região cefálica) e espermatozoides anormais (cabeça oval e acrossoma <40% ou >70%, defeitos de coloração e outras anomalias), determinando-se um índice baseado no número de espermatozoides normais contados. Valores

>10% apresentam ótima correlação com índices de gravidez após FIV, confirmando a validade do teste.

### **Determinação da atividade de enzimas acrossômicas**

Acrosina- Devido à sua participação na reação acrossômica e na fixação do espermatozóide na zona pelúcida, considera-se a determinação da atividade desta enzima como teste funcional. Sua medida geralmente é feita pelo método de Kennedy et al.<sup>65</sup> e a diminuição na atividade enzimática associa-se com infertilidade masculina<sup>66</sup> e com baixos índices de gravidez após FIV.<sup>67</sup> A atividade desta enzima também diminui em semens polizoospermicos,<sup>68</sup> estando praticamente ausente em indivíduos portadores da síndrome dos espermatozoides de cabeça redonda (“Round-headed syndrome”).<sup>69</sup>

Hialuronidase- Liberada durante a reação acrossômica, esta enzima atua na dispersão das células que circundam o oócito, despolimerizando a matriz do cumulus-oophorus para facilitar a penetração espermática. Em razão desta função biológica, a determinação de sua atividade também é considerada teste funcional que é comumente efetuada pelo método de Hirayama et al.<sup>70</sup>

### **Determinação da maturidade nuclear**

Durante a maturação espermática nos epidídimos, a formação de pontes dissulfídicas entre protaminas nucleares aumentam a estabilidade da cromatina, assegurando a integridade (maturidade) do patrimônio genético dos espermatozoides.

Entretanto, este processo ocorre de forma irregular e no ejaculado encontram-se espermatozóides com cromatina madura e imatura.<sup>71</sup> A imaturidade nuclear associa-se com baixa capacidade de fertilização.<sup>72</sup> Com base nestas propriedades, alguns testes funcionais foram desenvolvidos para avaliar esta característica espermática. Estes testes usam corantes, que avaliam o grau de condensação da cromatina<sup>73,74</sup> e citometria de fluxo, que determina a resistência da cromatina a uma desnaturação térmica.<sup>75</sup> O método de Tejada et al<sup>73</sup> é o mais usado nos laboratórios especializados e pode ser adotado na rotina do espermograma.

### **Determinação da integridade da membrana espermática**

Conhecimentos sobre fisiologia do sêmen mostram que a membrana plasmática apresenta uma capacidade seletiva no transporte de pequenas moléculas para o interior do espermatozóide, vindas do meio ambiente que a envolve. Isto ocorre, por exemplo, na maturação espermática e na reação acrossômica, nas quais, as trocas moleculares são essenciais para que os espermatozóides desenvolvam sua capacidade de fertilização.

Em 1966, Drevious & Eriksson<sup>76</sup> observaram que o espermatozóide submetido a condições hipoosmóticas permite o influxo de água através da membrana espermática, quando há uma atividade funcional normal dentro de sua estrutura interna. Este fenômeno causa um “inchaço” (“swelling”), que é mais evidente no flagelo.

Com base nestas características, Jeyendran et al<sup>77</sup> desenvolveram um método simples para avaliar a integridade da membrana espermática. Conhecido como HOS

(“Hypoosmotic Swelling Test”), este método é amplamente usado em todo o mundo como teste funcional, pois correlaciona-se com as características gerais dos espermatozóides e com outros testes funcionais,<sup>72,78</sup> embora haja algumas opiniões divergentes sobre sua validade.<sup>72,79</sup> Devido à sua simplicidade, o HOS pode ser usado na rotina do espermograma.

Ressalta-se que o HOS mede a integridade da membrana do flagelo, a qual é indicadora da integridade da membrana cefálica. Para avaliação simultânea de ambas, Chan et al<sup>80</sup> propôs a introdução do corante eosina Y na solução hiposmótica usada no HOS. Este corante penetra na cabeça do espermatozóide, quando há perda de sua integridade. Porém, de um modo geral, laboratórios especializados usam a técnica original descrita por Jeyendran et al.<sup>77</sup>

Na literatura há numerosos estudos sobre a aplicação deste teste na investigação de infertilidade e algumas revisões abrangentes são disponíveis.<sup>81,82</sup>

### **Determinação da Adenosina Trifosfato (ATP)**

Gibbons e Rowe<sup>19</sup> demonstraram que a energia necessária para mover o espermatozóide humano é dada principalmente pela ATP, que é gerada via glicólise e em menor proporção, por fosforilação oxidativa. O espermatozóide usa ATP para manter o gradiente de íons em seu interior (e.g. cálcio) e também como fonte de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), outro componente importante de seu metabolismo.

Comhaire et al<sup>83</sup> observaram que os níveis seminais de ATP apresentam uma positiva correlação com a motilidade e a densidade espermática e com o teste de penetração do espermatozóide no ovo de hamster. Estes autores propuseram então o uso da medida de ATP como teste funcional. Porém, em estudos posteriores, verificou-se que esta medida é de valor limitado e depende de vários fatores, tais como a densidade espermática e o número de células redondas presentes no sêmen.<sup>84,85</sup>

Em uma publicação da OMS,<sup>86</sup> vários pesquisadores mediram a ATP em semens com densidade espermática  $>20 \times 10^6$  espermatozóides/ml, cujas parceiras não apresentaram causas aparentes de infertilidade e concluíram que esta medida não apresenta valor preditivo para a gravidez. Assim, a validade da ATP seminal como teste funcional é relativa, embora a OMS recomende a sua medida no exame do sêmen, que é feita por bioluminescência.<sup>87</sup>

## **2. TESTES PARA AVALIAR A INTERAÇÃO ESPERMATOZÓIDE-OÓCITO**

Os testes funcionais citados anteriormente neste trabalho visam, principalmente, a avaliação de componentes da estrutura interna dos espermatozóides, cuja normalidade é essencial para a fertilização. Entretanto, tais testes não são capazes de avaliar diretamente a interação espermatozóide-oócito, para a qual existem outros ensaios mais específicos, que investigam cada etapa deste processo. Estes ensaios são revisados a seguir.

### **Avaliação da hiperativação da motilidade espermática**

Esta avaliação é feita através de métodos computadorizados conhecidos como CASA (“Computer-Aid Sperm Analysis”), que analisam diversas características do movimento espermático, tais como a linearidade, velocidade curvilínea e a amplitude do deslocamento da cabeça. Alterações nestas características da motilidade hiperativada reduzem a capacidade funcional dos espermatozóides.<sup>88</sup>

Ressalta-se que este teste, indiretamente também avalia a capacitação espermática, pois os espermatozóides tornam-se hiperativos após este processo. Maiores detalhes sobre o uso do CASA podem ser consultados em um trabalho publicado pelo grupo europeu de estudos especiais em reprodução humana.<sup>89</sup>

### **Avaliação da reação acrossômica**

Os métodos empregados são praticamente os mesmos usados na avaliação do “status” do acrossoma espermático,<sup>9,60,61,62</sup> além de técnicas por imunofluorescência.<sup>90,91</sup> Há também um método conhecido como “ARIC test” (“Acrosome Reaction to Ionophore Challenge”),<sup>92</sup> que classifica as anormalidades da reação acrossômica em 2 tipos: insuficiente e prematura. Esta classificação é considerada importante, pois define o tipo de tratamento a ser efetuado, quando o casal submete-se à FIV.<sup>93</sup>

### **Avaliação da fixação do espermatozóide na zona pelúcida**

O teste mais usado é o ensaio hemizona ou HZA (“Hemizona Assay”).<sup>94</sup> Neste teste usam-se oócitos humanos, que são colocados em contato com espermatozóides a serem testados e de doadores férteis. A seguir calcula-se um índice tomando como base a quantidade de espermatozóides fixados em cada população analisada. Valores >36% indicam boa probabilidade de sucesso na fertilização.

Um método similar, desenvolvido por Liu et al,<sup>95</sup> também é usado nesta avaliação, mas, em razão da complexidade de ambos, principalmente em relação a obtenção de oócitos humanos, estes testes somente são usados em alguns laboratórios especializados em FIV.

#### **Avaliação da penetração do espermatozóide na zona pelúcida**

O primeiro teste para esta avaliação foi desenvolvido por Overstreet & Hembre em 1976.<sup>96</sup> Este teste usava oócitos obtidos em procedimentos cirúrgicos ou de autópsia, o que praticamente inviabilizou sua utilização. Posteriormente, Yanagimachi et al<sup>97</sup> descreveram um processo para conservar oócitos obtidos em programas de FIV, que facilitou o uso do teste de Overstreet & Hembre. Mais tarde, Liu & Baker<sup>98</sup> propuseram um novo teste mais amplo e objetivo, que detecta inclusive a falha na fertilização. Embora sejam testes específicos para avaliar a penetração do espermatozóide na zona pelúcida, estes testes, de um modo geral são poucos usados, mesmo em laboratórios especializados.

#### **Avaliação da penetração do espermatozóide no oolema**

Para avaliar a etapa final da fertilização humana, o arsenal de testes funcionais dispõe daquele que é considerado o mais importante procedimento laboratorial para determinar a capacidade funcional dos espermatozóides. Trata-se do **teste de penetração espermática** ou SPA (“Sperm Penetration Assay”), também conhecido com **teste de hamster** (“Zona Free Hamster Egg Test”). Este teste foi desenvolvido por Yanagimachi et al<sup>99</sup> e é largamente usado em todo o mundo, sobretudo em laboratórios especializados. O SPA usa oócitos de hamster (os únicos nos quais os espermatozóides humanos penetram), que são obtidos através de hiperestímulo da ovulação. Os oócitos são desnudados de zona pelúcida e colocados em contato com espermatozóides selecionados e preparados para o teste, de homens suspeitamente inférteis. A fusão heteróloga que ocorre nos casos positivos é bastante similar à fertilização humana. Uma penetração espermática >10% é considerada normal e apresenta alta correlação com índices de gravidez, indicando que são boas as chances de se conseguir a fertilização *in vivo* ou *in vitro*.

O SPA é um teste cuja validade é confirmada em numerosos trabalhos, mas há autores que questionam seu valor clínico para manuseio do homem infértil.<sup>100,101</sup> O teste mede a fusão do espermatozóide com a membrana vitelina do oócito, mas não considera sua capacidade de vencer a barreira cervical, de fixar-se na zona pelúcida e de sofrer a reação acrossômica. Deste modo, o teste dá resultados falso-positivos. Algumas vezes, também são encontrados resultados falso-negativos, ou seja, o teste é negativo, mas ocorre a fertilização. Tais resultados estabeleceram limites para utilização deste teste e há muita discussão sobre o assunto. Porém, de um modo geral,

o SPA é bem aceito como teste funcional. Maiores detalhes sobre a aplicação deste teste são encontrados em estudos prévios.<sup>72,93,102,103,104</sup>

O SPA é o teste mais usado para avaliar a fusão do espermatozóide com o oócito, mas há outros testes disponíveis.<sup>105,106</sup>

### **3. OUTROS TESTES FUNCIONAIS**

Estudos realizados a partir da década de 90 alertam para a possibilidade de ocorrerem falhas na fertilização, em razão de defeitos em algumas características bioquímicas dos espermatozóides. Estes defeitos são raros, mas ocorrem em alguns casos, nos quais devem ser investigados e sua avaliação envolve a determinação da atividade de algumas enzimas seminais, tais como a ATP-creatinoquinase, lactato desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase.<sup>107</sup> Há também casos, nos quais são detectadas anomalias cromossômicas<sup>108</sup> e defeitos na descondensação nuclear,<sup>109</sup> um evento pós fertilização. Ressalta-se, que existem testes específicos para estas avaliações, mas apresentam valores preditivos pouco conhecidos, além de serem raramente usados em reprodução humana.

Outro aspecto importante muito considerado atualmente é a formação de radicais livres pelos espermatozóides. Conhecidos como ROS (“reactive oxygen species”), os radicais livres fazem parte da fisiologia do sêmen, pois atuam como mediadores da função espermática, inclusive, em algumas etapas críticas do processo de fertilização.<sup>107</sup> O controle da produção de ROS pelos espermatozóides é feito por

agentes antioxidantes presentes no plasma seminal, mas, em algumas condições, há uma excessiva geração de ROS, denominada estresse oxidativo, que causa danos na atividade funcional dos espermatozóides. Por este motivo, a determinação de radicais livres seminais também é considerada teste funcional.

O papel dos radicais livres seminais em infertilidade e os métodos laboratoriais usados na sua investigação foi tema de uma revisão publicada há pouco tempo.<sup>110</sup>

## **CONCLUSÃO**

O uso de teste funcionais para avaliar a fertilidade masculina ganhou grande impulso a partir da década de 80, com os conhecimentos adquiridos com a FIV. Hoje, estes testes são considerados de grande valor clínico para predizer as chances de fertilização, sobretudo quando o casal submete-se à FIV. Embora haja algumas dificuldades para implantação da maioria dos testes citados na rotina do espermograma, considera-se tal medida necessária, pois os parâmetros convencionais de análise do sêmen, atualmente são considerados limitados para definir a capacidade de fertilização do homem.

Alguns testes funcionais são disponíveis para implantação imediata em qualquer laboratório clínico, e.g., o HOS, a análise morfológica pelo critério estrito, citada na primeira parte deste trabalho,<sup>1</sup> a investigação da maturidade nuclear e a determinação do índice acrossômico. São testes simples e fáceis de serem efetuados, que melhoram a informação dada pelo exame. O uso de outros testes também é

importante, principalmente o SPA, mas as metodologias empregadas são mais complexas e difíceis de serem realizadas de rotina, além de exigirem especialização do analista. Assim, conclui-se, que o uso de testes funcionais no espermograma é necessário, mas depende da disponibilidade de cada laboratório.

## **SUMMARY**

The author reviews the role of semen analysis (spermiogram) in the investigation of male infertility. In this third part, the use of sperm function tests is reviewed, with emphasis on the methodologies of analysis. Simultaneously, it is also described some considerations among both the sperm structure and the human fertilization.

## **AGRADECIMENTO**

O autor agradece a Jorge Eduardo de Amorin Marinho pela montagem das ilustrações apresentadas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade-Rocha F.T., Carvalho P.P.N.G. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. I- Análise das características dos espermatozóides e de suas células precursoras. *Rev. Bras. An. Clín.* 28:171-178,1996.
2. Andrade-Rocha F.T., Carvalho P.P.N.G. O papel do exame do sêmen na infertilidade masculina. II- Avaliação da atividade secretora das glândulas acessórias genitais. *Rev. Bras. An. Clín.* 29:75-80,1997.
3. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd. ed.; Cambridge, Cambridge University Press, pg 1-106,1992.

4. Ånberg Å. The ultrastructure of the human spermatozoon. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 36(suppl.2):1-133,1957.
5. Fawcett D.W. The structure of mammalian spermatozoon. *Int. Rev. Cytol.*7:195-234,1958.
6. Pedersen H. Ultrastructure of ejaculated human sperm. *Z. Zellforsch.* 94:542-554,1969.
7. Bisson J.P., David G. Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. 2) Étude ultrastructurale. *J. Gyn. Obs. Biol. Repr.* 4(suppl.1):37-86,1975.
8. Bartoov B., Eltes F., Weisseberg R., Lunenfeld B. Morphological characterization of abnormal human semen using transmission electron microscopy. *Arch. Androl.* 5:305-322,1980.
9. Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 48:711-734,1987.
10. Holstein A.F. Ultrastructural observations on the differentiation of spermatids in man. *Andrologia* 8:157-165,1976.
11. Balhorn R. Mammalian protamines: Structure and molecular interactions. In: *Molecular biology of chromosome function*. Adolf K.W., ed.; Springer-Verlag, New York, pg 366-395,1989.
12. Saovaros W., Panyim S. The formation of disulphide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia* 35:191-192,1979.

13. Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:325-344,1992.
14. Pedersen H., Fawcett D.W. Functional anatomy of the human spermatozoon. In: *Human semen and fertility regulation in men.* Hafez E.S.E. ed.; Saint Louis, The CV Mosby Co., pg 65-75,1976.
15. Zalensky A.O., Allen M.J., Kobayashi A., Zalenskaya I.A., Balhorn R., Bradbury E.M. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103:577-590,1995.
16. Fawcett D.W., Philips D.M. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat. Rec.* 165:153-184,1969.
17. Baccetti B., Selmi M.G., Soldani P. Morphogenesis of “decapitated” spermatozoa in a man. *J. Reprod. Fertil.* 70:395-397,1984.
18. Gibbons I.R. Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91:107-124,1981.
19. Gibbons I.R., Rowe A.J. Dynein: a protein with Adenosine Triphosphatase activity from cilia. *Science* 149:424-426,1965.
20. Baccetti B., Porter K.R., Alrich M. High voltage electron microscopy of sperm axoneme. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 17:171-176,1985.
21. Afzelius B.A., Eliasson R., Johanssen R., Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J. Cell Biol.* 66:255-262,1975.
22. Sturgess J., Chao J, Turner P. Transposition of ciliary microtubules: another cause of impaired ciliary motility. *N. Engl. J. Med.* 303:318-322,1980.

23. Baccetti B., Burrini A.G., Mayer A., Pallini V., Renieri T. "9+0" immotile spermatozoa in an infertile man. *Andrologia* 11:437-443,1979.
24. Pedersen H., Rebbe H., Hammen R. Human sperm fine structure in a case of severe asthenospermia-necrospermia. *Fertil. Steril.* 22:156-164,1971.
25. Chemes H.E., Brugo S., Zanchetti F., Carrere C., Lavieri J.C. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil. Steril.* 48:664-669,1987.
26. Baccetti B., Burrini A.G., Pallini V. Spermatozoa and cilia lacking axoneme in an infertile man. *Andrologia* 12:525-532,1980.
27. Hunter D.G., Kretzer F.L. Abnormal axonemes in sperm of fertile men. *Arch. Androl.* 16:1-12,1986.
28. Sobrero A.J., MacLeod J. The immediate postcoital test. *Fertil. Steril.* 13:184-189,1962.
29. Tredway D.R., Fordney-Settlage D.S., Nakamura R.M., Motoshima M., Umezaki C.U., Mishell D.R. Significance of timing for the postcoital evaluation of cervical mucus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121:387-393,1975.
30. Moyer D.L., Rimdusit S., Mishell D.R. Sperm distribution and degradation in the human female reproductive tract. *Obstet. Gynecol.* 35:831-840,1970.
31. Acosta A.A. Process of fertilization in the human and its abnormalities: diagnostic and therapeutics possibilities. *Obstet. Gynecol. Surv.* 49:567-576,1994.
32. Austin C.R. Observations of the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Biol. Sci. Res.* 4:581-596,1951.

33. Chang M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 168:697-698,1951.
34. Bird J.M. Houghton J.A. The activation of mammalian sperm. *Sci. Prog.* 75:107-120,1991.
35. Gordon M., Dandekar P.V. Fine-structural localization of phosphatase activity on the plasma membrane of the rabbit sperm head. *J. Reprod. Fertil.* 49:155-156,1977.
36. Rosado A., Velasquez A., Lara-Ricalde R. Cell polarography. II- Effect of neuraminidase and follicular fluid upon surface characteristics of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 24:349-354,1973.
37. Friend D.S., Orci L., Perrelet A., Yanagimachi R. Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J. Cell Biol.* 74:561-577,1977.
38. Foresta C., Mioni R., Rossato M., Varotto A., Zorzi M. Evidence for the involvement of sperm angiotensin converting enzyme in fertilization. *Int. J. Androl.* 14:333-339,1991.
39. Bedford J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 2(suppl.):128-158,1970.
40. Austin C.R. Principles of fertilization. *Proc. Roy. Soc. Med.* 67:925-927,1974.
41. Robertson L., Wolff D.P., Tash J.S. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol. Reprod.* 39:797-805,1988.

42. Burkman L.J. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm population. *Arch. Androl.* 13:153-165,1984.
43. Osman R.A., Andria M.L., Jones A.D., Meizel S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:828-833,1989.
44. Blackmore P.F., Neulen J., Lantazzio F., Beebe S.J. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* 266:18655-18659,1991.
45. Blackmore P. F., Beebe S.J., Danforth D.R., Alexander N.J. Progesterone and  $17\alpha$  hydroxyprogesterone novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 265:1376-1380,1990.
46. Fraser L.R., Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Human Reprod.* 10(suppl.1):22-30,1995.
47. Tesarik J., Mendoza C., Moos J., Carreras A. Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil. Steril.* 58:784-792,1992.
48. Ward C.R., Kopf G.S. Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* 158:9-34,1993.
49. Roldan E.R.S., Murase T., Shi Q.X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266:1578-1581,1994.

50. Tesarik J., Drahorad J., Peknicova J. Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil. Steril.* 50:133-141,1988.
51. Zaneveld L.J.D., De Jonge C.J. Mammalian sperm acrosomal enzymes and the acrosome reaction. In: *A comparative overview of mammalian fertilization*. Dubar B.S., O'Rand M.G. (eds.). Plenum Press, New York, p 63-79,1991.
52. Villanueva-Diaz C., Vadillo-Ortega F., Diaz-Pérez M.A., Kably-Ambe A., Karchner-Krivistsky S. Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil. Steril.* 54:1180-1182,1991.
53. Einsenbach M., Ralt D. Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. *Am J. Physiol.* 262:1095-1101,1992.
54. Tesarik J., Mendoza-Oltras C., Testart J. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88:665-675,1990.
55. Morales P., Cross N.L., Overstreet J.W., Hanson F.W. Acrosome intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev. Biol.* 133:385-392,1989.
56. Bleil J.D., Wassarman P.M. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20:873-882,1980.
57. Wassarman P. M. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235:553-560,1987.

58. Tesarik J., Kopečný V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res.* 24:135-149,1989.
59. Lassalle B., Testart J. Sequential transformations of human sperm nucleus and human egg. *J. Reprod. Fertil* 91:393-401,1991.
60. Talbot P. Chacon R.S. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Biol.* 215:201-208,1981.
61. Wolf D.P., Boldt J., Byrd W., Bechtol K.B. Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 32:1157-1162,1985.
62. Cross N. L, Morales P., Overstreet J.W., Hanson F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15:213-226,1986.
63. Cross N.L., Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* 41:635-641,1989.
64. Menkveld R., Rhemrev J.P.T., Franken D.R., Vermeiden J.P.W., Kruger T.F. Acrosomal morphology as a novel criterion for male infertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 65:637-644,1996.
65. Kennedy W.P., Kaminski J.M., Van der Ven H.H., Jeyendran R.S., Reid D.S. Blackwell J., Biefeld P., Zaneveld L.J.D. A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J. Androl.* 10:221-231,1989.
66. Schill W.B., Töpfer-Petersen E., Heissler E. The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Human Reprod.* 3:139-145,1988.

67. Acosta A.A., Chillik C.F., Brugo S., Ackerman S., Swanson R.J., Pleban P., Yuan J., Haque D. In vitro fertilization and the male factor. *Urology* 28:1-9,1986.
68. Schill W.B., Feifel M. Low acrosin activity in polyzoospermia. *Andrologia* 16:589-591,1984.
69. Lalonde L, Langlais J., Antaki P., Chapdelaine A., Roberts K.D., Bleau G. Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa. *Fertil. Steril.* 49:316-321, 1988.
70. Hyarayama T., Hasegawa T., Hiroi M. The measurement of hyaluronidase activity in human spermatozoa by substrate slide assay and its clinical application. *Fertil. Steril.* 51:330-334,1989.
71. Bedford J.M., Calvin H., Cooper G.W. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 18(suppl.):199-213,1973.
72. Liu D.Y., Baker H.W.G. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 58:465-483,1992.
73. Tejada R.I., Mitchell J.C., Norman A., Marik J.J., Friedman, S. A test for the practical evaluation of male infertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42:87-91,1984.
74. Auger J., Mesbah M. Huber C., Dadoune J.P. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int. J. Androl.* 13:452-462,1990.

75. Everson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131-1133,1980.
76. Drevious L.O, Eriksson H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Expl. Cell. Res.* 42:136-156,1966.
77. Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaneveld L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70:219-228,1984.
78. Barrat C.L.R., Osborn J.C., Harrison P.E., Monks N., Dunphy B.C., Lenton E.A., Cooke I.D. The hypo-osmotic swelling test and the sperm mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte. *Human Reprod.* 4:430-434,1989.
79. Chan S.Y.W., Wang C., Chan S.T.H., Ho P.C. Differential evaluation of human sperm hypoosmotic swelling test and its relationship with the outcome of in vitro fertilization of human oocytes. *Human Reprod.* 5:84-88,1990.
80. Chan P.J., Tredway D.R. Corselli J., Pang S.C., Su B.C. Combined supravital staining and hypoosmotic swelling test. *Human Reprod.* 6:1115-1118,1991.
81. Takahashi K., Uchida A., Kitao M. Hypoosmotic swelling test of sperm. *Arch. Androl.* 25:225-242,1990.
82. Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Zaneveld L.J.D. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch. Androl.* 29:105-116,1992.

83. Comhaire F., Vermeulen L., Ghedira K, Mas J., Irvine S., Callipolitis G. Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. *Fertil. Steril.* 40:500-504,1983.
84. Calamera J.C., Quirós M.C., Brugo S., Nicholson R.F., Vilar O. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) activity in normal and pathological human semen. Relationship with round cells of the ejaculate. *Andrologia* 18:214-219,1986.
85. Chan S.Y.W., Wang C. Correlation between semen adenosine triphosphate and sperm fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 47:717-719,1987.
86. World Health Organization. Adenosine triphosphate in semen and other sperm characteristics: their relevance for fertility prediction in men with normal sperm concentration. *Fertil. Steril.* 57:877-881,1992.
87. Irvine D.S., Aitken R.J. The value of adenosine triphosphate (ATP) measurements in assessing the fertilizing ability of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 44:806-813,1985.
88. Burkman L.J. Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoal using computerized analysis. *Fertil. Steril.* 55:363-371,1991.
89. ESHRE Andrology special interest group. Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. *Human Reprod.* 11:1463-1479,1996.
90. Mortimer D., Curtis E.F., Miller R.G. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosome membrane of the human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81:127-135,1987.

91. Lee M.A., Trucco G.S., Bechtol K.B., Wummer N., Kopf G.S., Blasco L. Storey B.T. Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil. Steril.* 48:649-658,1987.
92. Cummins J.M., Pember S.M., Jerquier A.M., Yovich J.L., Hartman P.E. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge (ARIC). Relationship to fertility and other seminal parameters. *J. Androl* 12:98-103,1991.
93. Cummins J.M., Jerquier A.M. Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. *Human Reprod.* 9:1214-1220,1994.
94. Burkman L.J., Coddington C.C., Franken D.R., Kruger T.F., Rosenwaks Z., Hodgen G.D. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 49:688-697,1988.
95. Liu D.Y, Lopata A., Johnston W.I.H., Baker H.W.G. A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertil. Steril.* 50:782-788,1988.
96. Overstreet J.W., Hembre W.C. Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro. *Fertil. Steril.* 27:815-831,1976.
97. Yanagimachi R., Lopata A., Odom C.B., Bronson R.A., Mahi C.A., Nicholson, G.L. Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solutions: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilization capacity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 31:562-567,1979.

98. Liu D.Y., Baker H.W.G. A new test for the assessment of sperm-zona pellucida penetration: relationship with results of other sperm tests and fertilization *in vitro*. *Human Reprod.* 9:489-496,1994.
99. Yanagimachi R., Yanagimachi H., Rogers B.J. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15:471-476,1976.
100. Aitken R.J., Irvine D.S., Wu F.C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as a criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164:542-551,1991.
101. O'Shea D.L., Odem R.R., Cholewa C., Gast M.J. Long-term follow-up of couples after hamster egg penetration testing. *Fertil. Steril.* 60:1040-1045,1993.
102. Rogers B.J. The sperm penetration assay; its usefulness reevaluated. *Fertil. Steril.* 43:821-840,1985.
103. Aitken R.J. The zona-free hamster oocyte penetration test and the diagnosis of male infertility. *Int. J. Androl.* 6(suppl.):145-199,1987.
104. Aitken R.J. On the future of the hamster oocyte penetration assay. *Fertil. Steril.* 62:17-19,1994.
105. Liu D.Y., Lopata A., Baker H.W.G. Use of oocytes that failed to be fertilized *in vitro* to study sperm-oocyte interaction: comparison of sperm-olema and sperm-zona pellucida binding, and relationship with results of IVF. *Reprod. Fertil. Dev.* 2:641-650,1990.

106. Rufas O., Fisch B., Philips D.M., Shalgi R. Human gamete fusion test: an experimental model for assessing the fusion potential of sperm from nonfertilizing normospermic patients. *Fertil. Steril.* 62:786-792,1994.
107. Oehninger S. An update on the laboratory assessment of male infertility. *Human Reprod.* 10(suppl.1):38-45,1995.
108. Pieters M.H., Geraedts J.P., Meyer H., Dumoulin J., Evers J.L., Jongbloed R., Nederlof M., Flier S. Human gametes and zygotes studies by non-radioactive *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 53:15-19,1990.
109. Hoffman N., Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Human Reprod.* 6:979-982,1991.
110. Sharma R.K., Agarwall A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48:835-850,1996.

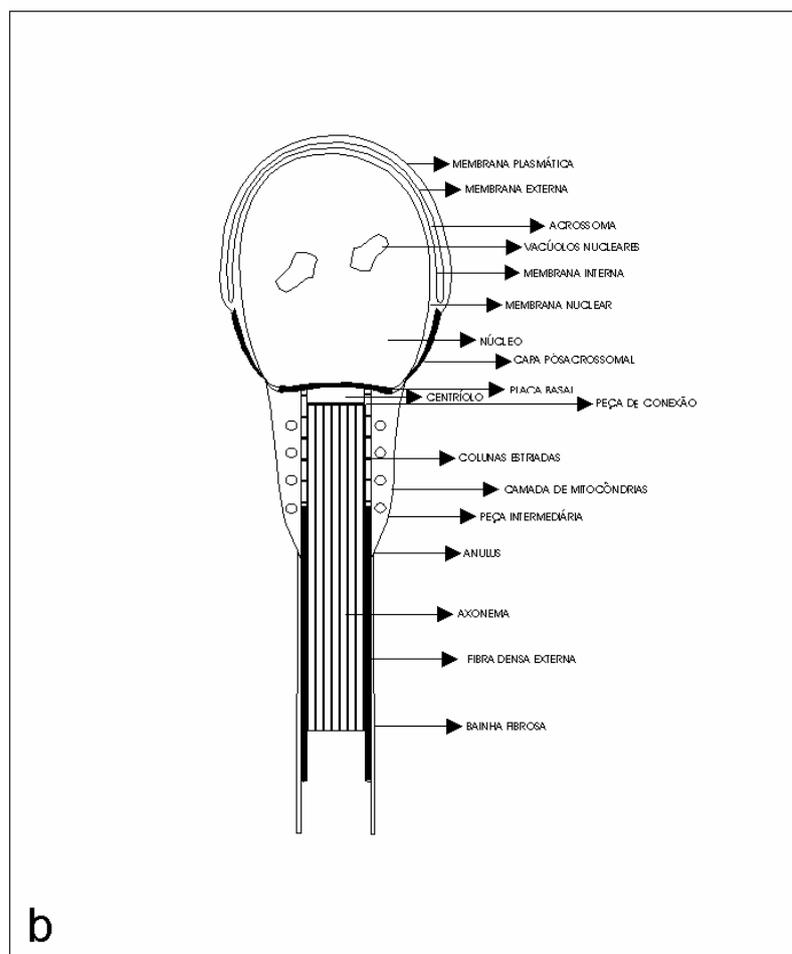
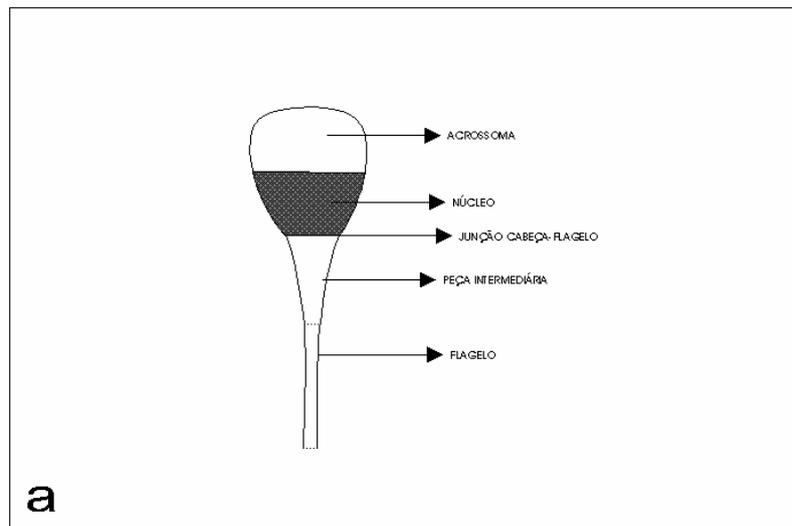


Figura 1 - a) - Espermatozóide visto em microscopia comum

b) - Espermatozóide visto em ultramicroscopia

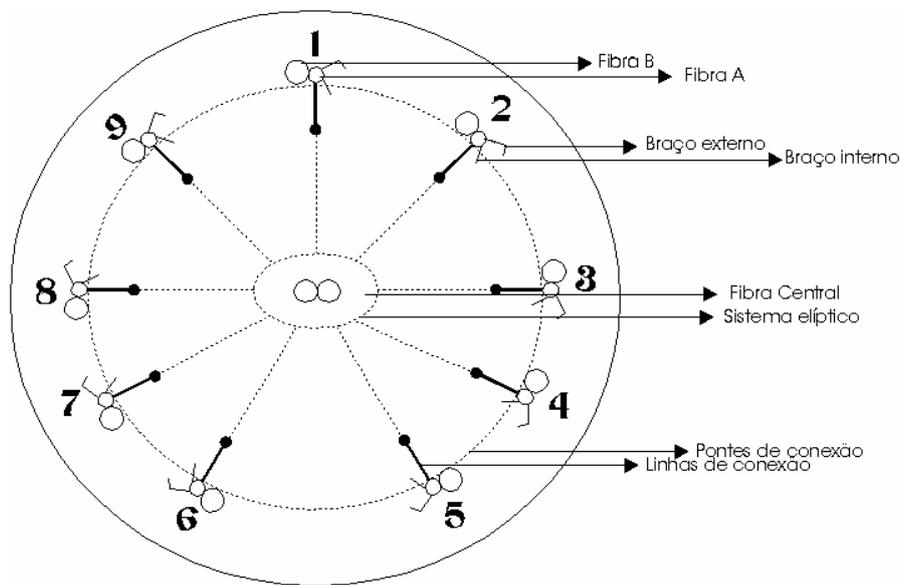


Figura 2 - Axonema espermático

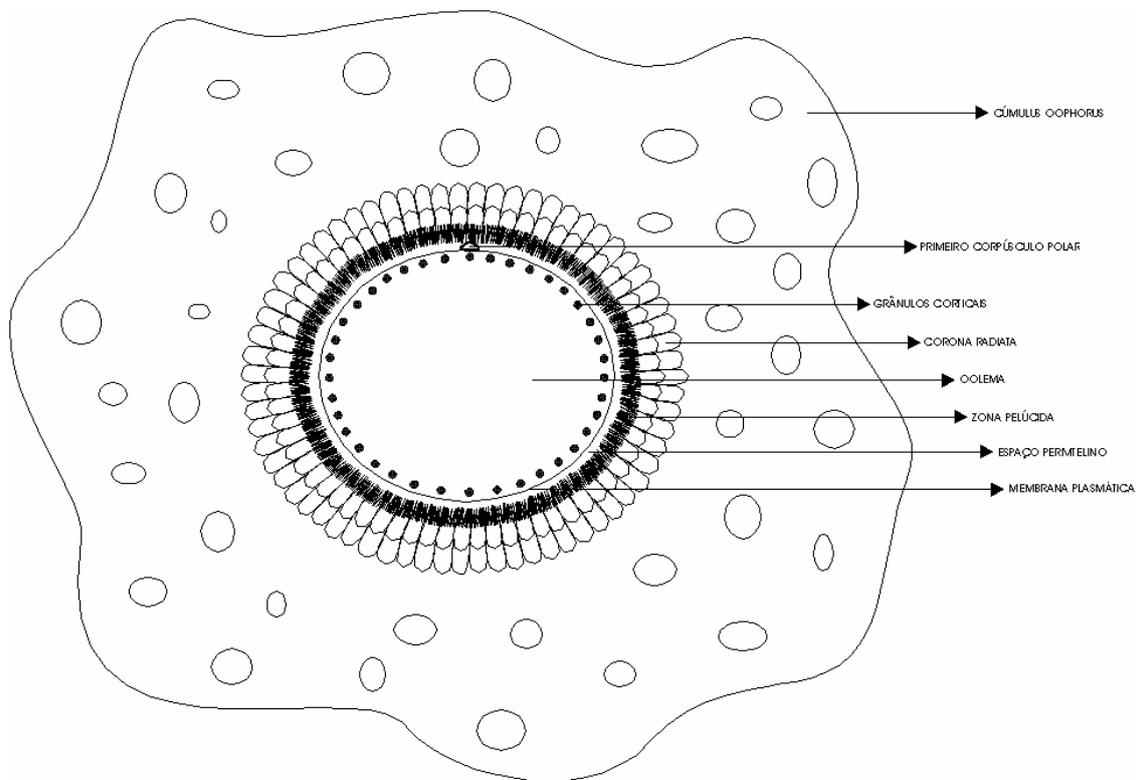


Figura 3 - Oócito humano maduro (telofase I) e seus revestimentos

**OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* EM URINA DE  
PACIENTES DIABÉTICOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO, FLORIANÓPOLIS,  
SANTA CATARINA**

**OCURRENCE OF YEASTS OF GENERA *Candida* IN URINE OF DIABETIC  
PATIENTS IN THE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO, FLORIANÓPOLIS, SANTA  
CATARINA**

Jairo Ivo dos Santos<sup>1</sup>; Michele Lyssandra Masutti<sup>2</sup>; Vanessa Regina Berenhauser<sup>2</sup>; Berenice  
Pagani Nappi<sup>1</sup> & Edney Rovere da Silveira<sup>3</sup>

1. Professores do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de  
Santa Catarina

2. Graduandas do Curso de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina

3. Farmacêutico-Bioquímico do Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis, Santa Catarina

Endereço para correspondência: Prof. Jairo Ivo dos Santos ( E-mail: [jivo@ccs.ufsc.br](mailto:jivo@ccs.ufsc.br) ), Departamento de  
Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário,  
Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, 88010-970

**RESUMO**

No período compreendido entre março e maio de 1997, estudamos a presença de leveduras em urina (candidúria) e sua identificação em 53 pacientes diabéticos e 46 pacientes não-diabéticos, que utilizam os serviços laboratoriais do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A frequência de Candidúria em pacientes diabéticos foi significativamente maior que em pacientes não-diabéticos. A espécie de *Candida*, mais frequentemente isolada, foi *C. albicans* (sete isolamentos), seguida de *C. glabrata* (dois isolamentos), *C. parapsilosis* (um isolamento) e *C. famata* (um isolamento). Quando comparamos dados clínico-laboratoriais e demográficos dos pacientes diabéticos com ou sem candidúria, não observamos diferenças com relação a presença de substâncias reductoras na urina, níveis de glicemia e idade média. A observação da presença exclusiva de candidúria em pacientes do sexo feminino, sugere contaminação de sua urina, por elementos leveduriformes, oriundos provavelmente de secreção vaginal, já que vulvovaginites por *Candida* são comuns em pacientes diabéticos do sexo feminino.

Palavras-chave: *Candida spp* - *Candida albicans* - urina - diabetes mellitus

## SUMMARY

From March through May, 1997, we have carried out a study on the presence of yeasts of *Candida* species in the urine of 53 diabetic and 46 non-diabetic patients who utilized the laboratory services of the Hospital Universitário of Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). The prevalence of *Candida* in the urine of diabetic patients was significantly higher than in urine of non-diabetic patients. The *Candida* species more frequently isolated were *C. albicans* (seven isolations), followed by *C. glabrata* (two isolations), *C. parapsilosis* (one isolation) and *C. famata* (one isolation). when laboratory and demographic data of diabetic patients were evaluated, no significant differences, concerning to patient's mean age, and presence of glycosuria and glicemia levels were observed for those with or without candiduria. Also, the exclusive finding of candiduria in female patients suggests that their urine were probably contaminated by *Candida* from vaginal secretions, since vaginitis by this yeast is very common in this group of patients.

Key-words: *Candida spp* - *Candida albicans* - urina - diabetes mellitus

## INTRODUÇÃO

Vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por espécies do gênero *Candida*. Por

exemplo, o permanente contato das mãos com água ou maceração da pele por fatores físicos ou químicos favorecem a colonização e posterior multiplicação de *Candida* nos seus hospedeiros. Também, em pacientes desnutridos, velhos debilitados e nos prematuros, verifica-se maior incidência da infecção por este fungo, em suas diversas formas clínicas. Durante a gravidez, principalmente em seu último trimestre, devido ao aumento do glicogênio nas células da mucosa vaginal, os casos de vulvovaginites são mais freqüentes. Alguns tipos de medicamentos como corticosteróides, anticoncepcionais, antineoplásicos e antibióticos de amplo espectro ao serem utilizados por um período prolongado, diminuir a imunidade do paciente ou alterar a flora bacteriana de seus tecidos, facilitando desta maneira a colonização ou infecção pelas espécies do gênero *Candida*<sup>1</sup>.

Diabetes mellitus é a endocrinopatia mais prevalente no homem. Esta patologia é um distúrbio heterogêneo primário do metabolismo dos carboidratos, que levam, em última análise ao desenvolvimento de hiperglicemia, que constitui a característica básica desta síndrome<sup>2</sup>. Até o momento, a relação entre diabetes mellitus e candidíase permanece apenas circunstancial, porém o aumento da glicemia e eventual deficiência imunitária seguramente favorecem o aparecimento de tal infecção<sup>3</sup>.

Nenhum tipo de estudo sobre prevalência de leveduras do gênero *Candida*, particularmente em vias genito-urinárias, foi realizado entre os pacientes que procuram os serviços do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC. Como muitos destes pacientes tem história de diabetes mellitus em vários estágios de evolução, procuramos então estudar a frequência de isolamento de *Candida* em urina (candidúria) de pacientes diabéticos, comparando-a com aquela de pacientes não-diabéticos que utilizam os serviços ambulatoriais do referido Hospital e identificar até nível de espécie as leveduras isoladas da urina. Também, no sentido de correlacionar dados clínico-laboratoriais dos pacientes diabéticos e a maior frequência de candidúria, comparamos estes dados entre aqueles com e sem candidúria.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População estudada**

A amostragem estudada consistiu de dois grupos de pacientes de ambulatório, em sua maioria, que utilizaram os serviços laboratoriais do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, no período compreendido entre março e maio de 1997. O primeiro grupo, constituiu-se de 53 pacientes que apresentavam indicação clínica ou laboratorial de diabetes mellitus. O segundo grupo, constituiu-se de 46 pacientes, com perfil de idade e sexo semelhantes ao primeiro grupo, porém que não tinham indicação clínica ou laboratorial desta endocrinopatia, e que foram utilizados como um grupo-controle para o primeiro grupo.

#### Isolamento e identificação das leveduras

Foram utilizadas amostras de urina da manhã que já eram colhidas para os procedimentos laboratoriais rotineiros. As amostras foram imediatamente semeadas por esgotamento em placas de petry contendo ágar-Sabouraud dextrosado<sup>4</sup> com auxílio de “swabs” estéreis. As placas foram então incubadas invertidas à 37° C, por até uma semana. No sentido de inibir possível crescimento bacteriano, cloranfenicol e gentamicina foram acrescentados ao meio. Para identificação da espécie *C. albicans* foi utilizado o método da indução de tubo germinativo<sup>5</sup>. Para identificação de outras espécies foi utilizado o Sistema Automatizado de Assimilação de Açúcares VITEK-YBC (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, USA), para leveduras, realizado no Laboratório Médico Santa Luzia, em Florianópolis.

#### Análise estatística

O teste exato de fisher foi utilizado para verificar a existência de diferença estatística na freqüência de isolamento de leveduras entre pacientes diabéticos e não diabéticos.

### **RESULTADOS**

Dos pacientes diabéticos estudados, 14 (26,4%) pertenciam ao sexo masculino e 39 (73,6%) ao sexo feminino, enquanto que do grupo não diabético 13 (28,3%) eram do sexo masculino e 33 (71,7%) eram do sexo feminino (Tabela 1). Foi observado também que tanto os pacientes diabéticos quanto os não-diabéticos tinham em sua maioria

idades superiores à 35 anos, embora em oito dos pacientes diabéticos a idade não pôde ser determinada (Tabela 1).

Quando se procedeu à semeadura da urina de pacientes dos dois grupos em ágar-Sabouraud dextrosado, verificou-se que houve crescimento de colônias de *Candida sp*, em onze (20,7%) dos pacientes diabéticos e em apenas um (2,1%) dos pacientes não-diabéticos, diferença esta que foi estatisticamente significativa (Tabela 2). Observou-se também que todos os isolados foram realizados em urina de pacientes do sexo feminino (Tabela 2).

Tabela 1

Características demográficas dos pacientes diabéticos e não-diabéticos estudados no Hospital universitário, UFSC

Características demográficas	Pacientes diabéticos* (n=53)	Pacientes não-diabéticos (n=46)
Sexo		
Masculino	14 (26,4%)	13 (28,3%)
Feminino	39 (73,6%)	33 (71,7%)
Idade		
Abaixo de 35 anos	07 (15,5%)	16 (34,8%)
Acima de 35 anos	38 (84,5%)	30 (65,2%)

\* Em 08 (oito) pacientes a idade não pôde ser determinada.

Tabela 2

Ocorrência de candidúria em pacientes diabéticos e não-diabéticos estudados no Hospital Universitário, UFSC, 1997

Pacientes	Nº de isolamentos totais*	Isolamentos no sexo masculino	Isolamentos no sexo feminino

Diabéticos (n= 53)	11 (20,7%)	0 (0,0%)	11 (28,2%)
Não-diabéticos (n=46)	01 (2,1%)	0 (0,0%)	01 (3,03%)

---

n: número de amostra estudada.

\* Diferença estatisticamente significante no Teste Exato de Fischer (P= 0.0049)

Com relação à frequência das espécies das amostras isoladas dos pacientes diabéticos, seis eram da espécie *C. albicans*, duas da espécie *C. glabrata*, uma da espécie *C. parapsilosis*, uma da espécie *C. famata* (figura 1). Em um dos isolados não foi possível identificar a espécie. No paciente não-diabético, a espécie isolada foi *C. albicans*.

Procurou-se então estudar algumas características clínico-epidemiológicas dos pacientes diabéticos com candidúria, comparando-os com aqueles sem candidúria. Na tabela 3 são mostrados alguns dados clínicos e demográficos dos pacientes diabéticos nos quais foram isoladas leveduras. Quando algumas destas características foram comparadas com aqueles pacientes nos quais não foram isoladas leveduras, não se observou diferenças marcantes em média de idade, frequência de substâncias reductoras na urina e média dos níveis de glicose sanguíneo nos pacientes (Tabela 4).

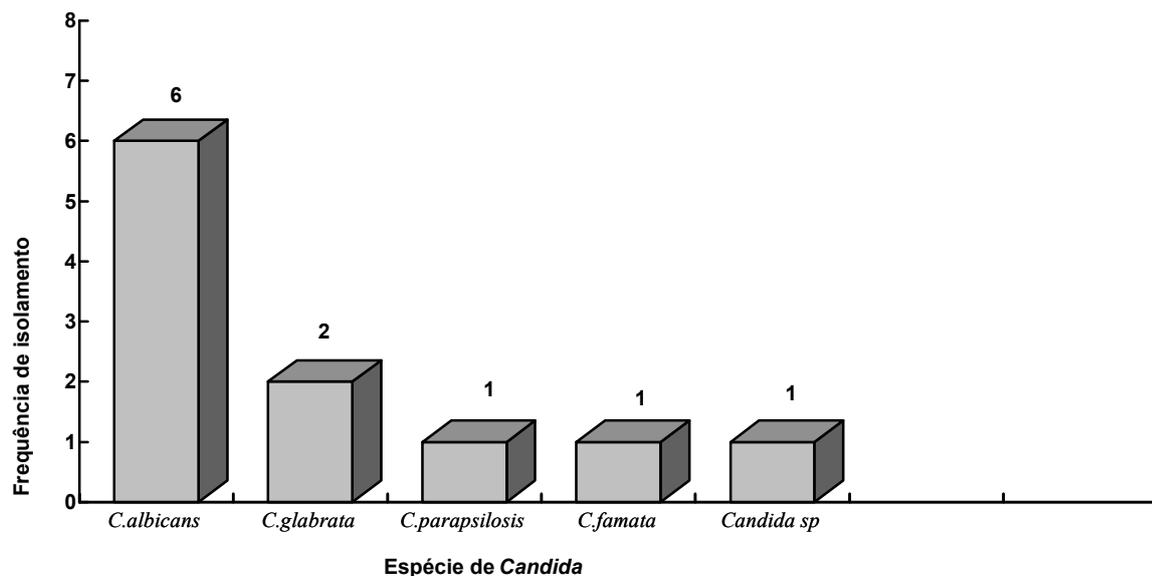


Figura 1. Frequência de espécies do gênero *Candida* isoladas da urina dos pacientes diabéticos.

Tabela 3

Características clínicas e demográficas dos pacientes nos quais foram isoladas leveduras

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Corpos cetônicos (número de cruces)	Substâncias redutoras (número de cruces)	Níveis de glicose (mg/dl)
HU13	70	F	0	0	...
HU14	...	F	0	4	194
HU17	32	F	0	0	100
HU19	71	F	0	...	...
HU26	59	F	0	4	297
HU30	39	F	0	0	95
HU34	23	F	0	0	...
HU37	62	F	0	3	236
HU40	14	F	0	0	118
HU47	...	F	0	4	309
HU53	42	F	0	4	276

Tabela 4

Comparação entre pacientes diabéticos com ou sem candidúria

Tipo de paciente diabético	Frequência por sexo	Idade média total (em anos)	Substâncias redutoras na urina	Média dos níveis de glicose
Com candidúria	Masculino: 0 (0%) Feminino: 11 (100%)	45,7	50%	203 mg/dl
Sem candidúria	Masculino: 14 (33,3%) Feminino: 28 (66,7%)	49,6	40%	191,7 mg/dl

## DISCUSSÃO

Em nosso estudo avaliamos a freqüência de leveduras na urina de pacientes com diabetes mellitus. Estes pacientes constituem uma parcela significativa da população que procura os serviços laboratoriais do Hospital Universitário da UFSC. A sua freqüência de isolamento de leveduras foi comparada com aquela de pacientes não-diabéticos que utilizaram os mesmos serviços, e que tinham características semelhantes no perfil de sexo e idade. Ficou então claro que os pacientes diabéticos apresentam uma freqüência muito maior de leveduras do gênero *Candida* em sua urina. Em condições normais, não é comum o isolamento desta levedura em urina de indivíduos saudáveis<sup>6,7</sup>. Entretanto, várias doenças ou situações fisiológicas podem favorecer a colonização ou mesmo infecção do trato urinário por espécies de *Candida*. Entre estas situações podemos citar, insuficiência renal, uso de catéteres, uso prolongado de corticosteróides, imunodepressão severa, anormalidades anatômicas genito-urinárias, vulvovaginites por *Candida*, gravidez e diabetes mellitus<sup>3,8</sup>.

Com relação à freqüência das espécies de *Candida*, verificamos que a espécie mais freqüente foi *C. albicans*, seguida por *C. glabrata*. Embora a amostra estudada e conseqüentemente a quantidade de isolados tenham sido pequenos, a freqüência maior de *C. albicans* em urina está de acordo com dados já relatados na literatura<sup>3</sup>. Por outro lado, a distribuição de outras espécies de *Candida* varia de acordo com os diferentes autores. Por exemplo, em um trabalho<sup>9</sup> houve relato de que a *C. Parapsilosis* foi a segunda espécie mais freqüente isolada. Entretanto, neste caso, as leveduras foram isoladas de amostras de urina de indivíduos saudáveis, o que constitui população diferente desta por nós estudada. Já outro autor relata em seu trabalho que *C. albicans* e *C. glabrata* constituem as espécies mais freqüentemente isolado de casos de candidúria, com freqüências de 48 a 59% e 25 a 33%, respectivamente, em vários tipos de pacientes, incluindo-se aqueles com diabetes mellitus<sup>10</sup>.

Procuramos então verificar se os pacientes não-diabéticos do grupo-controle, apresentavam algum tipo de manifestação patológica ou fisiológica associada à candidíase. Entretanto, não pudemos comprovar nada a este respeito já que a maioria dos registros destes pacientes estavam incompletos. Contudo, a paciente do grupo-controle no qual foi isolado levedura era gestante, o que é um fator de risco para infecção por *Candida*<sup>1</sup>. Esta paciente, possivelmente apresentava infecção vulvovaginal, que poderia ter contaminado a urina. Em relação a isto, observamos que todos os outros pacientes nos quais foram isolados leveduras também eram do sexo feminino. O simples isolamento de leveduras em urina não comprova que esteja havendo infecção das vias urinárias, já que para a sua comprovação nestes locais seria necessário o seu isolamento de urina colatada diretamente da bexiga<sup>11</sup> ou a detecção de cilindros de leveduras no exame parcial de urina<sup>12</sup>. A simples presença de leveduras na urina, sem sintomas de infecção nas vias genito-urinárias é provavelmente, apenas um indício de contaminação de urina por leveduras presentes em secreção vaginal ou vulvar, visto que em pacientes diabéticas é comum vulvovaginites por leveduras<sup>13</sup>. Para que pudessemos confirmar se as amostras isoladas na urina foram provenientes de contaminação da mesma por secreções vaginais, seria necessário isolar estas leveduras destas secreções nas pacientes com candidúria.

Um aspecto que nos chamou atenção é o de que embora fosse claro que pacientes diabéticos têm uma prevalência maior de leveduras na urina do que pacientes não-diabéticos, não foi possível correlacionar a frequência maior de *Candida* na urina com dados laboratoriais ou demográficos dos pacientes. Assim, tanto pacientes diabéticos com leveduras na urina, quanto aqueles sem leveduras não apresentaram diferenças em relação à frequência de substâncias redutoras em suas urinas, níveis de glicose em seu sangue, ou média de suas idades. Por outro lado, a ausência nos registros dos pacientes, de dados clínicos importantes como estágio de doença nesses pacientes não permitiu que se pudesse correlacioná-los com um risco maior de candidúria.

Assim, concluindo, o nosso estudo mostrou que a frequência de leveduras do gênero *Candida* é muito maior em pacientes com diabetes mellitus do que aqueles sem esta endocrinopatia. A *C. albicans* constituiu a espécie mais frequentemente isolada, seguida por *C. glabrata*. A candidúria foi observada somente em pacientes do sexo feminino, sugerindo que a presença de *Candida* na urina destas pacientes tivesse sido decorrente da

contaminação das mesma por secreções vulvovaginais contendo *Candida*. Por outro lado, não foi possível correlacionar dados laboratoriais e demográficos como idade, presença de substâncias redutoras na urina e níveis sanguíneos de glicose com frequência maior de *Candida* na urina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Lacaz, C.S.; Salebian, A.; Mendes, M.J.S.; Takahashi, N. & Nagao, M.T.** Ecologia das leveduras do gênero *Candida*. In: **Lacaz, C.S.** Candidíase. EPU/EDUSP, São Paulo, 1980.
2. **Olefski, J.M.** Diabetes Melito. In: **Wyngaarden, J. B.; Smith, L. H. & Bennett, J.C.** Tratado de Medicina Interna. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993.
3. **Fischer, JF; Chew, WH; Shadowy, S.; Duma, R.J.; Mayhall, G. & House, W.C.** Urinary tract infections to *Candida albicans*. *Rev. Inf. Dis.*, 4: 107-118, 1982.
4. **Lacaz, C.S.; Porto, E. & Martin, J.E.C.** Técnicas micológicas e imunológicas. Manutenção de cultura. Cultivo em lâmina. Preparo de antígenos micóticos. Técnicas micológicas e imunológicas de uso corrente. In: **Lacaz, C.S.; Porto, E. & Martin, J.E.C** *Micologia médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8.ed., Sarvier, São Paulo 1991.
5. **Taschdjian, C.L.; Burchall, J.J. & Kozinn, P.J.** Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *Am. J. Dis. Child.*, 99: 212-215, 1960.
6. **Schonebeck, J.** Studies on *Candida* infection of the urinary tract and on the antimycotic drug 5-fluorocytosine. *Scand. J. Urol. Nephrol. [Suppl.]*, 11: 7-48, 1972.
7. **Schonebeck, J. & Ansehn, S.** The occurrence of yeast-like fungi in the urine under normal conditions and in various types of urinary tract pathology. *Scand. J. Urol.Nephrol.*, 6:123-128, 1972.

8. **Fischer, J.F; Newman, C.L. & Sobel, J.D.** Yeast in the urine: solutions for a budding problem. *Clin. Inf. Dis*, 20: 183-189, 1995.
  
9. **Murillo de Linares, L. & Marin, C.** Frequency of yeasts of the genus *Candida* in humans,  
as pathogens and a part of normal flora. In: *International Conference on the Mycosis: The black and white yeasts*. Pan American Health Organization. (Scientific Publication) 356: 124-133, 1987.
  
10. **Michigan, S.** Genitourinary fungal infections. *J. Urol.*, 116: 390-397, 1976.
  
11. **Roy, J. B.; Geyer, J. R. & Mohr, J. A.** Urinary Tract Candidiasis: an update. *Urology*,33: 533-537, 1984.
  
12. **Craig, A.; Schumann, B.; Genack, L. & Gregory, M.** Identification of fungal casts in a patient with renal candidiasis. *Human Pathology*. 15: 480-481, 1984.
  
13. **Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E.** Candidiasis. In: **Kown-Chung, K.J.; Bennett, J.E.** *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1992.

**POSITIVIDADE DE CULTURAS MICROBIANAS DURANTE O  
PROCESSAMENTO DA MEDULA ÓSSEA E DE CÉLULAS TRONCO-  
PERIFÉRICAS**

**Positivity of microbial culture during the processing of bone marrow and  
peripheral blood stem cells.**

Celso Massumoto, Luciana A.G.Silva, Sally Mizukami, Maria F.Campos, Clarisse  
Machado e Dalton Chamone.

Laboratório de Criopreservação de Medula Óssea da Disciplina de Hematologia e  
Hemoterapia FMUSP - Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo.

Disciplina de Hematologia e Hemoterapia FMUSP.

Celso Mitsushi Massumoto: Av.Dr.Enéas de Carvalho Aguiar,155 - 1ºandar -  
Bloco 4 - sala 53 - Cerqueira César - São Paulo - SP  
CEP: 05403-000

**Resumo:**

Durante o processamento da medula óssea (MO) e de células tronco periféricas (CTP) é possível que ocorra a contaminação microbiana devido à grande manipulação do produto. Foram analisadas 33 coletas de MO e 230 de CTP entre março de 93 e maio de 96. Oito MO das 33 foram tratadas com o agente farmacológico mafosfamida. Antes de cada congelamento foram retiradas amostras para avaliação da esterilidade. Das 230 CTP, foram verificadas 3 contaminações (1,3%) , das 25 MO não-tratadas com mafosfamida observou-se 1 (4%) e, entre as 8 MO tratadas com mafosfamida, encontrou-se 1 (12,5%) cultura positiva.

Dentre as culturas positivas de CTP foram identificadas os seguintes organismos: *Candida parapsilosis*(n=1), *Staphylococcus simulans*(n=1) e *Staphylococcus auricularis*(n=1). Das culturas de MO identificou-se *Staphylococcus auricularis*(n=1) e na MO tratada verificou-se *Staphylococcus coagulase negativo*(n=1). Medidas que assegurem a qualidade e esterilidade do produto devem ser estabelecidas.

**PALAVRAS-CHAVE:** contaminação bacteriana, células tronco-periféricas, medula óssea, congelamento, esterilidade, processamento.

## Summary

The processing of bone marrow (BM) and peripheral blood stem cells (PBSC) can cause microbial contamination due to high manipulation of the product. From March 1993 to May 1996, 230 PBSC products, 33 BM and 08 mafosfamide-treated BM were analysed. Just before freezing the products, samples were taken for aerobic and anaerobic blood culture analysis. The incidence of microbial contamination was 1.3% for PBSC, 4% for BM and 12.5% for mafosfamide-treated group. The pathogenic microorganisms detected were *Candida parapsilosis* (n=1), *Staphylococcus simulans* (n=1) and *Staphylococcus coagulase negative* (n=1) for PBSC, *Staphylococcus auricularis* (n=1) for BM and *Staphylococcus coagulase negative* (n=1) for mafosfamide-treated BM.

**KEYWORDS:** microbial contamination, peripheral blood stem cell, bone marrow, freezing, sterility, processing.

## Introdução:

Altas doses de quimioterapia seguida de resgate com células progenitoras hematopoéticas têm possibilitado a cura ou prolongamento da vida de pacientes portadores de neoplasias. Em situações basais o número destes progenitores sanguíneos é baixo, por isso vários métodos têm sido utilizados com a finalidade de se aumentar o número destas células. Os métodos mais efetivos parecem ser o uso de quimioterapia associada a fator de crescimento medular. Parece não haver diferenças quanto à mobilização de células-tronco quando se emprega fator estimulador de colônias granulocítica/macrofágica(GM-CSF) ou fator estimulador de granulócitos (G-CSF). Porém o GM-CSF costuma desenvolver febre e dores ósseas com maior frequência.

Após a coleta dos progenitores hematopoéticos ocorre o seu processamento e posterior congelamento com uso de equipamentos programáveis. O processamento das células envolve um número grande de manipulações do produto, onde é possível que ocorra a contaminação bacteriana.(2)

O intuito do presente trabalho foi o de analisar a positividade de culturas microbianas durante o processamento, tanto de medula óssea quanto de células-tronco periféricas em receptores de transplante de medula óssea.

### **Materiais e Métodos:**

Durante o período de março de 1993 a maio de 1996, foram realizadas 230 coletas de células-tronco periféricas(CTP) e 33 de medulas ósseas, sendo que oito delas foram tratadas com mafosfamida. Os pacientes foram provenientes do programa de transplante de medula óssea da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A mediana de idade dos pacientes e as características clínicas estão apresentadas na Tabela 1

#### **1. Coleta e processamento das células**

##### **1.1 Medula Óssea (MO)**

A coleta da medula óssea foi realizada de acordo com a técnica descrita pelo grupo de Seattle(8). Resumidamente, o material foi obtido através de múltiplas aspirações da crista ilíaca e, eventualmente da região esternal. A coleta foi realizada no paciente sob anestesia geral ou peridural após desinfecção da pele com iodo povidina. A MO após a coleta foi armazenada em bequer estéril contendo soro fisiológico heparinizado, e o produto final foi filtrado para a retirada de espículas ósseas e partículas de gordura. As medulas não tratadas foram centrifugadas à 3.000 rpm por 15 minutos para remoção do plasma e separação da camada leucoplaquetária . Uma amostra foi retirada para a contagem celular e outra para esterilidade utilizando-se material estéril e álcool 70% para a assepsia. Todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar (Holten , HB2460).

### **1.2 Medula Óssea Tratada com Mafosfamida**

A droga mafosfamida foi utilizada para a purificação da medula de pacientes com leucemia mielóide aguda. O procedimento de separação da camada leucoplaquetária foi igual ao da medula óssea não-tratada. Amostras da camada leucoplaquetária foram retiradas para a realização da contagem celular e para determinação do hematócrito. A bolsa contendo as células, plasma e o meio de cultura 199 foram incubadas com mafosfamida na dose de 100µg/ml por 30 minutos , em banho-maria à 37°C. Após a incubação as células foram lavadas, e outra amostra foi obtida para esterilidade, contagem celular e posteriormente as células tratadas foram criopreservadas.

### **1.3 Células Tronco Periféricas (CTP)**

A leucoaférese foi realizada em dias consecutivos e quando a contagem de leucócitos ultrapassava a 1.000/mm<sup>3</sup>.

Para aumentar o número circulante de progenitores hematopoéticos no sangue periférico, os pacientes foram mobilizados com quimioterapia e fator de crescimento recombinante ( G-CSFou GM-CSF ).

A coleta das células tronco periféricas foi realizada através de cateter venoso central (previamente inserido ao paciente) pelo processador sanguíneo ( Fenwall-CS 3000 Baxter,Health Care Corporation). Nove a 14 litros de sangue foram

processados por um período de 2 a 4 horas, a um fluxo contínuo de 50 - 70ml/min. O volume final de CTPs foi de aproximadamente 50 a 200ml. Deste produto foi retirado uma amostra para cultura e contagem celular e o restante foi criopreservado.

#### **1.4 Criopreservação de MO e CTP**

O método segue a técnica padronizada pelo laboratório de Criopreservação de medula óssea da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

Resumidamente, após obtenção do produto, as células são transferidas para bolsas especiais de congelamento e acrescidos de igual volume de solução criopreservante contendo 20% de dimetilsulfóxido, 40% de meio de cultura 199 e 40% de plasma autólogo. As suspensões de células foram congeladas em câmara de congelamento programável (Cryomed, mod.1010). A câmara é alimentada por nitrogênio líquido e a razão de decaimento da temperatura é de aproximadamente  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  da temperatura ambiente até a amostra atingir  $-45^{\circ}\text{C}$  e a seguir, a  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até a mesma atingir  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após o congelamento as células foram armazenadas em freezer mecânico a  $-120^{\circ}\text{C}$  até o momento da sua utilização.

#### **2. Obtenção de amostras**

Antes de se proceder o congelamento das células, foram retirados 3ml de cada produto de MO e/ou CTP de maneira asséptica em fluxo laminar, para a avaliação da esterilidade. As amostras obtidas foram inoculadas em frascos de hemocultura (WL Imunoquímica) previamente desinfetados com álcool a 70%. Os frascos com os produtos foram incubados à  $37^{\circ}\text{C}$  e observados diariamente por um período de 10 dias. Em caso de positividade, foram realizados exames bacteriológicos em meios seletivos para o isolamento e identificação dos agentes microbianos.

### **Resultados**

Foram realizadas uma mediana de 3 (variação 2-7) coletas de leucoaférese por paciente. A mediana de células coletadas de MO e CTP foi de  $2,3 \times 10^8$  (variação 0,8- 6,04) e de  $3,17 \times 10^8$  (variação 0,2- 24,61) células/Kg , respectivamente.

A positividade de culturas microbiológicas nas amostras de CTP foi de 3 culturas (1,3%). Para a medula não-tratada, observou-se 1 cultura positiva (4%) e nas medulas ósseas tratadas com mafosfamida foi de 1 cultura (12,5%). Das culturas positivas de CTP foram identificados os seguintes organismos: ***Candida parpsilosis*** (n=1); ***Staphylococcus simulans***(n=1) e ***Staphylococcus coagulase negativo*** (n=1); na medula óssea não-tratada foi verificada a contaminação por ***Staphylococcus auricularis*** (n=1) e na medula óssea tratada com mafosfamida verificou-se a contaminação por ***Staphylococcus coagulase negativo*** (n=1) .

## Discussão

Existem evidências que microorganismos gram negativos possam sobreviver a refrigeração e podem inclusive crescer durante curtos períodos de estocagem, em contraste com os bacilos gram positivos cuja sobrevivência sob refrigeração é pequena.

Entretanto, existem evidências de que o ***Staphylococcus coagulase negativo*** e ***Bacillus sp*** provenientes de culturas de CTP, possam sobreviver durante o procedimento de congelamento(5).

A baixa incidência de contaminação das células tronco periféricas e da medula óssea não tratada atestam uma boa técnica de manipulação do produto em nosso trabalho. A assepsia vigorosa da pele do paciente antes e durante a coleta da medula pode eliminar ou reduzir a contaminação bacteriana e proteger contra o crescimento significativo de bactérias(6,7).

Rowley e col. relataram o estudo onde 17 de 100 medulas apresentaram contaminação bacteriana, sendo que todos os organismos identificados faziam parte da flora da pele(7).

Existem duas fontes principais de contaminação bacteriana da medula óssea antes da criopreservação: primeiramente durante o procedimento da coleta e a manipulação ex-vivo da amostra. E, a outra fonte de contaminação pode ocorrer durante o descongelamento e infusão do produto(1). O processamento das células envolve uma grande manipulação do produto, onde é possível que ocorra a contaminação bacteriana.

O sistema aberto de coleta da medula pode introduzir bactérias na mesma(4). Esta tem sido a metodologia empregada em nosso centro e atualmente estamos planejando utilizar o sistema fechado.

Muitos dos procedimentos de manipulação da medula óssea exigem que as células sejam transferidas para tubos ou bolsas. Estas diversas etapas utilizando um sistema aberto, e por um longo período (8-12 horas) podem aumentar a incidência de contaminação das alíquotas de medula óssea como ocorre no tratamento com a mafosfamida(4).

Uma outra fonte de contaminação das CTPs, pode ser a técnica incorreta de desinfecção ao acesso vascular. Portanto, técnicas corretas e padronizadas pelo grupo multiprofissional da equipe de transplante de medula, devem ser executadas para reduzir a contaminação bacteriana por esta via.

### **Referências Bibliográficas**

1. Lasky, L.C.; Hematopoietic reconstitution using progenitors recovered from blood. *Transfusion.*, 29: 552-557, 1989.

2. Kessinger, A.; Schimit-Pokorny, K.; Smith, D.; Armitage, J. Cryopreservation and infusion of autologous peripheral blood stem cells, *Bone Marrow Transplant*, 5 (suppl.2): 25-27,1990.

3. Warkentin, P.I.; Clinical background for marrow and progenitor cell processing in Marrow and stem cell processing for transplantation. *American Association of Blood Banks*, pp: 1, 1995.

4. Davis; M.J. Bacterial and fungal of stem cell components in Marrow and stem cell processing for transplantation. American Association of Blood Banks, pp: 36-37, 1995.

5. Schwella, N.; Blasczyk, R.; Beyer, J.; Rick, O.; Kreißig, C.; Zingsem, J.; Eckstein, R.; Siegert, W. Microbiologic contamination of peripheral blood stem cell autografts. Vox Sang; 67:32-35, 1994.

6. Padley, D.; Koontz, F.; Trigg, M.E.; Gingrich, R. and Strauss, R.G. Bacterial contamination rates following processing of bone marrow and peripheral blood progenitor cell preparations. Transfusion, 36: 53-56, 1996.

7. Rowley, S.D.; Davis, J.; Dick, J.; et al. Bacterial contamination of bone marrow grafts intended for autologous and allogeneic bone marrow transplantation. Incidence and clinical significance. Transfusion, 28:109-112, 1988

8. Thomas, E.D.; Storb, R.; Technique for Human Marrow Grafting. Blood, 36(4): 507-515, 1970

Tabela I: *Características Clínicas dos pacientes*

<b>Idade</b> (anos) mediana variação	n= 33 (03-57)
<b>Sexo</b>	
Masculino	31
Feminino	46
<b>Diagnóstico</b>	
LNH	24

LMA	18
Ca mama	10
LLA	08
DH	08
MM	05
LMC	02
tumor de testículo	02
<b>Estadio da Doença</b>	
RC	02
1RC	27
2RC	36
3RC	09
RP	03

LNH=Linfoma não Hodgkin

RC= Remissão completa

DH=Doença de Hodgkin

RP= Remissão parcial

Ca mama=Cancer de Mama

LMA=Leucemia Mielóide Aguda

MM=Mieloma Múltiplo

LMC=Leucemia Mielóide Crônica

LLA=Leucemia Linfóide Aguda

