

RIBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

Hemoglobinopatia SC: diagnóstico laboratorial e aconselhamento genético - A propósito de um caso	2
<i>Paulo H. da Silva, Ivana Pivatto & Ivo Ronchi Junior</i>	
SC Hemoglobinopathy: laboratory diagnostic and genetic counseling - Case report	
<i>Artigo de revisão</i>	
Diabetes mellitus - uma revisão	
Parte I: Conceito e aspectos gerais. Classificação. Aspectos clínicos e predição do Diabetes mellitus insulino dependente	5
<i>Ernesto P. de Oliveira, Luiz Gustavo P. Martins, Antenor H.P. Pedrazzi & Sérgio A. Uyemura</i>	
<i>Diabetes mellitus - a review</i>	
Part I: Concept and general aspects. Classification. Clinical aspects and prediction of Diabetes mellitus Insulin dependent	
Capacidade fagocítica de polimorfonucleares (PMN) humanos frente a várias partículas: <i>Candida albicans</i>, Zymosan, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Micrococcus</i>, <i>Escherichia coli</i>	11
<i>M.M. Zaha-Inouye, H.K. Morimoto, E.M.V. Reiche, R. Pontello, E.T. Anzai & I. Felipe</i>	
Phagocytosis capacity of the human neutrophils (PMN) against some particles	
Atividade da acetilcolinesterase de indivíduos não expostos a inseticidas fosforados	16
<i>Zelaine L. Silva, Edna M. Alvarez-Leite, André Luiz Carvalho, Ismael M.F. Leite & Josianne N. Silveira</i>	
Acetylcholinesterase activity of non exposed individuals to phosphored insecticides	
Recomendações para coleta, transporte e armazenamento de sangue total, para determinações simultâneas de pH, gases arteriais e eletrólitos	19
<i>R.W. Burnett, A.K. Covington, N. Fogh-Andersen, W.R. Kulpman, A.H.J. Mass, O. Müller-Plathe, O. Siggaard-Andersen, A.L. Van Kessel, P.D. Wimberley & W.G. Zijlstra</i>	
Recommendations on whole blood sampling, transport, and storage for simultaneous determination of pH, blood gases, and electrolytes	
<i>Artigo de revisão</i>	
Infecções parasitárias e o hospedeiro imunocomprometido: diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses	24
<i>Geraldo Attilio de Carli, Paulo Jaconi Saraiva & Roberto M. Silveira Issler</i>	
Parasitic infections and the compromised host: laboratory diagnostic of intestinal parasites	
Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da Doença de Chagas	29
<i>E.M.V. Reiche & J.V. Jankevicius</i>	
Evaluation of alternative methods for the confirmatory diagnosis of Chagas' disease	
Saúde em assentamentos rurais: uma questão de parcerias e política social	41
<i>Áurea R. Telles Pupulin, Vanalice Paulino, Ana Paula Agostinho Mexia, Iraclides Borges & Silvana Marques de Araújo</i>	
Health in rural settlement: a question of partnership and social policy	

1

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

Publicação Trimestral

Diretor Responsável
Prof. João Ciribelli Guimarães
Vice-Diretor
Prof. Mateus Mandú de Souza
Consultores Científicos

Bioquímica
Dr. Álvaro Largura (PR), Dr. Frederica Guilherme Schneider (RS), Prof. Marcelo Quintão Mendes (MG)

Citologia
Prof. Ely Chaves (PB), Prof.^a Rita Maria do Amparo Bacelar Palhano (MA), Prof.^a Juçara Maria de Castro Sobrinho (MG), Prof. Sebastião Ferreira Marinho (AM) e Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)

Controle de Qualidade
Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr. José Abal Corrêa (RJ), Dr. Luis Fernando Barcelos (RS)

Hematologia
Dr. Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Centro de Estudos do Centro de Hematologia Santa Catarina (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

Microbiologia
Dr. Antônio Márcio Lopes (MG), Prof. Mateus Mandú de Souza (RJ), Prof. Naulon Cune Cabral (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Paulo Pinto Gantijo Filho (RJ), Prof. Sérgio Fracalanza (RJ)

Imunologia
Prof. Moisés Abraham Fúls (RJ), Prof. Paulo Jacom Saravá (RS), Prof. Antônio Walter Ferreira (SP), Dr.^a Sumie Shimizu (SP), Dr. Carlos Henrique Ubatuba Lerner (RS)

Parasitologia
Dr. Antônio Pedro Soares (MG), Prof. Edúardo Luna de Carvalho (PB), Prof.^a Myriam Cezar Jordani (RJ), Prof. Paulo S. Minami (SP), Prof.^a Natália de Almeida Vilela (GO), Prof.^a Marisa Porto (SP)

Imunogenética
Dr. Eurico Camargo Neto (RS), Prof. Renato Di Dio (SP), Prof. José Carlos Barbéria (SP)
Este periódico é o órgão oficial da SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS - SBAC, e destinado à divulgação de trabalhos científicos, observações pessoais, informações de interesse geral em defesa da classe dos que militam no ramo das análises clínicas, constituindo ela de união dos profissionais e fonte de estímulo na aquisição de conhecimentos que melhor os capacitem no desempenho da profissão, em benefício da comunidade.



SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Rua Vicente Licínio, 95 - Tel.: (021) 264-4449
Fax: (021) 204-0245 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-340
<http://www.mls.com.br/mbr/sbac>
E-mail: sbac@mls.com.br

Diretoria

Presidente Dr. Humberto Marques Tibúrcio
Vice-Presidente Dr. Willy Carlos Jung
Secretário Geral Dr.^a Virginia Frota de Matos
Secretário Dr.^a Elvira Maria Laureiro Colnago
Tesoureiro Dr. Estevão José Colnago
Tesoureiro Adjunto Dr. Nadilson da Silva Cunha

Membros do Conselho Fiscal

Titulares: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Prof. Antônio José Marques D'Almeida (RS), Prof. José Ronaldo Cardoso (MG) - Suplentes: Dr. Darcy Araújo Correia (CE), Prof. Carlos Adalberto Camargo Sannazzaro (SP) e Prof. Carlos Henrique Ubatuba Lerner (RS)

Comissão de Normas e Habilitação

Coordenação: Prof. Mateus Mandú de Souza (RJ)
Membros: Dr. Luis Fernando Barcelos (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Dr. Willy Carlos Jung (SC), Prof. Paulo Fausto Caudano (PB), Prof. Edúardo Luna de Carvalho (PB), Prof. Carlos Henrique Ubatuba Lerner (RS), Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr. Durval Mazzon Nogueira (SP), Prof. Henrique Lerner (RJ), Prof. Darcy Araújo Correia (CE), Dr. Estevão José Colnago (RJ)

Diretor de Cursos

Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

Comissão Social

Dr.^a Virginia Frota de Matos (RJ)

Comissão de Relacionamento

Universitária: Prof. Jorge Fernando Teixeira Soares, Prof.^a Maria Helena Braga, Prof. Paulo Minami (SP)
IFCC: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), COLABIOCLI: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr. José Abal Corrêa (RJ), MERCOSUL: Dr. Álvaro Largura (PR)

Governamental: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG), Dr. José Abal Corrêa (RJ), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ)

Comissão de Avaliação do Programa Nacional de Controle de Qualidade

Coordenação: Dr. José Abal Corrêa (RJ)
Membros: Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr.^a Heloisa Helena Ribes Vieira (RJ), Dr. Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG)

Comissão de Congressos

Coordenação: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG)
Membros: Dr. José Abal Corrêa (RJ), Dr. Álvaro Largura (PR), Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro (SP), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

Informativa do SBAC

Coordenação: Dr. Humberto Marques Tibúrcio (MG)
Membros: Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ), Dr. Antônio Jaguaribe Neto (RJ), Dr.^a Virginia Frota de Matos (RJ), Prof. Raimundo Diogo Machado (RJ), Dr. Estevão José Colnago (RJ), Dr. José Abal Corrêa (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. Willy Carlos Jung (SC)

Conselho Deliberativo - 1997

Membros Natos: Dr. Ney Houshahn (RJ), Prof. João Ciribelli Guimarães (RJ), Dr. José Abal Corrêa (RJ), Prof. Mateus Mandú de Souza (RJ), Dr. Evany Seabra Nogueira (RJ), Prof. Edúardo Luna de Carvalho (PB), Prof. Antônio José Marques D'Almeida (RS), Dr. Nadilson da Silva Cunha (RJ)

Regionais da Sociedade

Bahia - Presidente: Dr. Grimaldo dos Santos, Ceará - Presidente: Dr. José Antônio Peres Silveira, Distrito Federal - Presidente: Dr. Manoel Arelano Junior, Goiás - Presidente: Dr. Ulisses Tuma, Minas Gerais - Presidente: Dr. Vanderley Eustáquio Machado, Paraná - Presidente: Prof. Yoshio Hashimoto, Pernambuco - Presidente: Dr. Tarcísio de Oliveira Moura, Rio Grande do Norte - Presidente: Prof.^a Gerusa Maria Caldas Maia, Rio Grande do Sul - Presidente: Dr.^a Carmen Pilla

Delegados da Sociedade

Aragoiás: Dr. Jurandir David da Silva, Amazonas: Prof. Sebastião Ferreira Marinho, Espírito Santo: Dr. Henrique Tommasi Neto, Maranhão: Prof.^a Rita Maria do Amparo Bacelar Palhano, Mato Grosso: Dr. Jerônimo Lopes de Aquino, Mato Grosso do Sul: Dr. Helder Ferrari Paniago, Santa Catarina: Dr. Willy Carlos Jung, São Paulo: Prof. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro, Sergipe: Dr.^a Maria de Conceição de Lucena Oliveira

Assinatura anual: Exterior US \$ 60

A SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS é filiada à International Federation of Clinical Chemistry - IFCC, à National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCLLS e à Confederação Latinoamericana de Bioquímica Clínica - COLABIOCLI

A RBAC - Revista Brasileira de Análises Clínicas é o principal órgão de difusão do conhecimento em nossa especialidade, propagando-a para todo o país, chegando diretamente aos nossos Sócios e às bibliotecas de centenas de instituições de ensino brasileiras ou não, conduzindo o resultado de trabalhos de inúmeros Colegas das mais diferentes especialidades.

Este número da RBAC - Revista Brasileira de Análises Clínicas, marca o início das comemorações dos 30 anos de fundação da nossa SBAC - Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Durante estes 30 anos, as metas traçadas foram excedidas e isto se deveu em muito à eficiência do Editor, o Prof. João Ciribelli Guimarães, que foi imbatível.

Queremos agradecer a todos os Colegas que ao longo destes 30 anos deram a sua efetiva parcela de colaboração para a manutenção da continuidade da Revista e para a melhoria do conteúdo, participando do Corpo editorial, revisando trabalho, publicando trabalhos e, por último e nem por isso menos importante, lendo e referenciando-se a ela.

Desejamos informar aos Colegas que a Revista Brasileira de Análises Clínicas, juntamente com as congêneres dos países-membros da COLABIOCLI - Confederação Latinoamericana de Bioquímica Clínica, constituiram o Comitê de Editores de Revistas que, entre outras ações, para o benefício mútuo, cuidará de viabilizar e implementar o intercâmbio de publicações de trabalhos. Estas ações vão permitir que os Colegas tenham acesso mais fácil, mais rápido e mais eficiente, para publicarem seus trabalhos em revistas de outros países.

Hemoglobinopatia SC: diagnóstico laboratorial e aconselhamento genético – A propósito de um caso

SC Hemoglobinopathy: laboratory diagnostic and genetic counseling – Case report

Paulo H. da Silva¹, Ivana Pivatto² & Ivo Ronchi Junior³

RESUMO – O presente trabalho mostra um caso típico de diagnóstico de hemoglobinopatia a partir da observação da extensão sangüínea. Um homem, 59 anos, assintomático sob o ponto de vista hematológico, realiza exames pré-operatórios, dentre os quais foi solicitado o hemograma. A observação da extensão sangüínea revela a presença significativa de codócitos, exames complementares foram realizados e chegou-se ao diagnóstico de hemoglobinopatia SC. Posteriormente foram realizados, em seus familiares, exames para determinar o tipo de hemoglobina que foi herdada e foi realizado o aconselhamento genético.

PALAVRAS-CHAVE – Hemoglobinopatia SC, codócitos.

SUMMARY – This work shows a typical case of a diagnostic of hemoglobinopathy through analysis of a blood smear. A 59 year old man, with no hematologic symptoms, was submitted to do some pre-surgical exams, including an hemogram. The analysis of the blood smear disclosed a great number of codocytes. Further tests were performed, and the final diagnostic was SC hemoglobinopathy. Later on, the same tests were performed on his relatives to define what hemoglobin had been inherited, and the genetic counseling was accomplished.

KEY WORDS – SC hemoglobinopathy, codocytes.

1. INTRODUÇÃO

A molécula da hemoglobina, cuja função primordial é a de transportar oxigênio, é constituída por uma estrutura central, o heme, e por quatro cadeias de aminoácidos denominadas globinas, as quais se apresentam aos pares. Um adulto normal apresenta em seu sangue três tipos de hemoglobina. A principal é a hemoglobina A1 (Hb A1), cuja estrutura molecular é alfa2 beta2, e representa mais de 95% da hemoglobina total, a hemoglobina fetal (Hb F), cuja estrutura molecular é alfa2 gama2, e representa menos de 1% da hemoglobina total e a hemoglobina A2 (Hb A2), cuja estrutura molecular é alfa2 delta2. Os genes responsáveis pela codificação das globinas localizam-se nos braços curtos dos cromossomos 11 e 16. As hemoglobinopatias hereditárias são defeitos genéticos que se manifestam através de uma mutação de ponto ou através de uma deleção ou duplicação de genes a nível de DNA. Na primeira situação, a molécula pode se desestabilizar ou ocorrer uma alteração na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, estas são as hemoglobinas variantes. Na segunda situação a produção de cadeias fica comprometida, estas são as talassemias.

A hemoglobinopatia S é uma mutação de ponto que ocasiona a troca do aminoácido glutâmico pela valina na cadeia beta da hemoglobina A1. É a alteração hematológica mais conhecida no homem e afeta cerca de 15 mil brasileiros, na forma homozigota da doença (SS), e cerca de 4 milhões de

pessoas são heterozigotas (AS). O homozigoto irá exteriorizar um quadro clínico conhecido como anemia falciforme, que é o resultado da polimerização da hemoglobina mutante no interior do eritrócito, polimerização esta desencadeada pela hipóxia e que deforma a hemácia, que passa a apresentar a forma de uma foice. Os eritrócitos falciformes ocasionam diferentes graus de bloqueios na microcirculação, causando isquemia e infartos em vários órgãos, sendo mais comum em ossos e baço. Estes pacientes cursam com um grau de anemia de moderada a grave, sem esplenomegalia. Os heterozigotos não apresentam anemia, nem a presença de células falciformes no sangue periférico. Porém, crises de falcização (crises vaso oclusivas) poderão ser desencadeadas por situações de extremo estresse, como anoxia e infecção grave. Nestes indivíduos, a porcentagem de hemoglobina S não ultrapassa a 45% e merecem especial atenção por ocasião de anestesia e gestação.

A hemoglobinopatia C também é uma mutação de ponto que faz a troca do ácido glutâmico pela lisina na cadeia beta da hemoglobina A1. A frequência do gene da hemoglobina C é de aproximadamente 2% entre negros americanos. É também a alteração hematológica mais frequente na África ocidental. A hemoglobina C cristaliza no interior do eritrócito, mas não determina a forma de foice, ou seja, não falciza. O paciente homozigoto apresentará uma discreta anemia e esplenomegalia. O hemograma revela acentuada presença de células em alvo e microesferócitos. Os heterozigotos não apresentam anemia e mostram algumas células em alvo no hemograma.

Recebido em 17/12/96

¹Departamento de Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná - Curitiba, Pr., Brasil

²GR - Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas.

³Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Os pacientes com hemoglobinopatia SC herdam uma hemoglobina mutante de cada pai. A doença ocorre com uma frequência aproximada de 1:833 nascimentos entre negros americanos e 1:400 nascimentos entre jamaicanos. Em Gana a doença afeta cerca de 25% da população. O quadro clínico do portador de Hb SC é semelhante, porém menos intenso do que o do homozigoto para a hemoglobina S (Hb SS). Estes pacientes (Hb SC) têm uma tendência bastante aumentada para complicações trombo-embólicas como o trombo-embolismo pulmonar, e a necrose asséptica da cabeça do fêmur e do úmero, principalmente durante a gestação. Apresentam, ainda, uma alta incidência de anormalidades vasculares da retina, podendo causar progressiva perda da visão. Caracteristicamente cursam com discreta anemia (o nível de hemoglobina raramente está abaixo de 9 a 10 g/dl) e esplenomegalia. A análise do sangue periférico apresenta grande número de células em alvo, e ocasionalmente células com cristais rombóides. A eletroforese de hemoglobina demonstrará a presença das hemoglobinas S e C e cada qual representará cerca de 45 a 50 % da hemoglobina total. O teste de falcização será positivo. Cuidados pré e per operatórios devem ser tomados, é uma prática comum realizar uma ex-sangüíneo transfusão parcial nos portadores da anemia falciforme (Hb SS), com o intuito de reduzir a concentração de hemoglobina S para menos de 50%, prevenindo assim um episódio mais grave de falcização. Os indivíduos portadores de hemoglobina SC apresentam um teor de hemoglobina S intermediário entre os homo e heterozigotos para o gene da hemoglobina S, deve-se, portanto, considerar a necessidade de indicar-se uma ex-sangüíneo transfusão nos portadores de Hb SC. Esta conduta é bastante polêmica, mas, de qualquer modo, o anestesista deve ter cuidados extremados para prevenir qualquer grau de hipóxia que possa precipitar uma crise de falcização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Paciente AVA (1.1 no heredograma), do sexo masculino, cor parda, 59 anos de idade, assintomático do ponto de vista hematológico, tinha uma cirurgia (safenectomia) programada. Durante a realização de exames pré-operatórios constatou-se um hemograma alterado com discreta redução nos níveis de hemoglobina e com evidentes alterações morfológicas de suas hemácias, principalmente a presença de codócitos. Negava qualquer antecedente de anemia ou outra doença hematológica, inclusive nos familiares. O exame físico não revelava icterícia e o baço não era palpável. O estudo laboratorial revelou dosagens de hemoglobina fetal e A2 normais, e a eletroforese de hemoglobina revelou duas bandas distintas, uma migrando na posição de S e outra na posição de C, e o teste de falcização mostrou-se positivo. Ficou, assim, firmado o diagnóstico de hemoglobinopatia SC. Em seguida, realizou-se o estudo em seus familiares, conforme mostra o heredograma da Figura 1.

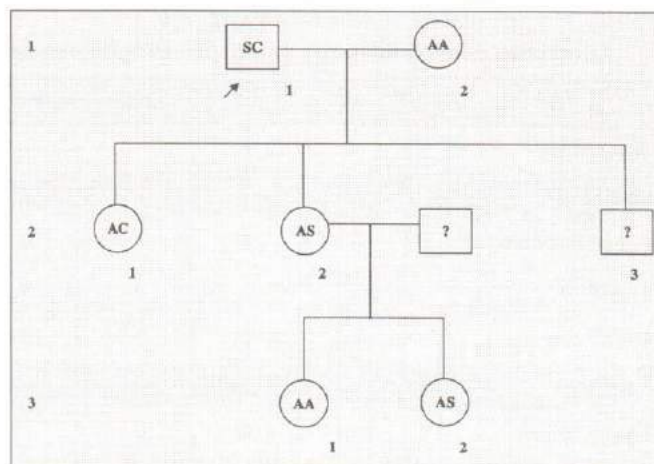


Fig. 1 – Heredograma da família analisada.

2.2 Métodos

Hemograma: sangue coletado com EDTA K3, na proporção de 1 mg anticoagulante para 1 ml de sangue, e o exame foi realizado em sistema automatizado Cell Dyn 3000 Abbott Laboratories. As extensões foram coradas pelo May Grünwald Giemsa e revisadas em microscópio ótico Alphaphot 2 da Nikon.

Reticulócitos: contagem pela coloração supra vital com azul de cresil brilhante a 1% de acordo com o volume globular de cada paciente. A contagem foi realizada em microscópio ótico Alphaphot 2 da Nikon.

Valores de referência (5): homem: 0,8 a 2,5 %

mulher: 0,8 a 4,1 %

Teste de falcização: Metabissulfito de sódio a 2%.

Eletroforese de hemoglobina e dosagem de hemoglobina A2: Filmes de gel alcalino marca Celm. Fonte de 240 volts marca Celm. Corrida realizada com tampão veronal pH 8,6 marca Celm. Leitura realizada em densitômetro modelo DS-35 marca Celm com comprimento de onda 420 nm. Valores de referência para hemoglobina A2 (9): 2,5 a 4,0 %

Hemoglobina fetal: Método de Singer (teste da desnaturação alcalina).

Valores de referência (9): 0 a 2,5 %.

3. RESULTADOS

TABELA 1
Valores encontrados no hemograma da família analisada

	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
Eritrócitos (milhões/microlitro)	4.02	4.76	5.26	4.90	5.42	4.49
Hemoglobina g/dl	11,6	13,8	13,1	14,4	14,6	12,5
Volume globular %	35,9	41,6	38,8	42,8	43,4	37,7
V.C.M fentolitro	89,3	87,4	73,8	80,1	80,1	84,0
H.C.M picogramas	28,9	29,0	24,9	29,4	26,9	27,8
C.H.C.M %	32,2	33,2	33,8	33,6	33,6	33,2
Leucócitos / microlitro	8.400	5.200	10.200	7.900	17.800	8.500
Bastonetes %	00	00	00	00	00	00
Segmentados %	37,6	57,6	62,3	63,5	73,4	55,9
Neutrófilos %	37,6	57,6	62,3	63,5	73,4	55,9
Linfócitos %	41,0	29,8	28,7	24,7	19,4	31,7
Monócitos %	10,8	8,9	6,7	9,1	6,1	8,2
Eosinófilos %	9,4	2,9	1,9	1,9	0,6	3,6
Basófilos %	1,2	0,8	0,4	0,8	0,5	0,6
Plaquetas / microlitro	298.000	369.000	371.000	364.000	310.000	287.000

TABELA 2
Alterações encontradas nas extensões sanguíneas da família analisada

	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
Anisocitose	+	+	+	+	+	0
Pecilocitose	++	+	+	+	+	0
Policromatofilia	+	0	+	0	0	0
Acantócitos	+	0	0	0	0	0
Eliptócitos	++	0	0	0	0	0
Codócitos	++	0	0	0	0	0
Equinócitos	+	0	0	0	0	0
Micrócitos	0	0	++	+	0	0
Ponteados basófilos	0	+	0	0	0	0

TABELA 3
Resultados da contagem de reticulócitos, teste de falcização, eletroforese de hemoglobina, hemoglobina fetal e hemoglobina A2 da família analisada

	1.1	2.1	2.2	3.1	3.2
Contagem de reticulócitos	5,8	1,8	5,2	3,3	3,7
Teste de falcização	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo
Hemoglobina F	0,7				
Hemoglobina A2	0				
Eletroforeses de hemoglobina	SC	AC	AS	AA	AS

4. DISCUSSÃO

A observação de uma extensão sanguínea é extremamente importante, porque através das alterações morfológicas e qualitativas podemos estabelecer ou realizar exames específicos que nos encaminhem a um diagnóstico de uma doença hematológica. Para que possamos ter uma condição ótima de observação necessitamos de uma extensão muito bem realizada e uma coloração perfeita. Laboratórios que possuem aparelhos automatizados para a hematologia e que fazem a contagem diferencial devem revisar microscopicamente as extensões sanguíneas. Aqueles que liberam exames sem a revisão microscópica devem fazê-lo dentro de protocolos de liberação de exames bastante rígidos, porque muitas alterações podem passar despercebidas. O laboratório também deve ter a postura de realizar exames, mesmo que não solicitados, que venham a esclarecer ou corroborar com o diagnóstico hematológico. O paciente AVA (1.1) é um caso típico de um diagnóstico feito laboratorialmente, a partir da análise da extensão do sangue periférico.

É de fundamental importância tanto para o paciente como para o médico anestesista o conhecimento da condição de portador de hemoglobinopatia SC, para que possa ser prevenida uma possível crise de falcização no pré-operatório.

Posteriormente, a família foi contactada para que o genótipo das cadeias de hemoglobina pudessem ser estabelecidos nos descendentes de AVA. A sua esposa AMA (1.2) apresenta hemograma normal e hemoglobina normal. Sua filha (2.1) recebeu a hemoglobina normal da mãe e a hemoglobina C do pai, ficando com o genótipo AC; esta

mulher não tem descendentes. A filha MCR (2.2) recebeu a hemoglobina normal da mãe e a hemoglobina S do pai, ficando com o genótipo AS. MCR casou-se com um homem normal porque suas descendentes possuem um gene para hemoglobina normal. CAR (3.1) tem o genótipo. AA e EAR (3.2) tem o genótipo AS. O filho (2.3) recusou-se a fazer os exames, mas com certeza ele é AC ou AS.

Com os resultados em mãos, foi feito o aconselhamento genético para a família. Caso LSA venha a ter filhos, ela precisa saber o tipo de hemoglobina que eles herdaram; nesta situação o gene da hemoglobina C pode permanecer nos descendentes ou desaparecer. No caso de MCR, o gene da hemoglobina S permaneceu em seus descendentes e os filhos de E.A.R, se os tiver, deverão saber seu genótipo para os genes da hemoglobina.

A finalidade do aconselhamento genético é que o portador conheça sua condição de AC ou AS e que saiba os cuidados e em que situação deve tomá-los e realizar os mesmos exames em seus cônjuges e descendentes e acompanhar o caminho destes genes.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Elisabeth Meire Gonçalves Ribeiro pelas análises realizadas no GR - Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (Curitiba - Paraná).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bunn, H.F. *et al.* Molecular And Cellular Pathogenesis of Hemoglobin SC Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:7527, 1982.
2. Hoffbrand, A.V. and Pettit, J.E. *Essential Haematology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 3rd. ed. 1993.
3. Irver, G.L. SC Hemoglobin: A Clinical Study. *Blood*, 18: 35, 1961.
4. Jandl, J.H. *Blood Textbook of Hematology*. Boston, Little, Brown and Company, 2nd. ed., 1996.
5. Lee, G.R., Bitheli, T.C., Foerster, J., Athens, J.W. and Lukens, J.N. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 9th ed., 1993.
6. Mazza, J.J. *Manual Of Clinical Hematology*. 2nd. ed. Boston: Little, Brown and Company, 1995.
7. Miale, J.B. *Laboratory Medicine: Hematology*. 6th. ed., Mosby Company, 1982.
8. Motulski, A.G. Frequency of Sickling Disorders in US Blacks. *N. Engl. J. Med.* 288: 31, 1973.
9. Naoun, P.C. *Diagnóstico das Hemoglobinopatias*. São Paulo: Sarvier, 1987.
10. Ober, W.E. Hemoglobin Disease With Fat Embolism: Report of a Patient Dying in Crisis: Autopsy Findings. *Am. J. Med.* 27: 647, 1959.
11. Rockoff, A.S. Myocardial Necrosis Following General Anesthesia In Hemoglobin SC Disease. *Pediatrics*. 61: 73, 1978.
12. Wyngaarden, J.B., Smith, Jr. L.H., Bennett, J.C. *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 19th. ed., 1992.

Diabetes mellitus - uma revisão

Parte I: Conceito e aspectos gerais. Classificação. Aspectos clínicos e predição do *Diabetes mellitus* insulino dependente

Diabetes mellitus - a review

Part I: Concept and general aspects. Classification. Clinical aspects and prediction of *Diabetes mellitus* insulin dependent

Ernesto P. de Oliveira¹, Luiz Gustavo P. Martins¹, Antenor H. P. Pedrazzi² & Sérgio A. Uyemura³

CONCEITO E ASPECTOS GERAIS

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica com hiperglicemia inapropriada causada pela deficiência absoluta de secreção de insulina ou pela redução do efeito biológico desse hormônio (ou por ambos). Trata-se da mais importante doença associada à hiperglicemia. Não é, contudo, uma simples e bem definida entidade mórbida, mas sim um grupo heterogêneo de desordens.¹

O termo "Diabetes", de origem grega, significando "sifão" ou "correr através", foi criado há 2000 anos para descrever a espantosa poliúria. O termo *mellitus*, do latim *mellitu*, significando "de mel" ou "preparado com mel", ilustra o gosto adocicado da urina desses pacientes e marca a diferença da urina insípida dos pacientes com deficiência de ADH (hormônio anti-diurético), portadores da *Diabetes insipidus*.

A deficiência de insulina, seja na secreção ou na bioatividade, resulta na hiperglicemia, característica que, quando excede o limiar renal, permite o aparecimento da glicose na urina (glicosúria). Esta é a base para o surgimento dos sintomas básicos da DM, que, além da glicosúria, é caracterizada por poliúria (urinar em excesso), polidipsia (sede excessiva) e polifagia (fome excessiva).

A concentração de glicose no sangue é mantida dentro de limites estreitos pela ação hormonal, sendo que os principais hormônios envolvidos são produzidos pelo pâncreas. A insulina, um peptídeo sintetizado pelas células β das ilhotas de Langerhans na forma de pró-hormônio (forma inativa), é chamada de hormônio hipoglicemiante, pois o mesmo pode ligar-se a receptores de membrana das células do fígado, tecido muscular e tecido adiposo, aumentando a permeabilidade à glicose, reduzindo assim a glicemia. A insulina estimula também as vias anabólicas; caracterizadas basicamente pelo armazenamento de glicose na forma de macromoléculas como o glicogênio, lipídeos e proteínas; e pela inibição da mobilização dos estoques energéticos destes tecidos (inibe a proteólise, lipólise e glicogenólise). Em geral, pessoas de maior peso requerem mais insulina que pessoas de menor peso para controlar níveis semelhantes de hiperglicemia.

O glucagon, um peptídeo sintetizado pelas células α das ilhotas de Langerhans, atua quando ocorre diminuição da disponibilidade de fontes energéticas (p.ex. jejum prolongado) e estimula a atividade catabólica (lipólise, cetogênese e gliconeogênese), formando e liberando unidades de glicose do fígado.

Entretanto, estes não são os únicos hormônios do organismo com função regulatória dos níveis de glicose sanguínea. A somatostatina, um outro hormônio pancreático, parece atuar a nível local, regulando a liberação de insulina e do glucagon. Este controle bi-hormonal de regulação da glicose requer a secreção apropriada de quantidades variadas desses dois hormônios (insulina e glucagon), os quais agem adequadamente nos tecidos alvos de forma a manter uma glicemia estável. A epinefrina atua aumentando os níveis de glicose sanguínea pela inibição da secreção de insulina e estimulando a liberação de glucagon. Outros hormônios, tais como: hormônio do crescimento (GH) e corticosteróides², parecem também estar envolvidos no controle da glicemia.

Classificação do *Diabetes mellitus* Aspectos clínicos e de patogênese

O National Diabetes Data Group (NDDG), em 1979, desenvolveu um esquema de classificação baseado nos conhecimentos bioquímicos da doença e recomendou a classificação do DM em dois grandes grupos de acordo com a dependência da insulina exógena.⁸ A maioria dos pacientes com o DM se enquadra em uma das duas grandes categorias: *Diabetes mellitus* insulino-dependentes (IDDM), também denominado diabetes tipo I; ou *Diabetes mellitus* não insulino-dependentes (NIDDM), também denominado diabetes do tipo II (Quadro 1). O termo DM tipo II indica um tipo de desordem no qual, ainda que os pacientes não sejam dependentes da terapia insulínica para regular os níveis de glicose, representa um grupo bastante heterogêneo de desordens, incluindo as condições diabéticas que não são caracterizadas como do tipo I. Além disso, muitos pacientes com NIDDM podem ser acompanhados com terapia insulínica por seus médicos, mesmo estando identificados como NIDDM. Da mesma forma, ocasionalmente adultos jovens com sintomas clássicos de cetoacidose diabética associada com anticorpos antilinsulares de ilhotas (ICA) podem entrar em remissão, durante a qual a insulino-terapia é descontinuada, traduzindo-se então um "NIDDM" contradizendo as características de mecanismos patogênicos típicos do IDDM. Há, portanto, uma confusão semântica sobre a possibilidade de pacientes tipo II virem a se tornar tipo I ou vice-versa.

Com o estabelecimento de uma patogênese auto-imune para o DM tipo I e a possibilidade de detecção de auto-

Recebido em 28/03/96

¹Aperfeiçoandos do Curso de Especialização em Análises Clínicas, Curso de Pós-graduação Sensu Iatu da FCFRP-USP e Bolsistas da FUNDAP.

²Professor Titular e Responsável pela Disciplina de Bioquímica Clínica do Curso de Aperfeiçoamento.

³Professor Dr., credenciado junto à Disciplina de Bioquímica Clínica do Curso de Aperfeiçoamento.

anticorpos para determinados antígenos específicos (ICA, por exemplo) por método de imunoensaios, a classificação do DM deveria se basear no critério etiológico ao invés do critério terapêutico. Uma possibilidade seria o "IDDM" abrangendo um único tipo (imunodependente), com todos os outros tipos agrupados no grupo denominado NIDDM. Desta forma, poder-se-ia manter as denominações pre-existentes sem considerar, contudo, com grande relevância, seus significados verbais.¹

Tipo I: *Diabetes mellitus* insulino dependente

Trata-se de uma forma severa do diabetes associada à cetose quando não tratado, e geralmente os indivíduos são propensos ao desenvolvimento de complicações decorrentes do DM. O DM tipo I é mais comum em indivíduos jovens, mas ocasionalmente pode acometer adultos não obesos. É uma alteração metabólica, com exacerbação do catabolismo, na qual a insulina circulante é virtualmente ausente, o glucagon plasmático está elevado e as células β do pâncreas são incapazes de responder a qualquer estímulo insulínogênico conhecido (exercícios, tolbutamida e glucagon, por exemplo).¹ Há destruição ou degeneração das células β do pâncreas que parece ser precipitada por uma série de fatores incluindo uma pré-disposição genética associada a certos antígenos leucocitários humanos (HLA), agentes ambientais (vírus) e agentes químicos com o envolvimento de um componente auto-imune como agente causal do dano celular pancreático e da IDDM.²

Na ausência de insulina, os três principais tecidos alvos desse hormônio (fígado, tecido muscular e tecido adiposo), além de diminuir a capacidade de absorver adequadamente a glicose, continuam a produzir e liberar glicose, aminoácidos e ácidos graxos a partir de seus estoques. Desta forma, algumas vezes, alterações no metabolismo de lipídeos levam a produção e acumulação de corpos cetônicos. Essa persistência inapropriada do estado absorvido após as refeições (pós-prandial) pode ser revertida pela administração de insulina.¹

Em suma, o DM tipo I é caracterizado pelo surgimento abrupto dos sintomas e ocorrência de cetoacidose. Estes pacientes requerem insulina exógena para evitar a cetoacidose e sustentar a vida.

Genética e patogênese do DM tipo I

Vários estudos sugerem que, em gêmeos homozigotos, as influências genéticas são menos marcantes no DM tipo I que no DM tipo II. Apenas 40% dos gêmeos idênticos de pacientes com DM tipo I desenvolverão a doença. Isso também sugere que fatores ambientais são requeridos para a indução do diabetes nestes casos. Em contraste, gêmeos idênticos de pacientes com diabetes tipo II usualmente desenvolvem a doença dentro do primeiro ano após o surgimento dela em seu irmão.

A eficiência em apresentar certos antígenos depende da composição do antígeno de classe II presente na superfície das células apresentadoras de antígeno. O DM tipo I está associado com um aumento da frequência de antígenos leucocitários humanos (HLA). O HLA predominantemente associado com a IDDM varia segundo o grupo racial. Desta forma, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B18, HLA-Cw3, HLA-DR3 e HLA-DR4 ocorrem frequentemente nos leucócitos de caucasianos com IDDM; enquanto que somente o HLA-DR3 e o HLA-DR4 parecem estar correlacionados com a ocorrência de IDDM em asiáticos, africanos e sul-americanos; entretanto, a razão pela qual pessoas portadoras de certos tipos HLA têm predisposição ao desenvolvimento do IDDM ainda não é bem conhecida. Por outro lado, a presença do HLA-DR2, por estar presente nos indivíduos controle parece estar associado com algum tipo de "proteção".

O DM tipo I, ao que parece, pode resultar de um surto viral ou tóxico ambiental às células β do pâncreas dos indivíduos geneticamente predispostos, nos quais o sistema imune destrói erroneamente estas células ao tentar eliminar o agente invasor. Fatores ambientais têm sido associados a alterações na função das células das ilhotas pancreáticas, dentre os quais incluem-se vírus (caxumba, rubéola, coxsackievirus), agentes químicos, etc. A teoria para destruição auto-imune das células β tem sido proposta baseado no mimetismo molecular, onde o sistema imune ataca proteínas da célula β que são homólogas a certos antígenos virais (estes auto-anticorpos podem, talvez, resultar da formação de anticorpos anti-idiotípicos com especificidade cruzada com proteínas das células pancreáticas).

O conceito de destruição auto-imune das células β do pâncreas, com perda da seletividade de imunotolerância, é sustentado pela evidência de que a terapia de imunossupres-

são interrompe a progressão da deficiência de insulina em alguns pacientes com diagnóstico recente de IDDM. Além disso, uma infiltração extensiva com células TH e TC está presente nas ilhotas de crianças com IDDM em fase inicial e no soro destas crianças há anticorpos contra proteínas estruturais e secretoras das células β do pâncreas mesmo antes da implantação da doença e algum tempo após o seu diagnóstico.

A presença de anticorpos anticélulas de ilhotas (ICA) circulantes, virtualmente ausentes em não diabéticos, tem sido detectada em mais de 85% de diabéticos tipo I quando testados nas primeiras semanas após a implantação do diabetes. Além disso, quando imunoensaios sensíveis são usados, mais que 60% desses pacientes também apresentam anticorpos antiinsulina detectáveis mesmo antes de receber a insulino terapia e isso é especialmente prevalente na implantação da doença em crianças. A elevada prevalência de

QUADRO 1
Classificação clínica do *Diabetes mellitus*¹

	Cetose	ICA	Associação com HLA	Tratamento
Diabetes insulino-dependente (IDDM; Tipo I) (10-20% de todos os diabéticos)	Presente	Usualmente presente no início	Sim	Insulina; dieta
Diabetes não insulino-dependente (NIDDM; Tipo II) (80-90% de todos os diabéticos) Não-obesos (15% dos diabéticos tipo II)	Ausente	Ausente	Não	Dieta, hipoglicemiantes ou insulina
Obesos (85% dos diabéticos tipo II)	Ausente	Ausente	Não	Idem, + perda de peso
Diabetes Secundário: <i>Diabetes mellitus</i> ou tolerância à glicose prejudicada associada a outras condições, tais como: doenças pancreáticas, drogas, endocrinopatias, gravidez e etc.				

ICA=Anticorpos anticélulas de ilhotas - HLA=Antígeno leucocitário humano.

anticorpos anticélulas de ilhotas e anticorpos antiinsulina em pacientes com IDDM, assim como o conhecimento da ocorrência da doença em seus irmãos, sustentam o conceito de que mecanismos auto-ímmunes podem contribuir significativamente para a destruição das células β do pâncreas.

Recentemente, tem sido descrito que a maioria dos anticorpos anticélulas de ilhotas são direcionados contra a ácido glutâmico descarboxilase (GAD), uma enzima localizada dentro das células β do pâncreas. O conceito mimetismo molecular é sustentado pela recente descrição de que parte do componente proteico do vírus coxsackievirus B4 contém uma sequência de 24 aminoácidos com considerável homologia com a GAD. Existem estudos para avaliar o envolvimento de anticorpos anti-GAD no desenvolvimento da neuropatia periférica (a nível de neurônio, há uma isoenzima GAD e anticorpos anti-GAD são encontrados em pacientes com síndrome de "Stiff Man", uma rara condição neurológica).

Outra hipótese que corrobora o mimetismo é dada pela albumina de soro bovina, pois esta proteína tem uma homologia com uma proteína da membrana das células β do pâncreas (p69). Crianças que quando bebês foram alimentadas exclusivamente com leite materno têm uma incidência estatisticamente menor de IDDM que aquelas que receberam leite de vaca. Além disso, 142 crianças com IDDM recentemente diagnosticadas tiveram altos títulos de anticorpos anti-albumina bovina quando comparadas com o grupo controle.¹

Comprometimento do sistema hemostático em pacientes diabéticos insulino-dependentes

As propriedades não trombogênicas do endotélio de revestimento da parede vascular estão associadas a um complexo mecanismo que tem eficiência quando não há comprometimento lesivo deste endotélio, estando funcionalmente intacto, tornando-se um importante papel no equilíbrio hemostático. Uma alteração desta condição de continuidade como por exemplo uma aguda lesão local ou um estado patológico crônico que pode ser atribuído a distúrbios do metabolismo de carboidratos pode ativar sistemas fisiopatológicos que levam à trombose e até mesmo à aterosclerose. Neste sentido a hemostasia toma cada vez mais importante papel na formação de placas ateromatosas e trombooses, principalmente nas artérias coronarianas.

Estudos epidemiológicos mostram a estreita correlação entre o aumento de fibrinogênio e de fator VII extrínseco com complicações aterogênicas. Além disso, tem-se verificado, com frequência, aumento do inibidor do fator ativador de plasminogênio em pacientes hipertensos, aumento este que é de risco para pacientes com antecedentes de infarto do miocárdio. Dados epidemiológicos mostram também que a aterosclerose ou as seqüelas aterogênicas são as principais causas de óbito em pacientes diabéticos.

O comprometimento do sistema hemostático de pacientes diabéticos insulino dependentes tem especial importância porquanto ocorre pela diminuição da fibrinólise, confirmada principalmente pelo aumento da atividade do inibidor do ativador de plasminogênio, do fibrinogênio, do fator VII, do complexo trombina-antitrombina e relativa diminuição da atividade do ativador de plasminogênio. Os valores dos parâmetros que avaliam o sistema hemostático na via extrínseca e intrínseca (tempo de protrombina e de tromboplastina parcial), provas de triagem que são as solicitadas pelo clínico, e também o valor do plasminogênio, são normais. A normalidade destas provas é de importância porquanto leva o clínico a um falso diagnóstico caso não solicite a adequada avaliação laboratorial.

A avaliação laboratorial de pacientes diabéticos com comprometimento nefro e neuropatas mostram significativo aumento do nível de fibrinogênio plasmático cujos

valores médios estão entre 4,0 g/L e de 3,5 g/L respectivamente, sendo o aumento considerado um fator de risco para complicações ateroscleróticas nestes pacientes.

A alteração dos parâmetros que avaliam a fibrinólise mostram comprometimento da balança hemostática dos pacientes diabéticos, o que pode levar a um estado de hipercoagulação, que é importante fator nas complicações patológicas da aterosclerose.⁹

Há uma resistência periférica à insulina que tem sido observada na maioria dos pacientes tipo II. Vários fatores podem reduzir a resposta periférica à insulina, tais como: anticorpos antiinsulina, auto-anticorpos específicos para os receptores insulínicos, "down regulation" dos receptores insulínicos causada por hiperinsulinismo, excesso de hormônios (glicocorticóides, hormônio de crescimento, contraceptivos orais, progesterona, catecolaminas e tiroxina). Os pacientes com DM tipo II são frequentemente obesos e a perda de peso pode melhorar a sua resistência à glicose.¹

Síndrome de resistência à insulina (síndrome X)

A DM tipo II pode representar apenas uma faceta da síndrome causada pela resistência à insulina, na qual nota-se que há uma associação bem estabelecida de hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão; as quais levam a doenças arteriocoronarianas e acidentes vasculares cerebrais, e pode resultar de um defeito genético produzindo a resistência à insulina, particularmente quando a obesidade agrava o grau de insulino resistência. Assim, tem sido proposto que a ação prejudicada da insulina predispõe à hiperglicemia, a qual, por sua vez, induz hiperinsulinemia, e se esta é de magnitude insuficiente para controlar a hiperglicemia, o DM tipo II se manifestará. Acredita-se que o excessivo nível de insulina aumenta a retenção de sódio pelos túbulos renais, desta forma contribuindo para, ou causando, hipertensão; um aumento na produção de VLDL no fígado levando a hipertrigliceridemia (e conseqüentemente um baixo nível de HDL colesterol) é também atribuído a hiperinsulinemia. Desta forma, tem sido proposto, também, que o nível elevado de insulina pode estimular a proliferação de células da musculatura lisa endotelial e vascular – por virtude da ação hormonal sobre os receptores de fator de crescimento – para iniciar a aterosclerose¹ (acredita-se que a modificação oxidativa seja de particular importância na aterogênese. Além disso, a glicosilação não enzimática pode ser um mecanismo muito importante ligado ao DM como um processo básico envolvido no desenvolvimento da aterosclerose. O interessante é que a glicosilação pode estar associada com um estresse oxidativo, sendo este processo chamado glicosidação).⁶

Embora haja um acordo completo quanto à associação das desordens citadas anteriormente, o mecanismo da inter-relação entre elas permanece apenas especulativo e aberto a investigações experimentais. Persistem controvérsias sobre o hiperinsulinismo ser ou não causa de hipertensão, desde que estas duas manifestações, as quais sempre coexistem em brancos, não estão frequentemente associadas em negros americanos. Além disso, pacientes com hiperinsulinismo devido a insulinoma são normalmente normotensos e não há redução da pressão sanguínea após remoção cirúrgica do insulinoma e restauração dos níveis normais de insulina. Epidemiologistas australianos preferem agrupar estas desordens como uma síndrome, sem necessariamente implicar que o hiperinsulinismo é etiológicamente responsável pelos outros componentes. Eles sugerem a denominação CHAOS para significar (em inglês) Doença Arteriocoronariana, Hipertensão, Diabetes do adulto, Obesidade e AVC. O maior valor de se agrupar estas desordens como uma síndrome, pela sua nomenclatura, é lembrar que o alvo terapêutico não é apenas corrigir a hiperglicemia, mas também gerenciar a hipertensão e a hiperlipidemia que resultam

TABELA 1

Sistema hemostático em diabéticos controlados e não controlados

Parâmetros	Grupos		
	Controle	Diabéticos	
		Controlados	Não Controlados
PT (%)	94,45 ± 18,72	100,14 ± 18,12	112,89 ± 18,40
TTPa (Seg)	100,3 ± 11,27	100,04 ± 14,97	82,80 ± 13,20
Fibrin. (g/L)	2,35 ± 0,46	2,93 ± 0,60	2,64 ± 0,87
FVII (%)	73,60 ± 12,45	77,45 ± 25,30	109,51 ± 35,63
AT III (%)	102,11 ± 12,27	100,76 ± 16,01	113,31 ± 17,54
Prot. C (%)	87,09 ± 18,35	91,23 ± 16,96	104,96 ± 21,89
PLMG (%)	91,96 ± 13,94	90,56 ± 16,04	113,62 ± 12,08
PAI 1(U/ml)	1,30 ± 0,63	2,41 ± 0,50	2,48 ± 0,39

em considerável morbidade e mortalidade destes pacientes por doenças cardiovasculares. É também para aumentar a conscientização de que a terapêutica com altas doses de insulina exógena pode, conceivelmente, ter efeitos adversos sobre o risco dos pacientes para doenças cardiovasculares, se a hipótese por trás da síndrome de insulinoresistência estiver substantiada. Finalmente, a escolha de agentes anti-hipertensivos ou drogas hipolipidêmicas para gerenciar um dos componentes dessa síndrome, seus efeitos adversos possíveis sobre outro componente da síndrome devem ser cuidadosamente considerados.

Subgrupos de DM tipo II

Os pacientes DM tipo II podem ser divididos, baseando-se no peso corporal, nos subtipos obeso e não-obeso. Atualmente, é impossível identificar características diagnósticas que permitam a definição clara de mais subtipos específicos. Os níveis de insulinemia são muito variáveis para servir de critério nesta classificação. Dentro deste grupo, DM "não tipo I", está um largo sortimento de desordens heterogêneas, que incluem situações raras nas quais um defeito no gene para insulina produz uma insulina biologicamente inadequada, ou uma pró-insulina que não é transformada em insulina nas células β do pâncreas. O bloqueio de receptores para ação da insulina tem sido demonstrado em alguns casos. Na maioria dos pacientes diabéticos tipo II, a causa da desordem permanece indefinida, embora tanto um defeito na secreção como na ação da insulina a nível de receptores estão geralmente presentes.

NIDDM em obesos

A grande maioria dos pacientes com DM tipo II são obesos (cerca de 85%). Estes pacientes possuem uma resistência periférica à insulina endógena que é positivamente correlacionada com uma distribuição anormal de gorduras, com maior acúmulo de gordura acima da cintura. Assim, adipócitos distendidos, fígado e células musculares supernutridas podem ainda resistir a depósitos adicionais de glicogênio e triglicerídeos aos seus depósitos. A hiperplasia das células β do pâncreas está sempre presente e provavelmente é explicada pela resposta insulínica normal ou exagerada, frente ao desafio de glicose e outros estímulos insulínogênicos, observada na forma branda desta doença. Nos casos mais severos, pode acontecer falência secundária (mas potencialmente reversível) da capacidade secretora das células β do pâncreas após exposição à prolongada hiperglicemia de jejum. Este fenômeno, chamado de "dessensibilização", é seletivo para a glicose e as células β do pâncreas recuperam a capacidade de resposta ao estímulo da glicose, uma vez que a hiperglicemia persistente é corrigida por alguma forma de terapia, incluindo terapia dietética, hipoglicemiantes orais e insulina.

A principal causa de resistência à insulina nas células alvo de pacientes obesos parece ser um defeito no pós-receptor da ação insulínica. Isso está associado com um estoque celular aumentado e uma habilidade reduzida para remover nutrientes da circulação após alimentação. Conseqüentemente, o hiperinsulinismo pode ainda incrementar a resistência insulínica, por "down-regulation" dos receptores insulínicos e, quando a hiperglicemia é prolongada, uma proteína transportadora específica para glicose (GLUT 4), nos tecidos alvo para insulina, trona-se "down-regulated" após ativação contínua. Isso contribui adicionalmente para um defeito pós-receptor da ação insulínica, agravando a hiperinsulinemia.

Quando a "supernutrição" celular dos tecidos alvo da insulina é corrigida, há uma menor saturação dos depósitos de estoque com interrupção deste ciclo. A resistência periférica à insulina pode geralmente ser normalizada pela redução tanto do hiperinsulinismo como da hiperglicemia.

NIDDM em não obesos

Neste subgrupo, encontram-se aproximadamente 15% dos pacientes com NIDDM. Na maioria desses pacientes, a ação da insulina encontra-se prejudicada a nível de pós-receptor e uma ausência ou redução na fase precoce de liberação da insulina em resposta à glicose pode ser demonstrada. Contudo, outros estímulos insulínogênicos, tais como a infusão rápida de aminoácidos, tolbutamida intravenosa ou glucagon intramuscular, permanecem eficientes em elucidar uma liberação aguda de insulina.

A hiperglicemia em pacientes não obesos com NIDDM freqüentemente responde a terapia dietética e a hipoglicemiantes orais, e ocasionalmente a terapia insulínica é requerida para alcançar um controle glicêmico satisfatório, ainda que não seja necessária na prevenção da cetoacidose.

A maioria dos pacientes não obesos com NIDDM não podem ser subclassificados, entretanto vários subtipos pouco caracterizados são sugeridos com base nas particularidades genéticas de uma pequena proporção dos pacientes:

a) NIDDM ocorrendo na infância tardia e em adultos jovens:

a.1) NIDDM em não obeso autossômico dominante: sugere-se transmissão autossômica dominante devido a uma forte história familiar de DM ocorrendo em um dos pais e em uma parte dos descendentes desse indivíduo.

a.2) NIDDM de aparecimento precoce: estudos epidemiológicos sugerem que a prevalência familiar é devida a genes diabetogênicos herdados de ambos os pais (estado homozigoto). Quando apenas um dos pais passa o gen diabetogênico, sua expressão clínica tardia pode requerer fatores genéticos ou ambientais adicionais. Uma alta prevalência familiar de diabetes tipo II tem sido observada em pacientes cuja idade de implantação da doença está entre 25 e 40 anos.

b) Insulinas Mutantes: apesar de conhecermos essa alteração há mais de 12 anos, apenas 8 famílias foram identificadas como tendo formas anormais de insulina. Em três dessas famílias existe uma alteração na clivagem da molécula de pró-insulina; nas outras 5 famílias foram observadas anormalidades na estrutura da pró-insulina.¹

Diabéticos NIDDM que podem ser DM tipo I em remissão

A classificação atual de DM tem sido largamente aceita em todo mundo, mas suas deficiências são aparentes em muitos casos. Um subgrupo que tem sido de difícil enquadramento na atual classificação "terapêutica" é constituído por diabéticos tipo I que permanecem em remissão temporária por mais de dois anos. Uma história de cetoacidose com presença de

anticorpos anticélulas de ilhotas (ICA) no início do diabetes e um modelo de associação com HLA que inclui o HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-B8 e HLA-B15 indica, do ponto de vista etiológico, que estes pacientes têm DM do tipo I ainda que temporariamente eles não sejam insulino dependentes.

Além disso, é possível que um número de pacientes com diabetes inicial, particularmente aqueles não obesos, possam representar um estágio precoce da DM tipo I devido a uma destruição auto-imune das células β do pâncreas de amplitude suficiente a permitir uma hiperglicemia, mas não necessariamente uma insulino dependência. Estudos mostram que cerca de 16% de um grupo de pacientes diabéticos inicial adultos, que foram classificados como NIDDM, eram ICA-positivos.

Com a disponibilidade do radioimunoensaio, método mais adequado para determinação de anticorpos anticélulas da ilhota, assim como para anticorpos anti-GAD (ácido glutâmico descarboxilase), será possível a triagem de maiores populações de diabéticos adultos. Isso será particularmente útil nos grupos étnicos que são mais propensos a doenças auto-imunes nos quais há prevalência de IDDM e, pode ainda permitir a identificação precoce de pacientes com destruição imune-induzida parcial de células β do pâncreas, permitindo prever uma provável ineficiência dos hipoglicemiantes orais nesses pacientes e que eles venham requerer a insulino terapia.¹

Diabetes secundário

Como notado no Quadro 1, existe um grupo diverso de alterações caracterizadas pela associação do DM com outras condições. Apenas alguns dos muitos tipos de diabetes secundários serão discutidos aqui.

Doença pancreática

A pancreatectomia, a pancreatite causada por alcoolismo crônico e outras formas de pancreatite estão associadas com muitas das características clínicas do IDDM, devido a anormalidade primária de deficiência insulínica. Existe, porém, nestes pacientes, uma grande tendência para desenvolvimento de hipoglicemia induzida pela insulina, provavelmente devido à perda concomitante da contra-regulação hormonal do glucagon. Estas características estão usualmente associadas com insuficiência pancreática exócrina.

Toxicidade por drogas

Muitas drogas estão associadas com intolerância a carboidratos ou DM. Algumas agem por interferir com a liberação de insulina pelas células β do pâncreas (tiazidas e fenitoínas), outras por induzir a resistência periférica à insulina (glicocorticóides e contraceptivos orais) e ainda por causar destruição das células β do pâncreas (pentamidina).

Doenças endócrinas

A produção excessiva de certos hormônios – GH (acromegalia), glicocorticóides (síndrome de Cushing), catecolaminas (feocromocitoma), glucagon (glucagonoma), ou somatostatina pancreática (somatostatina) – pode produzir uma síndrome de DM por um variado número de mecanismos.¹

Classificação dos estados hiperglicêmicos Uma abordagem mais simplificada

Segundo o National Diabetes Data Group os estados de hiperglicemia podem ser classificados em DM e quatro outras desordens, permanentes ou temporárias, que exi-

bem resultados de Teste de Tolerância à Glicose (GTT) semelhantes ao diabetes.

O DM, sua classificação (IDDM x NIDDM) e caracterização já foram exaustivamente discutidas anteriormente. Resta-nos agora caracterizar as outras quatro desordens hiperglicêmicas. Tais desordens são normalmente secundárias a certas condições, tais como: pancreáticas e endócrinas, uso de certas drogas, condições genéticas e ambientais.

As quatro desordens hiperglicêmicas são citadas abaixo:

Baixa tolerância à glicose

Caracteriza-se por hiperglicemia em níveis insuficientes para caracterizar o DM, a glicemia pode variar na faixa do normal e limítrofes. Estes pacientes têm maior tendência a desenvolver DM.²

Diabetes gestacional

É caracterizada pelo surgimento do diabetes ou baixa tolerância a glicose durante a gravidez. Após o parto, a glicemia da paciente pode voltar ao normal ou pode vir a desenvolver o diabetes tardiamente em sua vida. Em outros casos, a depender do nível de glicemia de pós-parto, a paciente pode ser classificada em baixa tolerância a glicose, tolerância a glicose previamente anormal (ver abaixo) ou DM.

Para reduzir o risco de malformações do feto e complicações materno-fetal, mulheres grávidas e mulheres que pretendem engravidar requerem um rigoroso controle da glicemia. Essas mulheres precisam ter uma freqüente avaliação física, serem treinadas para fazer monitoramento doméstico da glicemia e podem requerer testes laboratoriais e diagnósticos específicos. Consultas com um obstetra e médico especializado em diabetes são indicadas antes da gravidez.²

Tolerância à glicose previamente anormal

Usa-se este termo para classificar aqueles pacientes que atualmente mostram níveis de glicemia normais mas que no passado tiveram tolerância a glicose anormal. Nesta classe, incluem-se as mulheres que tiveram diabetes gestacional e que, após o parto, voltaram ao normal ou indivíduos obesos com NIDDM, os quais, após a perda de peso, também voltaram ao normal. Esta classe é mais útil a estudos epidemiológicos.²

Tolerância à glicose potencialmente anormal

Agrupam-se pessoas que têm glicemia normal, mas têm risco aumentado de desenvolver o DM (gêmeos, irmãos e etc.). Também tem maior função epidemiológica.²

Predizendo o IDDM

O início do IDDM é cada vez mais previsível através da detecção auto-anticorpos associados a ele. Este avanço no conhecimento que envolve o diabetes é importante pela possibilidade de remissão da doença por terapia de imunossupressão.⁷

Recentemente há dúvidas quanto ao tempo pregresso no qual é possível o encontro destes auto-anticorpos e se realmente eles podem ser usados. Nos últimos anos, o número de auto-antígenos identificados pela presença de auto-anticorpos em pré-diabéticos quase dobrou. Os auto-antígenos caracterizados e que têm relevância maior são a insulina, o GAD e o ICA69 (um auto-antígeno com alguma homologia à lacto-albumina com PM de 55kDa).⁴

Sabe-se que o anticorpo anticélulas de ilhotas do tipo citoplasmático precede em longo tempo o início clínico da doença. Os anticorpos anticélulas de ilhotas são anticorpos policlonais da classe IgG, os quais são detectáveis por imuno-

fluorescência indireta contra cortes histológicos de pâncreas humano. Em estudos prospectivos, de 5 a 8 anos de duração, o risco acumulativo de IDDM, em indivíduos ICA-negativos, com parentes de 1º grau diabéticos, foi apenas cerca de 1%, enquanto revelou-se de 40 a 70% naqueles indivíduos ICA-positivos, dependendo do título. O teste de imunofluorescência indireta para ICA mostra-se de difícil padronização e ocorre grande coeficiente de variação entre os laboratórios.⁷

A existência de auto-antígenos caracterizados que podem ser isolados ou sintetizados em grandes quantidades, que formam a base para os ensaios quantitativos para auto-anticorpos, provavelmente permitirá que estes substituam o teste por anticorpo anticélula de ilhotas citoplasmático nos próximos anos. Usando apenas três ensaios para auto-anticorpos (GAD, insulina e ICA69), quase todos os parentes de diabéticos, ICA-positivos, expressam pelo menos um destes auto-anticorpos e 90% dos pré-diabéticos expressam dois ou mais auto-anticorpos específicos para estes autoantígenos bioquimicamente definidos.

A existência de vários auto-antígenos de ilhotas deve facilitar grandemente a triagem de populações para o risco de diabetes. Neste contexto, levanta-se dúvidas de quais destes antígenos são ensaiados para a patogênese de DM tipo I, e existe ainda a hipótese de que a insulina seja um antígeno crucial. Hoje, a insulina é o único auto-antígeno específico das células β do pâncreas e os anticorpos para insulina freqüentemente precedem outros anticorpos em pré-diabéticos, correlacionando-se com a idade na qual o IDDM se desenvolverá.⁴

A presença de anticorpos antiinsulina entre indivíduos não afetados, com parentes diabéticos, está associada com anticorpos anticélulas de ilhotas. Os indivíduos com estes anticorpos e anticorpos antiinsulina possuem uma resposta insulínica mais prejudicada e são mais favoráveis para progredir para o IDDM que aqueles com apenas um dos dois. Finalmente, anticorpos anti-GAD têm se mostrado como o mais promissor marcador de IDDM. Essencialmente, 100% das crianças e adultos jovens terão anti-GAD antes do início do IDDM, e alguns deles, ao desenvolver o IDDM, perderão o anticorpo.^{4,7}

A predição do *Diabetes mellitus* tipo I não é dependente somente da presença de anticorpos. Em particular, a presença de uma série de auto-anticorpos e a perda da primeira fase de secreção insulínica após a administração intravenosa de um agente insulínogênico permitem a identificação de parentes com risco maior que 90% para desenvolver diabetes tipo I nos quatro anos seguintes.

É importante notar que o anticorpo anticélula de ilhota, e provavelmente os outros auto-anticorpos relacionados, não apenas em parentes de 1º grau de diabéticos, mas na população em geral, tem se mostrado associado com o desenvolvimento subsequente de IDDM. A utilização dos tipos HLA como marcadores na predição do IDDM tem valor limitado ou até nulo na população em geral. Desta forma, a triagem baseada nos marcadores imunológicos e sustentada pela tipagem subsequente do HLA constitui um método mais eficiente e de menor custo.

O anticorpo anticélula de ilhota tem maior valor preditivo para IDDM em crianças que em adultos. Desta forma, dos 2 a 3% de pais não diabéticos, ICA-positivos cuja prole tem IDDM, apenas cerca de 15% se tornarão diabéticos em 5 anos. O anticorpo antiinsulina prediz o IDDM, usualmente até a puberdade. Crianças jovens que estão desenvolvendo o IDDM são mais freqüentemente anticorpo antiinsulina positivo com altos títulos. O auto-anticorpo anti-GAD prediz o IDDM em todas as idades.⁷

Nos EUA [Diabetes Prevention Trial-Typel (DPT-I)], indivíduos geneticamente susceptíveis são identificados por recrutar parentes de pacientes com IDDM, depois que aqueles com

HLA haplóides protetores (DQA 0301, DQA 0602) são excluídos. A auto-imunidade para células β é demonstrada por determinação de anticorpos anticélulas de ilhotas e anticorpos antiinsulina e o dano às células β do pâncreas é demonstrado pela resposta insulínica induzida por glicose. Estudos prospectivos com famílias têm mostrado que, pela combinação de marcadores genéticos, metabólicos e imunológicos, especialmente quando positivo para mais de um auto-anticorpo, pode-se identificar indivíduos não diabéticos cujo risco de IDDM clínico dentro de 5 anos é de pelo menos 50%. Dados sugerem que, sem a determinação da susceptibilidade genética ou grau de dano às células β do pâncreas, e com a determinação de apenas um anticorpo (anti-GAD), pode-se prever o IDDM na população geral com uma sensibilidade de 82% e uma especificidade de 100%. Porém, deve-se atentar que é necessário dispor, dentro do possível, de máxima sensibilidade e especificidade, evitando ao máximo os falso negativos e falso positivos causados por qualquer motivo. Isso pode ser obtido pela combinação de informações de vários auto-anticorpos, incluindo o anti-GAD, e interpretando estes dados juntamente com a determinação do dano às células β do pâncreas, bem como o conhecimento sobre a susceptibilidade genética, garante-se a melhor predição de IDDM futuro.⁵

A habilidade para prever o IDDM tem algum benefício prático. Primeiro, muitos pacientes com IDDM incipiente, especialmente indivíduos de meia idade, até tornarem-se verdadeiramente insulino-dependentes, passam por uma fase de diabetes não insulino-dependente ("NIDDM"); outros, por sua vez, podem retornar ao "NIDDM" um tempo após sua estabilização com insulina. A identificação de anticorpos anticélulas de ilhotas, especialmente entre pacientes não obesos com NIDDM, ajuda a identificar quais deles estão desenvolvendo IDDM e quais não deveriam ter sua dose de insulina diminuída. A gravidez e a puberdade são fases em que há um aumento marcante na resistência à insulina. Uma fração de pacientes com diabetes gestacional tem IDDM incipiente como doença de base. Já que a gravidez é também uma época de imunossupressão natural, o processo patogênico pode estar desacelerado ou interrompido, contudo, a expressão do diabetes depende do grau de dano já existente nas células β do pâncreas. A identificação de IDDM prestes a acontecer entre estas pessoas com diabetes gestacional será melhor alcançada pela detecção dos anticorpos anticélulas de ilhotas três a seis semanas após o parto.¹

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Karam, J. H. & Forsham, P. H.: Pancreatic Hormones & *Diabetes mellitus*. In: Greenspan, F. S. & Baxter, J. D.: Basic & Clinical Endocrinology, 4th. ed., Lange Medical Book, USA, 1994, pp. 571-634.
2. Hanson, N. K.: Carbohydrates. In: Anderson, S. C. & Cockayne, S.: *Clinical Chemistry - Concepts and applications*. 1st. ed., W. B. Saunders, USA, 1993, pp. 139-164.
3. Vander, A. J.; Sherman, J. H. & Luciano, D. S.: *Fisiologia Humana*, 3rd. ed., Mc Graw-Hill, São Paulo, 1981.
4. Eisenbarth, G. S.; Gianini, R.; Pugliese, A.; Verge, C. F. & Pietropaolo, M.: Prediction and prevention of type I Diabetes. *Transplantation Proceedings* 26:361-362, 1994.
5. Palmer, J. P.: What is the best way to predict IDDM? *Lancet* 343:1377-1378, 1994.
6. Schwartz, C. J.; Valente, A. J. & Spragve, E. A.: A modern view of athenogenesis. *Am. J. Cardiol.* 71:9B-14B, 1993.
7. MacLaren, N. K.: How, When and Why to predict IDDM. *Diabetes* 37:1591-94, 1988.
8. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of *Diabetes mellitus* and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039-57, 1979.
9. Carmassi, F.; Morale, M.; Puccetti, R.; de Negri, F.; Monzoni, F.; Navalesi, R. & Mariani, J.: Coagulation and fibrinolytic system impairment in insulin dependent *Diabetic mellitus*. *Thrombosis Research* 67:643-654, 1992.

Capacidade fagocítica de polimorfonucleares (PMN) humanos frente a várias partículas: *Candida albicans*, Zymosan, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Escherichia coli**

Phagocytosis capacity of the human neutrophils (PMN) against some particles

M.M. Zaha-Inouye; H.K. Morimoto; E.M.V. Reiche; R. Pontello; E.T. Anzai & I. Felipe

RESUMO – O processo de fagocitose envolve a ligação de partículas a receptores de superfície, resultando em indução de sinais intracitoplasmáticos e internalização de partículas, tendo importante papel na evolução das moléstias infecciosas, principalmente das bacterianas. Neste trabalho, nos propusemos a estudar a fagocitose "in vitro", por meio do isolamento de PMN do sangue periférico de 17 amostras provenientes de doadores do Hemocentro do HURNP colocados em contato com as diversas partículas acima citadas. Com o objetivo de se obter a indicação da partícula mais adequada para uso na rotina laboratorial, as características avaliadas foram a capacidade fagocítica e a facilidade de leitura ao microscópio ótico. Os resultados obtidos indicam maior capacidade fagocítica (em porcentagem de células que apresentaram fagocitose) quando se fez uso da partícula de Zymosan (77%) seguido de *C. albicans* (70%) e o maior índice de partículas fagocitadas (em porcentagem de células que fagocitaram acima de 4 partículas) quando se fez uso de Zymosan (50%) seguido de *S. aureus* (37%) permitindo concluir que destas partículas a mais adequada para uso na rotina laboratorial é o Zymosan.

PALAVRAS-CHAVE – Capacidade fagocítica, polimorfonucleares, partículas indicadoras.

SUMMARY – The process of phagocytosis involves the binding of particles to surface receptor resulting in the triggering of intracytoplasmatic signals and internalization. The purpose of this work, was to study the phagocytosis "in vitro", by the isolation of peripheral blood neutrophils of 17 samples obtained from blood donors of Hemocentro of HURNP, putting in contact with the above mentioned particles. In an attempt to obtain the indication of the particle more adequate to use in the laboratorial routine, the characteristics analysed were phagocytosis capacity and the facility of reading to optical microscopy. The results obtained indicated that the highest phagocytosis capacity (in percentage of cells presenting phagocytosis) was when the particle zymosan was used (77%), followed by *C. albicans* (70%) and the highest index of phagocytosed particles (in percentage of cells phagocytosing more than 4 particles) was when zymosan was used (50%), followed by *S. aureus* (37%) permitting to conclude that from these analysed particles, the more adequate for use in laboratorial routine is zymosan.

KEY WORDS – Phagocytosis capacity, neutrophils (PMN), particles.

INTRODUÇÃO

Leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos) são os fagócitos importantes no combate às infecções piogênicas.

O processo de fagocitose envolve fatores quimiotáticos que atraem neutrófilos e monócitos em direção ao foco da inflamação, onde ocorre a ligação de partículas a receptores em sua superfície, resultando em ingestão e morte do microrganismo infectante. Componentes do soro, como a imunoglobulina G e proteínas do Sistema Complemento interagem com os microrganismos, constituindo opsoninas que concorrem para a facilitação da fagocitose, portanto, anormalidades

na fagocitose podem decorrer de defeitos no próprio neutrófilo, como também de disfunção ou deficiência das proteínas do complemento ou das imunoglobulinas.

Durante a fagocitose, grânulos no citoplasma fundem-se com o vacúolo fagocítico liberando seu conteúdo de enzimas hidrolíticas, proteínas bactericidas e mieloperoxidase que, em reação com peróxido de hidrogênio e outros metabólitos de oxigênio, tal como ânions superóxidos, são altamente eficientes na morte de microrganismos endocitados.

A disfunção fagocítica tem sido associada à maior susceptibilidade às infecções. Em relação às formas de Hanseníase, Sher & Cols¹¹ verificaram defeitos significativos na migração, quimiotaxia e quimioquese em pacientes da forma Vircho-

Recebido em 02/10/95

*Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Patologia Aplicada – Setor de Imunologia Clínica
Hospital Universitário regional do Norte do Paraná (HURNP) – Rua: Robert Koch 60, CEP: 86038-440, Londrina, Paraná, Brasil.

wiana e menos acentuada na forma Tuberculóide, embora Rojas-Spinosa¹⁰, não tenha encontrado diferenças na habilidade de produzir ânion superóxido (O₂⁻) por leucócitos PMN provenientes de pacientes Virchowianos quando comparados com os de indivíduos normais.

Duas desordens na função do neutrófilo, cada uma indicando uma deficiência específica, ressaltam a importância do sistema NADPH/NADH e mieloperoxidase na morte de microrganismos pelo PMN: a doença granulomatosa crônica da infância (DGC), associada a severas infecções recorrentes causadas por estafilococos e microrganismos gram-negativos, quando PMNs, apesar de fagocitarem os microrganismos não conseguem eliminá-los, por não manifestar "burst" respiratório; deficiências severas de glicose-6-fosfato-dehidrogenase que também podem levar a alterações no "burst" respiratório de PMN, apresentam quadro semelhante à DGC da infância (Wade & Mandell¹⁶).

Vindenes & Bierknes¹⁵, estudando, em pacientes que sofreram extensas queimaduras, receptores de membrana, encontraram atividade fagocítica aumentada para *C. albicans* opsonizadas com complemento e diminuída para *C. albicans* opsonizadas com IgG.

A influência de imunomoduladores sobre a atividade fagocítica de PMN tem sido tema de estudo de vários autores. Em 1964, Woolees & Di Luzio¹⁷ já registravam a influência da administração de glucana, um polissacarídeo derivado do fungo *Sacharomyces cerevisiae*, sobre a resposta fagocítica e proliferativa do sistema retículo endotelial, com aumento da atividade fagocítica e hiperplasia hepática e esplênica.

A timomodulina, derivado do timo bovino, atua sobre os PMNs "in vitro", induzindo células mononucleares a liberar fatores capazes de estimular a fagocitose e a morte intracelular de *Staphylococcus aureus* (Lantero & Cols.⁶). O uso de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) mostrou aumento significativo da fagocitose de *Candida albicans* (Richardson & Cols.⁹ por PMNs. Fabian & Cols.³, realizando estudo comparativo da ação de interleucina (IL)-1, IL-3, IL-5 e Gm-CSF "in vitro", concluíram que Gm-CSF e IL-1 aumentam a fagocitose de *C. albicans* por PMN, resultados concordantes com os achados de Capsone & Cols.¹, que realizando tratamento de PMN com as citocinas recombinantes, interferon gama (IFN-gama), rGm-CSF e fator de necrose tumoral alfa (rTNF alfa) concluíram que os dois últimos aumentam a capacidade de ligação e a fagocitose de eritrócitos sensibilizados com IgG, por PMNs. O TNF humano, recombinante, também estimula a fagocitose de vírus herpes simples (HSV) opsonizados com complemento, por PMN humano (Van Strijp & Cols.¹⁴).

Existem várias maneiras para se detectar a presença de defeitos na fagocitose por meio de teste de avaliação da opsonização, da ingestão, da degranulação e do metabolismo de oxigênio do fagócito.

Vários métodos podem ser utilizados para se verificar a função microbicida do PMN. O teste mais rotineiramente utilizado para a determinação da capacidade oxidativa do PMN é a medida da redução do corante nitrobluetetrazolium (NBT) e quimioluminescência. Outros métodos podem medir o consumo de oxigênio, a produção de peróxido de hidrogênio, a produção de superóxido e oxidação de glicose pelos PMN. A presença de mieloperoxidase pode ser detectada por coloração citoquímica ou por citometria de fluxo.

Para estudo da atividade bactericida, PMN e bactérias podem ser incubados juntos e organismos associados a células podem ser separados dos organismos livres por centrifugação diferencial. Títulos de bactérias vivas podem ser determinados por contagem de colônia em placas de ágar. A marcação do microrganismos com iodo radioativo pode ser utilizada para ensaios de associação com células, como alternativa para a contagem de colônias (Cohn²; outro método de avaliação da fagocitose é a determinação espectrofotométrica de óleo ingerido (Stossel, Alpes & Rosen¹²) modificado pela marcação de partículas de óleo recobertas por lipopolissacarídeo (LPS) com I¹²⁵. Forsgren & Cols.⁴. Michell & Cols.⁷ utilizaram monocamadas celulares para avaliação do efeito de vários agentes sobre a fagocitose de *Salmonella typhimurium* marcado com P.

O índice fagocítico é um ensaio microscópico simples do número de bactérias ingeridas por leucócitos polimorfonucleares. Os resultados podem ser expressos como número de bactérias ingeridas por PMN ou porcentagem de leucócitos que ingeriram microrganismos (Wade & Mandell¹⁶).

MATERIAL E MÉTODO

Partículas indicadoras da fagocitose

Candida albicans: cepa 577, originada de pacientes com candidíase mucocutânea, isolada pelo Serviço do Dr. Luis Rodolfo Travassos, Escola Paulista de Medicina (UFSP), gentilmente cedido pela Dr^a Ionice Felipe. O fungo foi mantido à temperatura ambiente em ágar Sabouraud dextrose. Uma alíquota desta cultura foi assepticamente transferida para um tubo contendo 10 ml de Sabouraud dextrose sem ágar a 24°C por 24 h. As leveduras foram obtidas por centrifugação (2000 G por 5 min) e lavadas 3 vezes em salina tampão fosfato (PBS) pH 7,0, fixado com glutaraldeído 1%, overnight a 4°C. Lavado e ressuspensão o sedimento em meio RPMI, pH 7,0 contendo

GRÁFICO 1
Capacidade fagocítica de PMN provenientes de 17 amostras de indivíduos normais frente a várias partículas em porcentagem de células que apresentaram fagocitose

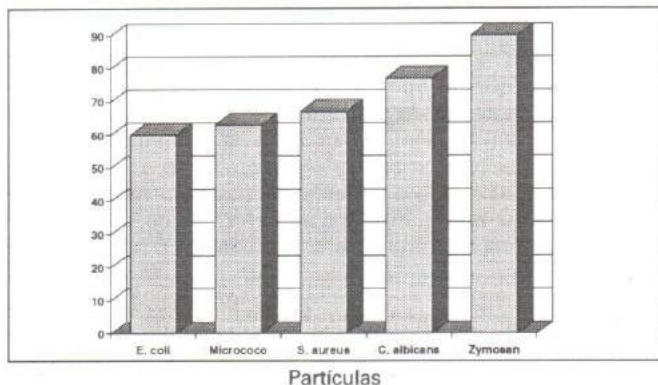


GRÁFICO 2
Porcentagem de PMN que fagocitaram acima de 4 partículas por célula

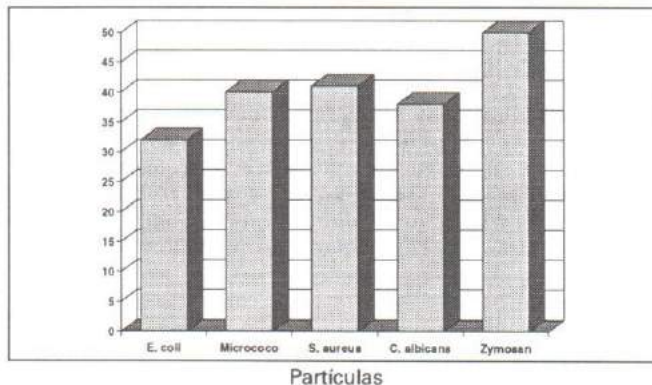


GRÁFICO 3
Porcentagem de PMN que fagocitaram 3 partículas por célula

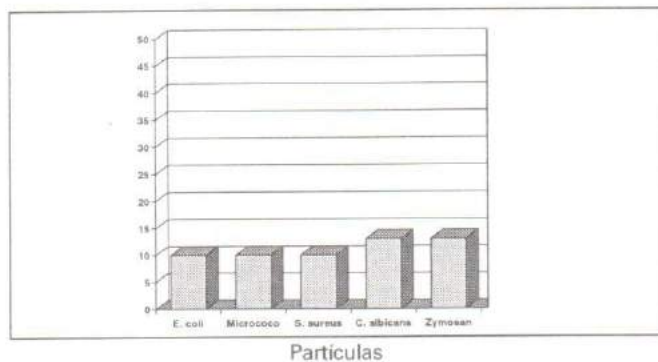


GRÁFICO 4
Porcentagem de PMN que fagocitaram 2 partículas por célula

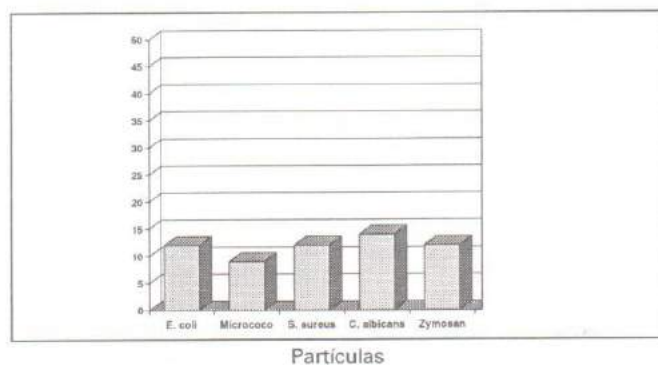


GRÁFICO 5
Porcentagem de PMN que fagocitaram 1 partícula por célula

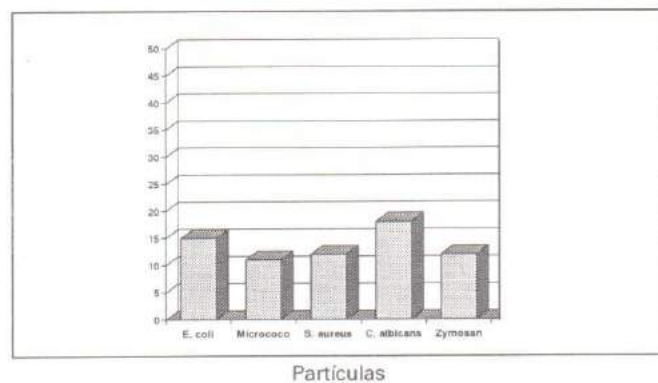


GRÁFICO 6
Níveis de fagocitose de PMN frente à partícula *C. albicans*

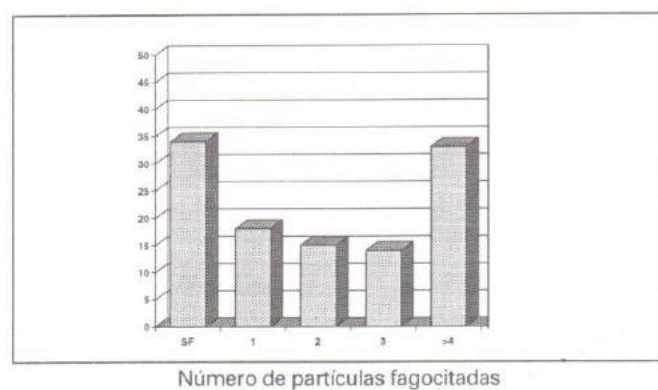


GRÁFICO 7
Níveis de fagocitose de PMN frente à partícula Zymosan



GRÁFICO 8
Níveis de fagocitose de PMN frente à partícula *S. aureus*

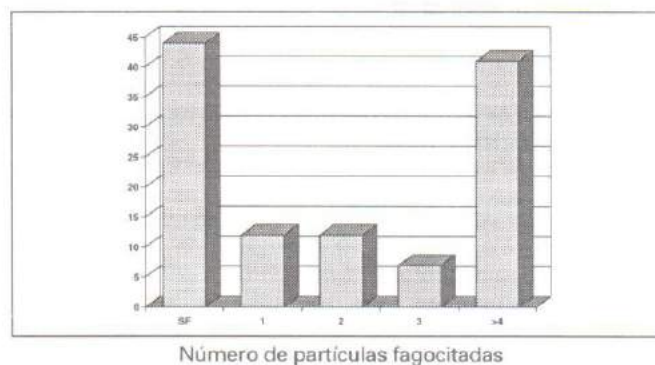


GRÁFICO 9
Níveis de fagocitose de PMN frente à partícula Micrococo

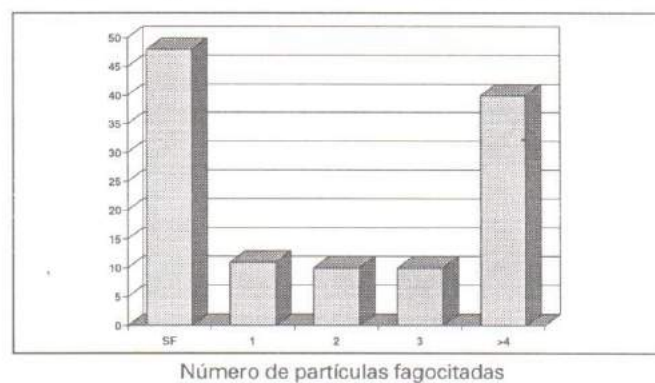
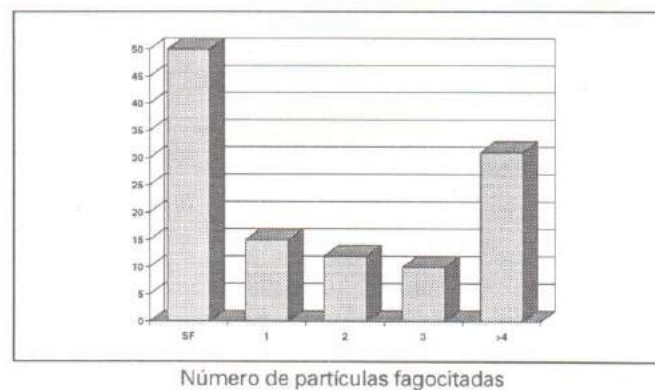


GRÁFICO 10
Níveis de fagocitose frente à partícula *E. coli*



1% de soro humano normal inativado, tipo sangüíneo AB e acertado a concentração para 10^8 céls./ml. 10 minutos antes do uso disperso *C. albicans* com seringa hipodérmica para evitar grumos.

Zymosan: gentilmente cedido pela Dr^a Ionice Felipe (UEL), liofilizado, foi ressuspensão em meio Hanks, pH entre 7,0 e 7,5, ajustado a concentração para 6×10^8 partículas/ml, adicionado 0,1 ml de soro de cobaia como fonte de complemento; incubado 30 min a 37°C em banho-maria; centrifugado a 1000 G por 10 min, ressuspensão o sedimento em meio Hanks, aliquoteado e guardado a -20°C.

Staphylococcus aureus: gentilmente cedido pela Dr^a Eiko Nakagawa Itano (UEL), cepa LF (N^o 84:1345 - CDC, Atlanta), colônias foram retiradas do meio de cultura, colocando-se salina fisiológica (SF), as bactérias lavadas 2 vezes em SF 0,85% e a concentração acertada para 1×10^8 partículas/ml que correspondem à D.O.= 0,1 no comprimento de onda de 620 nm. As amostras foram aliquoteadas e guardadas a -20°C.

Escherichia coli: cepa ATCC 25922, gentilmente cedido pela Dr^a Regina Mariuza Borsato Quesada (LAC/HURNP/UEL). As bactérias foram lavadas 2 vezes com SF 0,85% e sua concentração acertada para 1×10^8 céls./ml, correspondendo à D. O.= 0,1 no comprimento de onda de 620 nm. As amostras foram aliquoteadas a -20°C.

Micrococcus: gentilmente cedido pela Dr^a Eiko Nakagawa Itano (UEL). As bactérias foram lavadas 2 vezes com SF 0,85% e sua concentração acertada para 1×10^8 céls./ml, correspondendo à D. O.= 0,1 no comprimento de onda de 620 nm. As amostras foram aliquoteadas e guardadas a -20°C.

Células fagocíticas: Para obtenção de PMN, amostras de sangue de doadores do Hemocentro Regional do HURNP foram colhidas com heparina, deixadas 4 horas a 4°C para sedimentar as hemácias, foi recolhido o anel

de leucócitos formado sobre o sedimento, diluído com SF 0,85% gelada na proporção de 1:2; colocado gentilmente sobre Ficoll-Hypaque à densidade de 1,119, centrifugado 30 min a 1250 rpm e removida a nuvem de leucócitos formada; lavada 2 vezes com SF gelada e 1 vez com meio RPMI. Ressuspensão o sedimento de leucócitos com meio RPMI contendo 10% de SHNi e ajustado a concentração para 2×10^6 céls./ml.

Ensaio fagocítico: Foram colocados em contato 200 μ l de meio RPMI contendo 10% de SHNi PMN na concentração de 2×10^6 céls./ml e 200 μ l da solução da respectiva partícula, na concentração de 2×10^7 partículas/ml. Incubadas 30 min a 37°C, realizado esfregaço sobre lâmina e corados com Giemsa. A leitura foi realizada ao microscópio ótico, obtendo-se resultados em porcentagem de células que apresentaram fagocitose e número de partículas fagocitadas por células.



Fig. 1 - Fagocitose de zymosan por polimorfonucleose.

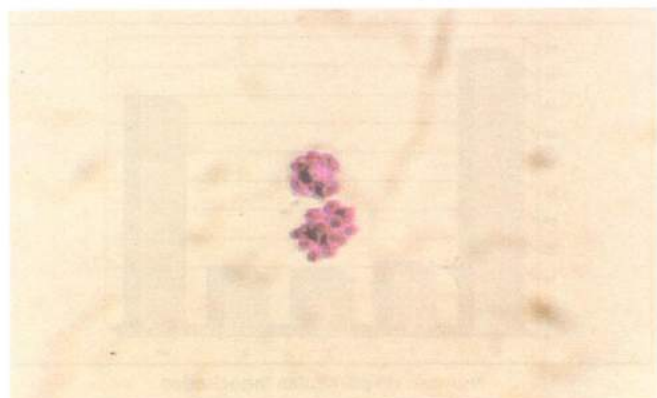


Fig. 2 - Fagocitose de *Candida albicans* por polimorfonucleose.

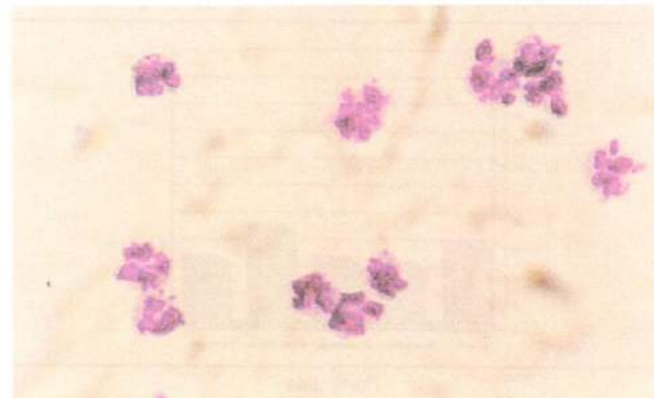


Fig. 3 - Fagocitose de micrococcus por polimorfonucleose.



Fig. 4 - Fagocitose de *Escherichia coli* por polimorfonucleose.

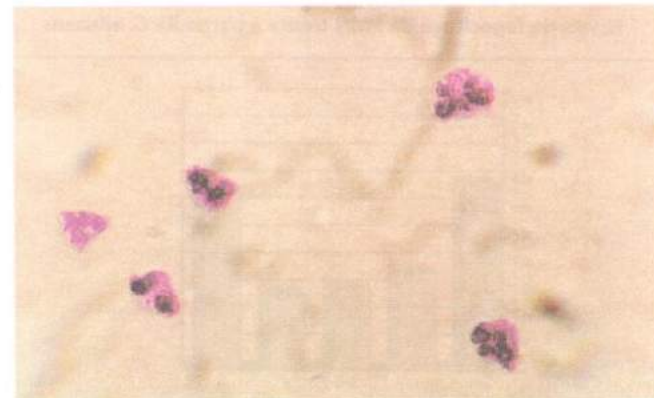


Fig. 5 - Fagocitose de *Staphylococcus aureus* por polimorfonucleose.

RESULTADOS

A capacidade fagocítica dos PMN foi avaliada em porcentagem de células que apresentaram fagocitose, frente a cada uma das partículas utilizadas, como demonstrado no Gráfico 1. A partícula que permitiu maior porcentagem de células com fagocitose foi Zymosan (77%) seguido de *C. albicans* (70%), *S. aureus* (59%), Micrococo (54%), e *E. coli* (52%).

A contagem do número de partículas fagocitadas por célula, Gráficos 2, 3, 4 e 5, permitiu observar maior capacidade fagocítica, acima de 4 partículas por células, quando se fez uso de Zymosan (50%).

O comportamento da capacidade fagocítica de PMN frente a cada uma das partículas utilizadas é demonstrada nos Gráficos 6, 7, 8, 9 e 10.

As Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 mostram células em processo fagocítico, permitindo visualizar as partículas endocitadas.

DISCUSSÃO

A resposta imune é constituída de quatro componentes principais a resposta humoral por anticorpos; a celular, mediada por linfócitos T; a fagocítica, principalmente por macrófagos e PMN e a mediada pelas proteínas do sistema complemento.

Nos casos de pacientes com infecção de repetição, a indicação dos testes laboratoriais para investigação da resposta imune, é realizada de acordo com o tipo de infecção, que é um útil instrumento na diferenciação da imunodeficiência envolvida: otite média bacteriana recorrente e pneumonia são comuns na hipogamaglobulinemia; pacientes com deficiência de imunidade celular são susceptíveis a infecções fúngicas, virais e por protozoários; infecção sistêmica por bactérias oportunistas de baixa virulência e característica da doença granulomatosa crônica; outras desordens fagocíticas são associadas a infecções superficiais de pele ou sistêmica, por organismos piogênicos.

Portanto, um laboratório de apoio diagnóstico e monitoração de parâmetros imunológicos do paciente, deve realizar, em sua rotina, para triagem inicial, testes laboratoriais para dosagem de imunoglobulina G(IgG), IgA e IgM; contagem de linfócitos T totais, testes intradérmicos com antígenos infecciosos comuns; dosagem de complemento total (CH50), dos componentes, C3 e C4 e também com testes de verificação da atividade fagocítica.

Sendo o teste de atividade fagocítica, qualitativo, sofre variações de resultados em diferentes amostras de sangue periférico, havendo necessidade do uso concomitante de controle normal para comparação, em cada teste de paciente. É importante a praticidade de realização do mesmo para uma rotina laboratorial, o que motivou a realização deste trabalho de comparação de resultados de fagocitose para indicação da partícula mais adequada.

CONCLUSÃO

O uso da partícula Zymosan permite maior eficácia do ensaio fagocítico, sendo fagocitado por maior quantidade de células (77%), quando comparado à fagocitose das outras partículas: *C. albicans* (70%), *S. aureus* (59%), Micrococo (54%) e *E. coli* (52%) (Gráfico 1).

Dentre as 5 partículas indicadores de fagocitose utilizadas, o Zymosan apresentou maior nível de fagocitose por células, com valores de 50% de células fagocíticas que fagocitaram acima de 4 partículas (Gráfico 5).

Quanto à facilidade de visualização da fagocitose ao microscópio ótico, as partículas mais adequadas foram a *C. albicans* e o Zymosan.

Os dados permitem concluir que, dentre as partículas utilizadas neste estudo, o Zymosan constitui a partícula mais

indicada para a realização do ensaio fagocítico, na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Capson, F.; Bonara, P.; Minonzio, F. Ongari, A. M.; Colombo, G.; Rizzardi, G. P.; Zanussi, C. The effect of cytokines on human neutrophil Fc receptor - mediated phagocytosis. *J. Clin. Lab. Immunol.* 34(3):115-24, 1991.
2. Cohn, Z. A. The fate of bacteria within phagocytic cells. The degranulation of isotopically labelled bacteria by polymorphonuclear leucocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 117:27, 1963.
3. Fabian, I.; Kettler, Y.; Mor, S.; Geller-Bernstein, C.; Benyashov, M.; Velovitz, B. & Golde, D. W. Activation of human eosinophil and neutrophil function by haematopoietic growth factors: comparisons of IL-1, IL-3, IL-5 and Gm-CSF. *Brit. J. Haematol.* 80(2):137-43, 1992.
4. Forsgren, A.; Schmeling, D. & Zettervall, O. Quantitative phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes: use of radiolabelled emulsions to measure the rate of phagocytosis. *Immunology.* 32:491, 1977.
5. Gentle, T. A. & Thompson, R. A. Neutrophil function tests in clinical immunology. In: *Clinical Immunology a Practical Approach*. Edited by Gooli, H. C. & Chapel, H., Irl Press at Oxford University Press, pp. 51-79, 1990.
6. Lantero, S.; Oddera, S.; Silvestri, M.; Ottaline, V.; Socco, O.; Rossi, G. A. Thymomodulin enhances phagocytic and intracellular killing activities of polymorphonuclear leucocytes without increasing release of chemotactic factors. *Arch. Chest. Dis.* 48(1):29-33, 1993.
7. Michell, R. H.; Pancake, S. J.; Noseworth, J. & Karnovsky, M. L. Measurement of rates of phagocytosis: the use of cellular monolayers. *The Journal of cell biology.* 40:216, 1969.
8. Parry, M. F.; Root, R. K.; Metcay, J. A. Delaney, K. K.; Kaplow, L. S. S.; Richar, W. J. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern. Med.* 95:293-301, 1981.
9. Richardson, M. D.; Brownlie, C. E. & Shankland, G. S. Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by GM-CSF activated human neutrophils. *Journal Med. Vek. Mycol.* 30(6):43-41, 1992.
10. Rojas-Spinosa, O. Phagocytosis in Leprosy. 2: Production of superoxide by circulating blood leucocytes from lepromatous patients. *International Journal of Leprosy.* 46(4):337-341, 1978.
11. Sher, R.; Anderson, R.; Glover, A. & Wade, A. A. Polymorphonuclear cell function in the various polar types of Leprosy and Erythema Nodosum Leprosum. *Infection and Immunity.* 21(3):959-965, 1978.
12. Stossel, T. P.; Alper, C. A. & Rosen, F. S. Serum dependent phagocytosis of paraffin oil emulsified with bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 136:690, 1973.
13. Stossel, T. P. Phagocytosis. In: *Manual of Clinical Immunology*. 2ª Edition. Ed. Noel R. Rose. Detroit, Michigan, pp. 309-315, 1980.
14. Van-Strijp, J. A.; Van-Der-Tol, M. E.; Miltenburg, L. A.; Van-Kessel, K. P. & Verhoef, J. Tumour necrosis factor triggers granulocytes to internalize complement-coated virus particles. *Immunology.* 73(1):77-82, 1991.
15. Vindenes, H. & Bjerknes, R. Activation of polymorphonuclear neutrophilic granulocytes following burn injury: alteration of Fc-receptor and complement-receptor expression and of opsonophagocytosis. *J. Trauma.* 36(2):161-7, 1994.
16. Wade, B. H. & Mandell, G. L. Polymorphonuclear Leucocytes: dedicated professional phagocytes. *The American Journal of Medicine.* 74:686-693, 1983.
17. Wooley, W. R. & Di Luzio, N. R. The phagocytic and proliferative response of the reticuloendothelial system following glucan administration. *Journal of the Reticulo-endothelial Society.* 1:160-169, 1964.

Atividade da acetilcolinesterase de indivíduos não expostos a inseticidas fosforados*

Acetylcholinesterase activity of non exposed individuals to phosphored insecticides

Zelaine L. Silva,¹ Edna M. Alvarez-Leite,¹ André Luiz Carvalho,² Ismael M. F. Leite³ & Josianne N. Silveira¹

RESUMO – A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) tem sido utilizada no Brasil como biomarcador na monitorização da exposição ocupacional aos inseticidas organofosforados e carbamatos, conforme Portaria NR-7 do Ministério do Trabalho. Entretanto, poucos são os dados relacionados aos valores de referência deste biomarcador determinados no país. Para suprir em parte essa deficiência, o presente trabalho objetiva determinar os valores de referência da AChE em um grupo populacional, qual seja, indivíduos residentes na região metropolitana de Belo Horizonte. Foi estudada uma população de 83 pessoas, de ambos os sexos, com um total de 328 determinações da atividade da enzima no plasma e eritrócitos, pelo método eletrométrico de Michel (1949). Os valores médios de atividade enzimática, expressos como $\Delta pH/h$, foram os seguintes: atividade eritrocitária 0,81 e 0,74 (sexo masculino e feminino), atividade plasmática 0,69 e 0,68 sexo masculino e feminino.

PALAVRAS-CHAVE – Valor de referência, colinesterase plasmática, colinesterase eritocitária, acetilcolinesterase.

SUMMARY – The AChE inhibition has been used as an organophosphorus and carbamate pesticides biomarker of exposure in Brazil (NR-7, MT/Br). However, there are few Brazilian data about reference values of this biological indicator. The object of the study reported here was to determine these values in individuals who live in Belo Horizonte metropolitan area. A spectrophotometric method was validated (Michel, 1949) and applied to 83 both sex selected individuals in order to determine AChE activity in plasma and erythrocyte. The enzymatic activity determination expressed as $\Delta pH/h$ was 0.81 and 0.74 (male and female erythrocyte respectively) and 0.69 and 0.68 (male and female plasma respectively).

KEY WORDS – Reference values, plasma cholinesterase, erythrocyte cholinesterase, acetylcholinesterase.

INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 4 a 5 milhões de trabalhadores na agricultura estão direta ou indiretamente expostos a praguicidas e, portanto, sujeitos a intoxicação.^{7,31} No Brasil, a partir de 1950, os inseticidas organofosforados têm sido utilizados em escala crescente, principalmente nas grandes plantações de algodão. Os resultados obtidos do ponto de vista agrícola são bons, todavia é importante considerar o risco para a espécie humana, frente à elevada toxicidade destes produtos.

O paration etílico, por exemplo, um dos inseticidas mais utilizados na agricultura, possui significativa toxicidade para os mamíferos superiores, sendo o inseticida de maior envolvimento nos casos de intoxicações fatais por praguicidas.^{1,5,6,7,22,26,29} Outros fosforados de menor risco tóxico têm sido sintetizados e utilizados mas, por possuírem estruturas químicas semelhantes, apresentam mecanismos de ação idêntica, ou seja, inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).^{2,30,32,33}

A AChE é uma enzima encontrada nas sinapses do sistema nervoso central (SNC), ao nível da junção neuromuscular e nos eritrócitos, sendo responsável pela metabolização do neurotransmissor acetilcolina.^{25,34} Uma vez inibida a AChE, haverá um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica desencadeando o aparecimento de sintomas decorrentes da estimulação do sistema parassimpático (síndrome muscarínica), da estimulação dos gânglios do sistema vegetativo e das terminações nervosas motoras (síndrome nicotínica) e do acúmulo da acetilcolina no SNC. A gravidade destes sintomas depende não só da intensidade

de da inibição enzimática, mas também da intensidade da exposição aos inseticidas fosforados.^{23,24,32}

A análise da atividade da acetilcolinesterase no sangue vem sendo utilizada há mais de trinta anos para monitorização da exposição ocupacional a inseticidas organofosforados e carbamatos.^{3,4,16,28}

Vários estudos têm demonstrado que as determinações da atividade da colinesterase eritrocitária e plasmática devem ser realizadas em paralelo, uma vez que podem estar inibidas diferentemente. A colinesterase plasmática é afetada mais rapidamente e reflete melhor a exposição a esses inseticidas, sendo sua determinação bastante significativa no início da exposição por ser regenerada mais prontamente. A colinesterase eritrocitária, por sua vez, é afetada mais tardiamente e reflete o estado de inibição da enzima do SNC e por isso reflete melhor os efeitos de uma intoxicação.^{10,27,28}

A legislação brasileira, através da NR-7 do Ministério do Trabalho recomenda a determinação da atividade da AChE como biomarcador da exposição a estes inseticidas⁵ e estipula como valor do índice biológico máximo permitido (IBMP) no caso da exposição aos inseticidas organofosforados, 30% de inibição da atividade inicial da AChE eritrocitária e 50% de inibição da atividade inicial da AChE plasmática. A inibição desta enzima, em trabalhadores expostos diariamente, reflete o efeito acumulativo de várias exposições, representando boa correlação, tanto com o nível de exposição quanto com os efeitos tóxicos.¹⁶ Uma vez que nem sempre é possível estabelecer o valor da atividade inicial da enzima, é de vital importância conhecer ao menos o valor de referência na população de uma

Recebido em 03/06/96

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da UFMG

* Trabalho subvencionado pela Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq/UFMG)

Apresentado no XXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, Recife, Novembro de 1995

¹ Professores do Setor de Toxicologia, Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG

² Bolsista BIC-FAPEMIG

³ Bolsista BIC-CNPq

determinada região, considerando que diversos fatores podem influenciar na atividade dessa enzima.^{6,7,8,9}

Diferenças individuais têm sido encontradas na atividade enzimática, especialmente em indivíduos não expostos ocupacionalmente aos inseticidas. Diversas são as possíveis causas dessas variações: estados patológicos como cirrose, hepatite, câncer de fígado, enfarto do miocárdio, anemia, desnutrição, infecções. Também a ação de substâncias químicas como fluoretos, citratos, oxalatos, fenotiazínicos, antibióticos, atropina, codeína, barbitúricos. Variáveis individuais como raça, sexo e idade também podem influenciar na atividade da enzima.^{10,11,12,13}

Portanto, existe grande interesse em se obter conhecimento dos valores basais da atividade da AChE em grupos populacionais brasileiros não expostos ocupacionalmente aos fosforados, dados esses que servirão de subsídio para a adequada realização da monitorização biológica da exposição ocupacional a estes inseticidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram selecionados para o trabalho 83 indivíduos residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, sendo 47 do sexo feminino. Esses indivíduos respondiam, no momento da coleta da amostra biológica, um produto toxicológico que objetivou a obtenção de mais informações individuais. Amostras de sangue dos indivíduos foram coletadas em tubos *vacutainer* contendo heparina como anticoagulante. Em cada amostra separou-se cuidadosamente, de modo a evitar hemólise, o plasma das células vermelhas, sendo então determinada, em duplicata, a atividade da acetilcolinesterase plasmática e eritrocitária. No total foram realizadas 328 determinações analíticas.

As amostras foram analisadas no tempo zero e o restante delas guardadas sob refrigeração (4°C) por 72 horas e, após esse período, a atividade da enzima foi novamente medida para avaliar a estabilidade enzimática neste intervalo de tempo.

Método

Embora existam citados na literatura vários trabalhos referentes à determinação da atividade da AChE,^{14,15,16,17} optou-se por utilizar o método eletrométrico de Michel (1949)¹⁸ por ser um método sensível, de baixo custo e fácil execução, além de permitir a realização de várias amostras simultaneamente. Além disso, este método possibilita a determinação da atividade da colinesterase plasmática e eritrocitária. O fundamento do método baseia-se na medida da produção de ácido resultante da ação da acetilcolinesterase sobre um substrato padrão de acetilcolina, em meio tamponado. O ácido formado em um tempo preestabelecido será determinado em termos da mudança de pH.

RESULTADOS

Os resultados analíticos classificados em função do sexo encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Os dados analíticos foram submetidos a tratamento estatístico e os resultados utilizados para a obtenção da faixa de valor de referência e do intervalo de incerteza conforme preconizado por Minoia *et al.*¹⁹ todos eles apresentados na Tabela 3. Na Figura 1 está representado o histograma com os valores médios das atividades da AChE plasmática e eritrocitária, para uma melhor visualização dos resultados. Os dados referentes ao estudo da estabilidade enzimática foram tratados estatisticamente através do Teste t de Student. Os resultados de $\Delta\text{pH/h}$ plasmático e eritrocitário, sexos masculino e feminino, apresentaram T calculado < T tabelado, indicando que as diferenças das atividades neste intervalo de tempo não são significativas ao nível de $p < 0,05$.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os valores médios da atividade de AChE no plasma – 0,69 e 0,67 – e no eritrócito – 0,74 e 0,83 –, expressos em $\Delta\text{pH/h}$, respectivamente, em indivíduos do sexo feminino e masculino na população estudada, apresentam-se semelhantes aos encontrados por Michel¹⁹ – 0,70 e 0,75 $\Delta\text{pH/h}$ no plasma e eritrócito respectivamente. Vários outros autores têm encontrado valores um pouco diferentes dos encontrados por Michel,¹⁹ indicando que existe variações na amplitude e faixa do valor de referência de atividade enzimática.^{8,9,14,28,30,31} Pelo fato de a enzima ser rapidamente inibida por inseticidas organofosforados e carbamatos, é importante que se utilize um método simples e rápido para a determinação da atividade da enzima AChE plasmática. Contudo, devido à variação nos valores de referência da atividade enzimática encontrada na literatura, torna-se difícil afirmar se a enzima está de fato inibida ou avaliar seu grau de inibição.

TABELA 1
Atividade da AChE plasmática e eritrocitária em amostras obtidas de indivíduos do sexo feminino, expressas com $\Delta\text{pH/h}^*$

Amostras	Plasma	Eritrócito	Amostras	Plasma	Eritrócito
1	0,72	0,93	25	0,80	-**
2	0,46	0,79	26	0,72	0,79
3	0,68	0,79	27	0,66	0,89
4	0,63	0,53	28	0,76	0,63
5	0,58	0,70	29	0,72	0,80
6	0,70	0,68	30	0,66	0,89
7	0,75	0,69	31	0,75	0,80
8	0,67	0,72	32	0,70	0,92
9	0,70	0,59	33	0,67	0,98
10	0,68	0,69	34	0,75	-**
11	0,71	0,82	35	0,58	0,76
12	0,60	-**	36	0,61	0,93
13	0,84	0,67	37	0,63	0,67
14	0,61	0,68	38	0,69	0,62
15	0,63	0,92	39	0,71	0,64
16	0,62	0,70	40	0,59	-**
17	0,72	0,98	41	0,65	0,67
18	0,75	0,89	42	0,72	-**
19	0,79	0,89	43	0,69	0,72
20	0,81	0,50	44	0,71	-**
21	0,69	0,67	45	0,66	0,63
22	0,74	0,68	46	0,72	0,65
23	0,66	0,50	47	0,58	0,67
24	0,81	0,53			

*Análises realizadas em duplicata

**Ocorrência de hemólise

TABELA 2
Atividade de AChE plasmática e eritrocitária em amostras obtidas de indivíduos do sexo masculino, expressas como $\Delta\text{pH/h}$

Amostras	Plasma	Eritrócito	Amostras	Plasma	Eritrócito
1	0,71	1,14	19	0,49	0,92
2	0,80	0,92	20	0,77	0,94
3	0,63	1,24	21	0,63	-**
4	0,72	1,04	22	0,61	0,93
5	0,63	0,76	23	0,72	0,86
6	0,63	0,79	24	0,57	0,91
7	0,57	-**	25	0,49	0,93
8	0,92	0,79	26	0,86	-**
9	0,49	0,60	27	0,81	0,71
10	0,71	0,59	28	0,83	0,72
11	0,56	-**	29	0,76	0,77
12	0,53	0,91	30	0,62	0,86
13	0,80	0,77	31	0,59	0,79
14	0,49	0,84	32	0,58	0,84
15	0,86	-**	33	0,64	-**
16	0,48	0,84	34	0,73	0,70
17	0,88	0,63	35	0,59	0,77
18	0,60	-**			

*Análises realizadas em duplicata

**Ocorrência de hemólise

De acordo com Coye (1986),³¹a variação intraindividual da atividade da colinesterase eritrocitária e plasmática pode variar em 10% e 14,4%, respectivamente. Isto demonstra a dificuldade de se estabelecer um valor de referência que possa ser aplicado para qualquer tipo de população. O ideal seria ter conhecimento individual da atividade da enzima antes do início da exposição. Este dado é de difícil acesso, o que leva o clínico a utilizar valores de referência de outras populações.

O presente trabalho utilizou os critérios adotados por Minoia *et al* (1990)¹⁹ para a determinação da faixa de valor de referência e faixa de "valores de incerteza", ou seja, valores experimentais que podem estar alterados em função de fatores patológicos ou metabólicos individuais. Pela Tabela 3, pode-se observar que não existe diferença entre os valores das duas faixas citadas, no caso da AChE eritrocitária no grupo do sexo feminino e da AChE plasmática no grupo do sexo masculino.

A realização da monitorização biológica da exposição ocupacional aos inseticidas fosforados em trabalhadores rurais depende das condições de transporte e do tempo em que as amostras biológicas chegarão do campo até ao laboratório. É importante, portanto, ter conhecimento do tempo e das condições de temperatura em que a enzima permanece estável após a coleta da amostra. Os resultados do presente trabalho mostraram que a AChE mantém-se estável a 4°C durante um período de 72 horas após a coleta da amostra. É importante também que o plasma seja previamente separado do eritrócito e ambos armazenados sob refrigeração a 4°C para evitar a hemólise.

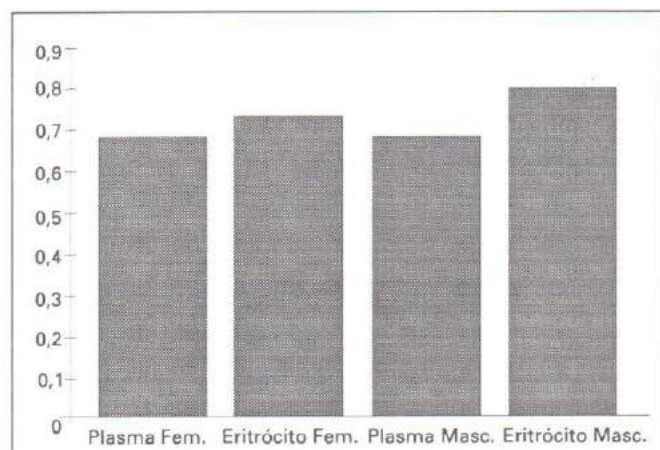


Fig. 1 - Média dos valores da AChE no plasma e eritrócito de ambos os sexos.

TABELA 3
Estudo estatístico dos resultados analíticos referentes à atividade da AChE, expressa em ΔpH/h

	Sexo feminino		Sexo masculino	
	plasma	eritrócito	plasma	eritrócito
$\bar{X}$	0,69	0,74	0,67	0,83
E%	18%	20%	22%	20%
DP	0,073	0,13	0,13	0,15
FE	0,46 - 0,84	0,50 - 0,98	0,49 - 0,92	0,59 - 1,24
VR	0,53 - 0,83	0,50 - 1,0	0,49 - 0,93	0,63 - 1,03
FI	0,83 - 0,84	-	-	1,03 - 1,24
$\bar{X} \pm 1DP$	0,52 - 0,76	0,61 - 0,87	0,54 - 0,80	0,68 - 0,98

$\bar{X}$ - média aritmética
FE - faixa experimental
FI - faixa de valores de incerteza

E% - porcentagem de erro

DP - desvio padrão
VR - faixa de valor de referência
 $\bar{X} \pm 1DP$ - dispersão da média

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Spigiel, R. O.; Gourley D. R. Organophosphate pesticide exposure in farmers and commercial applicators. *Clin. Toxicol. Consult.*, v. 3, p. 45-50, 1981.
- Nachmansohn, D.; Wilson, I. B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *J. Biol. Chem.*, v. 158, p. 259-85, 1982.
- Ridder, J. A.; Hodges, J. L. Plasma and red cell cholinesterase activity. *Clin. Chem.*, v. 11, p. 653-63, 1957.
- Gage, J. C. The significance of blood cholinesterase activity measurements. *Res. Rev.*, v. 187, p. 159-73, 1967.
- Brasil, Ministério do Trabalho. Seção de Relação do Trabalho. Portaria nº 24, de 29 de Dez. 1994. *Diário Oficial*, 30 dez. 1994, Seção 1, p. 21278.
- Knaak, J. B.; Madd, Y. Cholinesterase activity in blood samples collected from field workers and nonfield workers in California. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 45, p. 755-70, 1978.
- Molly, J. C.; John A. L.; Keith T. M. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides I. Cholinesterase Activity Determinations. *J. Occup. Med.*, v. 28, n° 8, 619-27, 1986.
- Siqueira, M. E. P. B.; Fernicola, N. A. G. G. de; Borges, E. L.; Determinação de níveis normais de colinesterase plasmática e eritrocitária. *Rev. Saúde Pública*, v. 12, p. 340-4, 1978.
- Wolfsie, J. H.; Winter, B. S. Statistical analysis of normal human red blood cell and plasma cholinesterase activity values. *Ind. Hyg. and Occup. Med.*, v. 40, p. 43-9, 1983.
- Mason, H. J.; Waine, E. Aging and spontaneous reactivation of human plasma cholinesterase activity after inhibition by organophosphorus pesticides. *Human & Exp. Toxicol.*, v. 12, p. 497-503, 1993.
- Galbraith, D. A.; Watts, D. C. Human erythrocyte acetylcholinesterase in relation to cell age. *Biochem. J.*, v. 195, p. 221-28, 1981.
- Shanon, S. P.; Van Hess, G. R. The influence of age and sex human plasma and red cell cholinesterase. *Am. J. Med. Sci.*, v. 2, p. 242:357, 1961.
- Yager, J.; McLean, H. Hudes, M. Components of variability in blood cholinesterase assay results. *J. Occup. Med.*, vol. 18, p. 14-24, 1976.
- Caraway, W. T. Photometric determination of serum cholinesterase activity. *Am. J. Clin. Path.*, v. 26, p. 945-955, 1956.
- Ellman, G. L. & Courtney, K. D. A. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, p. 88-94, 1961.
- Hackathorn, D. R.; Brinkman, W. J. Validation of a whole blood method for cholinesterase monitoring. *Am. Ind. Assoc. J.*, v. 44, n.7, p. 547-51, 1983.
- Reinhold, J. G.; Tourigny, I. G. Measurement of serum cholinesterase activity by a photometric indicator method, together with a study of the influence of sex and race. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 23, p. 645-53, 1953.
- Michel, H. O. An electronic method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 34, p. 1564-68, 1949.
- Minoia, C.; Sabbioni, E.; Apostoli, P.; Pietra, R.; Pozzoli, L.; Gallorini, M.; Nicolaou, G.; Alessio, L.; Capodaglio, E. Trace elements reference values in tissue from inhabitants of the European community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci. of Total. Env.*, v. 95, p. 89-105, 1990.
- Rhyaen, R.; Liesivour, J.; Narhi, M.; Puhakaten, E.; Hanninen, O. Blood cholinesterase activities of flower garden workers after exposure to organophosphates. *Bull. Env. Contam. Toxicol.*, v. 32, p. 251-258, 1994.
- Long, K. R. Cholinesterase activity as biological indicator of exposure to pesticides. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, v. 36, p. 75-86, 1975.
- Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Batista, G. C.; Yokoyama, M.; Degasperini, N.; Marchini, L. C. *Manual de inseticidas*. Ed. Agronômica CERES Ltda. São Paulo, 1977.
- Namba, T.; Nolte, C. T.; Jackiel, J.; Grod, D. Poisoning due to organophosphates and insecticides (acute and chronic manifestations). *Am. J. Med.*, v. 50, p. 475-492, 1971.
- Namba, T. Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull. Hlth. Org.*, v. 44, p. 289-307, 1971.
- Larini, L. *Toxicologia dos inseticidas*. Sarvier: São Paulo, 172p., 1079.
- Kay, K. Environmental toxicology in industry and agriculture. *Arch. Environm. Health*, v. 8, p. 681-699, 1964.
- Wu, Y. Q.; Wang, J. D. Occupational risk of decreased plasma cholinesterase among pesticide workers in Taiwan. *Amer. J. Ind. Med.*, v. 16, p. 659-666.
- Oliveira, G. H.; Salgado, P. E. T.; Lepera, I. S.; Larini, L. Comparação de dois métodos para determinação da atividade da colinesterase plasmática. *Rev. Bras. Saúde*, v. 19, p. 36-42, 1974.
- Murphy, S. D. *Casaret and Doull's toxicology. The basic science of poisons*. 3rd. ed. MacMillan Publishing Company, New York, p. 519-581, 1986.
- Pickering, C. E.; Pickering, R. G. Method for estimation of acetylcholinesterase activity in the plasma and brain of laboratory animals given carbamates or organophosphorus compounds. *Arch. Toxicol.*, v. 27, p. 292-310, 1971.
- Coye, M. J.; Lowe, J. A.; Maddy, K. T. Biological monitoring of agricultural exposed to pesticides: I cholinesterase activity determination. *J. Occup. Med.*, v. 28, p. 619-627, 1986.
- Hawn, T.; Ruhnke, M.; Lupp, H. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by the organophosphorus insecticide methylparathion in the central nervous system of the golden hamster. *Acta Histochem.* 91(1):p.13-19, 1991.
- Datta, C Gupta, J.; Sengupta, D. Interaction of organophosphorus insecticides phosphamidon and malathion on lipid profile and acetylcholinesterase activity in human erythrocyte membrane. *Indian J. Med. Res.*, v. 100, p. 87-89, 1994.
- Dvergsten, C.; Meeker, R. B. Muscarinic cholinergic receptor regulation and acetylcholinesterase inhibition in response to insecticide exposure during development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12(1) 63:75, 1994.
- Baron, R. L. A carbamate insecticide: a study of aldicarb. *Environm. Health. Perspect.*, v. 102, p. 11-25, 1994.

Recomendações para coleta, transporte e armazenamento de sangue total, para determinações simultâneas de pH, gases arteriais e eletrólitos*

Recommendations on whole blood sampling, transport, and storage for simultaneous determination of pH, blood gases, and electrolytes

R.W. Burnett, A.K. Covington, N. Fogh-Andersen, W.R. Külpman, A.H.J. Mass, O. Müller-Plathe, O. Siggaard-Andersen, A.L. Van Kessel, P.D. Wimberley & W.G. Zijlstra

RESUMO – As variáveis pré-analíticas: coleta, transporte e armazenamento, podem contribuir significativamente para a imprecisão dos valores de pH, gasometria e eletrólitos. A *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*, através de seus Comitês em pH, Gases Arteriais e Eletrólitos, tem publicado recomendações específicas com o intuito de minimizar os efeitos indesejáveis das variáveis pré-analíticas. Estes Comitês se basearam nas experiências de seus próprios membros, como também em artigos publicados por outros. Especificamente, os Comitês têm incluído rotinas e sugestões confeccionadas pelos: *IFCC Working Group on Selective Electrodes (WGSE)*, *National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, *Electrolyte/Blood Gas Division of the American Association for Clinical Chemistry (AACC)*. Este artigo irá familiarizar o leitor com os efeitos de diferentes tipos de frascos e anticoagulantes. Também serão discutidos aspectos importantes dos procedimentos de coleta, incluindo o estado do paciente e as precauções especiais a serem tomadas quando utilizam-se cateteres ou cânulas para a coleta. Serão vistos também as diferentes normas para o armazenamento e transporte das amostras, para as análises gasométrica e eletrolítica.

PALAVRAS-CHAVE – Sangue; pH; gases arteriais; eletrólitos; coleta; transporte e armazenamento.

SUMMARY – Pre-analytical variables, e.g., specimen collection, transport, and storage, can contribute significantly to inaccurate pH, blood gas, and electrolyte values. The *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*, through its Committee on pH, Blood Gases and Electrolytes, has developed specific recommendations to minimize the undesirable effects of pre-analytical variables. The Committee has drawn upon the experiences of its own members as well as published data by others. Specifically, the Committee has included pertinent guidelines and suggestions by the *IFCC Working Group on Selective Electrodes (WGSE)*, the *National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, and the *Electrolyte/Blood Gas Division of the American Association for Clinical Chemistry (AACC)*. This paper will familiarize the reader with the effect of different types of specimen containers and anticoagulants. It discusses important aspects of specimen collection procedures including patient status and special precautions during specimen collection from indwelling catheters or cannulae. The paper also identifies different requirements in storage and transport of specimens for blood gas and electrolyte analysis.

KEY WORDS – Blood; gas; pH; electrolytes; collection; transport and storage.

TÓPICOS

- 1 Introdução
- 2 Frascos
 - 2.1 Frascos de vidro
 - 2.2 Frascos de plástico
 - 2.3 Recomendações práticas
- 3 Anticoagulantes
 - 3.1 Interferências causadas pela heparina
 - 3.2 Concentrações adequadas de heparina
 - 3.3 Efeitos da diluição
- 4 Coleta das amostras
 - 4.1 Estado do paciente
 - 4.2 Normas gerais para a coleta
 - 4.3 Coleta de sangue com seringa
 - 4.3.1 Tipos de amostras
 - 4.3.2 Procedimentos de coleta
 - 4.4 Coleta de sangue por tubos capilares
 - 4.4.1 Coleta de sangue por micro-punção cutânea
 - 4.4.2 Procedimentos de coleta
- 5 Armazenamento e transporte
 - 5.1 Alterações durante o armazenamento e transporte
 - 5.1.1 Metabolismo das células sanguíneas
 - 5.1.2 Liberação do íons das células sanguíneas
 - 5.1.3 Escape dos gases
 - 5.2 Procedimentos recomendados para armazenamento
- 6 Homogeneização da amostra antes da dosagem
- 7 Referências

1 INTRODUÇÃO

Desenvolvimentos técnicos recentes têm tornado possível determinar valores de gases arteriais, pH, eletrólitos, saturação de oxigênio, derivados da hemoglobina e o hematócrito, diretamente de uma única amostra sanguínea.

Cada um destes valores é importante para o controle das funções vitais do organismo e para a supervisão terapêutica em situações críticas. Devido à rapidez com que estes valores mudam, os resultados devem estar disponíveis no menor prazo possível. Este objetivo pode ser alcançado por determinações simultâneas em sangue total, sem centrifugação ou etapas de diluição.

Nos procedimentos pré-analíticos, os resultados podem ser alterados principalmente pelo(a):

- tipo de frasco;
- preparação dos anticoagulantes dos frascos (tanto pelos efeitos anticoagulantes propriamente ditos como pelas diluições);
- técnica de coleta das amostras;
- armazenamento e transporte das amostras.

O objetivo deste artigo é recomendar métodos de coleta e armazenamento apropriados para gases, pH e eletrólitos (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} atual, Cl^-)¹, além de permitir que sejam determinadas

* Tradução de Fernando de Carvalho Corrêa, supervisionado e revisado por José Abol Corrêa

¹ Federação Internacional de Química Clínica-IFCC – Divisão Científica, Comitê em pH, gases arteriais e eletrólitos

as concentrações da hemoglobina total ou do hematócrito, e de derivados da hemoglobina; que são frequentemente analisados em conjunto com a gasometria.

2 FRASCOS

O sangue é coletado tanto em seringas como também em tubos capilares. Os frascos utilizados podem ser feitos de vidro ou plástico.

2.1 - Frascos de vidro

O vidro pode ser considerado um material impermeável aos gases. Assim sendo, as seringas de vidro e tubos capilares são úteis na coleta, armazenamento e transporte de amostras para as análises gasométrica e eletrolítica. Uma seringa de vidro bem vedada e com um êmbolo bem ajustado pode ser considerada gás-impermeável por no mínimo 2 (duas) horas. O mesmo pode ser estabelecido para os tubos capilares de vidro.²

2.2 Frascos de plástico

Os frascos de plástico, sendo permeáveis aos gases, não podem ser considerados como perfeitamente gás-impermeáveis.^{3,5} Isto pode causar um desvio dos valores originais de pO_2 e de pCO_2 em direção aos encontrados nas imediações do frasco.^{5,7} O grau deste desvio é dependente do material e do tipo da seringa (espessura da parede, relação superfície/volume, ajuste do êmbolo e da vedação).

A pO_2 pode se deslocar em diferentes direções, dependendo do gradiente entre a pO_2 sanguínea e o da atmosférica. Quando analisam-se amostras sanguíneas em seringas de plástico colocadas em água com gelo, encontra-se, experimentalmente, que os valores originais da pO_2 em torno de 12 kPa (88mmHg) se elevam, após 45 minutos, de 0, 13-1, 20 kPa (1-9mmHg); sendo que a maioria das alterações, ocorre, principalmente, nos primeiros 20 minutos.^{8,9} Não ocorrem alterações significativas nos valores da pCO_2 nos primeiros 30 minutos de armazenamento em água com gelo.^{5,8}

2.3 Recomendações práticas

Seringas plásticas com êmbolos bem ajustados e corretamente vedadas são de utilidade para determinações do equilíbrio ácido-básico (pH, pCO_2 , bicarbonato, excesso de base) e eletrólitos (sódio, potássio, cloro, cálcio ionizado) quando o tempo de estocagem não for maior do que 30 minutos. Estas seringas, para determinações de pO_2 e saturação de O_2 , somente podem ser usadas se a dosagem for executada no máximo dentro de 15 minutos. Acima deste tempo, os resultados sairão errados. O tamanho do erro pode ser determinado antes da dosagem. Se são esperados valores de pO_2 maiores que 27 kPa (200mmHg), recomenda-se o uso de seringas de vidro.

3 ANTICOAGULANTES

O anticoagulante recomendado para as determinações de gasometria e eletrólitos é a heparina. Os sais de sódio e lítio podem ser utilizados mas, para que não ocorra uma variabilidade nas medições dos eletrólitos, precauções adicionais devem ser tomadas.

3.1 Interferências causadas pela heparina

As seguintes alterações ocorrem quando se misturam heparina sódica seca com uma amostra sanguínea:

a) Aumento da concentração de sódio. Até uma concentração de 15 UI de heparina sódica por mililitro de sangue não ocorrem modificações detectáveis nos valores de sódio.¹⁰

Concentrações maiores alteram os valores de sódio, a não ser que se use o sal heparinato de lítio como agente anticoagulante.

b) Diminuição do pH, bicarbonato e excesso de base. Até uma concentração de 50 UI de heparina sódica por mililitro de sangue estes efeitos são insignificantes. Aumentos de 100 UI de heparina por mililitro irão causar as seguintes alterações:^{11,12}

pH	0 até - 0,004
$CHCO_3^-$	0 até - 0,3mmol/L
BE	0 até - 0,3mmol/L

c) Decréscimo do cálcio ionizado. O cálcio ionizado é ligado à heparina por quelação. Até 4 UI de heparinato por mililitro de sangue a diminuição é menor que 0,01mmol/L. Já aumentos de 100 UI de heparinato por mililitro de sangue causam uma queda dos valores de aproximadamente 0,13mmol/L.¹³

3.2 Concentrações adequadas de heparina

Devido às interferências nos resultados citados no tópico anterior, a concentração de heparina deve ser mantida a menor possível. Na prática, frequentemente observamos seu uso em concentrações muito maiores que a necessária para uma anticoagulação adequada.^{14,15} A quantidade ideal depende de:

a) Se a heparina for seca ou líquida. Devido ao maior tempo necessário para que a heparina seca se dissolva e se distribua na amostra, logo exercendo sua ação, a quantidade desta deve ser maior do que se ela fosse líquida.

b) Se os frascos são de plástico ou vidro. Os frascos de vidro requerem uma quantidade maior de heparina para compensar o fato de que os fatores de coagulação e plaquetas são ativados mais rapidamente neste tipo de superfície.¹³

As concentrações recomendadas de heparina são as seguintes:

Frasco	Tipo	[Heparina] conc. no sangue
Vidro	Heparina seca	40-60 UI/mL
Vidro	Heparina líquida	8-12 UI/mL
Plástico	Heparina seca	12-50 UI/mL*
Plástico	Heparina líquida	4-6 UI/mL

Se são utilizadas nas amostras concentrações maiores que 15 UI/mL, o uso de heparinato de lítio-cálcio titulado é recomendado para compensar a quelação do cálcio e para possíveis elevações nos valores de sódio.¹³ Se a heparina seca é usada, deve-se ter certeza que, no preparo da amostra, esta esteja completamente dissolvida e distribuída rapidamente através da amostra.

3.3 Efeitos da diluição

Se for utilizada a heparina líquida, a amostra ficará diluída. As concentrações de eletrólitos, bicarbonato, CO_2 , hemoglobina e outros elementos estarão diminuídas. A pO_2 e a sO_2 , na maioria dos casos, estarão aumentadas, porque a pO_2 da solução de heparina utilizada se encontra em torno de 150 mmHg. Como medida para diminuir os possíveis desvios, o espaço morto da seringa nunca deve exceder 5% do volume sanguíneo a ser colhido.

Os efeitos de uma diluição de 5% nos valores gasométricos e parâmetros ácido-básicos são, de forma prática, toleráveis.^{14,16} Para um sangue arterial "normal", as variações aproximadas podem ser calculadas como se segue:

* A quantidade de heparina necessária é totalmente dependente de como a heparina é distribuída na amostra.

pH	0
pCO ₂	- 0,27 kPa (- 2,0 mmHg)
cHCO ₃ e BE	- 1,2 mmol/L
pO ₂	+0,53 kPa (+4,0 mmHg)

Devido à diluição da amostra, predominantemente aplicada à fase plasmática, resulta uma diluição de 5% nos eletrólitos, portanto, é significativa, especialmente para a concentração de Na e Ca ionizado, já que seus valores de referência são de uma faixa bastante estreita. Então, para medições simultâneas de gases e eletrólitos, é recomendado a utilização de uma solução de heparina respeitando as concentrações mostradas no tópico 3.2., e que adicionalmente compense o efeito da diluição nos eletrólitos.

As seguintes faixas de concentrações são recomendadas para as amostras com heparina líquida:

Sódio	120,0 - 150,0 mmol/L
Potássio	3,5 - 4,5 mmol/L
Cálcio ionizado	1,2 - 1,4 mmol/L
Cloreto	100,0 - 130,0 mmol/L

A solução não pode conter nenhum ânion ligável ao cálcio (ex.: bicarbonato, fosfato, sulfato). Não há, no sangue, cálcio ligado detectável pelo formiato acima de 40mmol/L. Logo, o formiato pode ser utilizado com a finalidade de compor soluções de heparina "eletroliticamente balanceadas".¹³ O pH de uma solução de heparina deve ser de 6,0-8,0.

4 COLETA DAS AMOSTRAS

4.1 Estado do paciente

Para a realização da gasometria arterial, o paciente deve encontrar-se em seu estado basal de ventilação antes e durante a coleta do sangue; logo estando em respiração espontânea e em repouso por 15 (quinze) minutos. Os ajustes ventilatórios em pacientes submetidos a respiração artificial devem permanecer inalterados, se possível, por um período de 30 minutos antes da coleta do sangue. O mesmo se aplica para pacientes recebendo suplementação com oxigênio.

A dor e a ansiedade devem ser minimizadas, já que o procedimento de punção pode influenciar o estado basal respiratório do paciente. Se houver necessidade, os anestésicos locais devem ser utilizados.

4.2 Normas gerais para a coleta

Para a gasometria e análise de eletrólitos, o sangue deve ser coletado a partir de seringas ou de tubos capilares. Independente da maneira de coletar, as seguintes exigências devem ser cumpridas plenamente:

a) O sangue deve ser retirado e manipulado sem entrar em contato com o ar ("anaerobicamente"), para manter as tensões gasosas, a saturação de oxigênio, pH e a concentração de cálcio ionizado inalterados.

b) As amostras devem ser imediatamente anticoaguláveis, com a finalidade de evitar a formação de coágulos que possam obstruir os instrumentos de análise. Os danos às células (hemólise) devem ser evitados o máximo possível, já que podem ocasionar um aumento do potássio e diminuição do cálcio ionizado.^{17,18}

c) Se catéteres ou cânulas são utilizadas para coleta, deve-se estar certo que outras soluções tenham sido retiradas completamente da luz do sistema. Para resolver este problema procede-se retirando, anteriormente à coleta da amostra, um volume de sangue três vezes o equivalente do "espaço morto" do cateter.¹⁹

4.3 Coleta de sangue com seringa

O sangue pode ser coletado com seringa tanto pelo sistema arterial como pelo venoso.

4.3.1 - Tipo de amostras: Uma amostra obtida a partir de sangue arterial pode refletir como estão as funções de trocas gasosas pulmonares e o equilíbrio ácido-básico corporal; podendo também ser útil para a determinação de eletrólitos, hemoglobina e hematócrito. Os sítios preferenciais para coleta de sangue arterial no corpo são as artérias radial, braquial e femoral. Artérias do couro cabeludo de crianças, visíveis a olho nu, assim como a cateterização da artéria umbilical na neonatologia, podem servir como locais de retirada do sangue arterial.

Quando houver a necessidade de coletas repetidas, recomenda-se a canulação arterial. As gasometrias do sangue venoso-misto, de amostras preferencialmente obtidas na artéria pulmonar, são úteis para a análise da extração do oxigênio arterial, assim como sua captação pelo organismo. Para isto são importantes as determinações de pO₂ do sangue venoso misto e a diferença artério-venosa da concentração de oxigênio, ou seja, a cO₂(a) - cO₂(v).

Previamente à coleta do sangue venoso-misto, retira-se o fluido de infusão residual do interior do cateter. É importante também que este não esteja na posição "wedge" e que a amostra sangüínea seja retirada lentamente (aproximadamente 1mL a cada 5 segundos), para que não haja uma sucção de sangue oxigenado dos capilares pulmonares.

Quando houver necessidade de se calcular o "shunt", deve-se colher sangue também do sistema arterial e venoso. O sangue venoso periférico, como o colhido na veia cubital, não deve ser utilizado para a medição da pO₂ e sO₂ porque os resultados não são representativos para o corpo como um todo, só devendo ser usado para determinações de eletrólitos, bicarbonato, excesso de base, hemoglobina e hematócrito.

Para as determinações do cálcio ionizado, bicarbonato e excesso de base torna-se necessário que a amostra de sangue venoso seja colhida anaerobicamente. O uso de torniquete não pode exceder o período máximo de 2 minutos, e a atividade muscular em excesso deve ser evitada.

4.3.2 Procedimentos de coleta: Para preencher o espaço morto da seringa com heparina, 0,3-0,5 mL da solução anticoagulante é aspirada de forma que lubrifique a totalidade da parede interna. A agulha utilizada para a aspiração é substituída pela cânula de punção. Com a agulha virada para cima o ar é expelido e, em seguida, invertendo a seringa, o excesso de anticoagulante é retirado. É recomendado que o volume de sangue coletado seja, no mínimo, 20 vezes o do espaço morto.

A técnica e os riscos da punção arterial são descritos em vários livros-texto de anestesiologia, terapia intensiva e pneumologia. Uma rotina aprovada têm sido publicada pela NCCLS.¹⁹ Imediatamente após a coleta, a amostra é checada para a presença de bolhas de ar, as quais têm de ser expelidas imediatamente.²⁰⁻²² A agulha é substituída por uma tampa bem ajustada. É importante que a agulha desprezada tenha destino seguro. Para garantir que o anticoagulante se distribua adequadamente pela amostra, a seringa é invertida por 5 vezes e rodada entre as palmas das mãos por 5 segundos, antes da análise ou armazenamento em água com gelo. As amostras devem ser apropriadamente identificadas com os seguintes dados: nome do paciente, data, hora da coleta, sítio de punção e tipo de amostra.

Recentemente, têm sido confeccionados tipos de seringas plásticas com heparina seca ou líquida, que são preenchidas pela pressão arterial e que têm saídas para o ar localizadas no êmbolo ou ao lado dele. As instruções do fabricante, assim como as recomendações contidas neste artigo acerca de seringas plásticas, devem ser seguidas (veja o tópico 2.2).

4.4 Coleta de sangue com tubos capilares

Os tubos capilares heparinizados são normalmente utilizados para coleta de sangue via punção cutânea. Tal procedimento é rotineiramente realizado em neonatos e crianças pré-escolares, podendo também ser aplicado em adultos (pacientes ambulatoriais, medicina esportiva, medicina industrial).

4.4.1 Coleta de sangue por micropunção cutânea: O sangue pode ser colhido nas regiões plantar, mais especificamente nas bordas lateral ou medial próximas ao calcâneo; palmar, nas extremidades distais dos dedos; ou no lóbulo da orelha. Ao contrário do arterial, o sangue originado desta modalidade de coleta é uma mistura de sangue arterial, venular, de capilares e de pequenas quantidades de líquidos intersticial e intracelular. Por causa da pressão arterial, a proporção de sangue arteriolar e da porção arterial dos capilares é maior.

Para a análise gasométrica e eletrolítica, pretende-se que haja uma grande similaridade com o sangue arterial. Entretanto, para que isto ocorra, tem de haver um aumento significativo da proporção de sangue arterial ("arterialização") e evitar que qualquer pressão no tecido adjacente proporcione um aumento do sangue venoso e fluido intersticial na amostra (veja o tópico 4.4.2).

Existe uma ótima correlação entre o sangue capilar "arterializado" com o arterial quando se analisam a pCO_2 e o pH.²³ Ao contrário, o mesmo não acontece com a pO_2 , devido à grande diferença de proporções de sangue venoso nas amostras.²⁴ Os resultados do cálcio ionizado são semelhantes.²⁵

Freqüentemente ocorre uma variação positiva das concentrações de potássio²⁶, que é consequência da sua liberação intracelular (que se torna exacerbada quando se faz a compressão do tecido ou quando se mistura vigorosamente a amostra no tubo capilar). É digno de nota que os neonatos podem possuir um aumento da fragilidade eritrocitária e dos valores do hematócrito.

4.4.2 Procedimento de coleta: Os locais exatos, a técnica e os riscos da punção cutânea são descritos em vários livros e em manuais especiais.^{27,28}

A arterialização é conseguida aquecendo-se a pele da seguinte forma: o local da punção e suas redondezas são recobertos por uma toalha quente e úmida, a uma temperatura de 39° a 42°C durante 3 minutos ou, se apropriado, em imersão a temperatura de 42°C. Após a limpeza do local com líquido antisséptico neutro, o mesmo é puncionado com um estilete, ficando o corte com 3-4mm de extensão no adulto, ou 2,4mm para crianças acima de 3 meses.²⁹

A primeira gota é removida. O sangue deve sair sem nenhuma compressão até formar uma gota de 3-4mm de diâmetro. Posicionando-se a ponta do tubo capilar profundamente na gota e mantendo-o na posição horizontal ou ligeiramente inclinado para baixo, este é completamente preenchido. A extremidade que estava próxima à gota é, então, totalmente selada com uma tampa plástica. Em seguida, no lado oposto, insere-se uma barra de metal para misturar o anticoagulante com o sangue ("flea"), fechando-o logo após. O sangue é misturado com a heparina, movimentando-se a barra com um ímã, de lado a lado, por 5 vezes.

5 ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

5.1 Alterações durante o armazenamento e transporte

As amostras para as análises gasométrica e eletrolítica estão, durante o transporte e armazenamento, sujeitas às alterações descritas a seguir.

5.1.1 Metabolismo das células sanguíneas: A glicólise, que ocorre quase exclusivamente nas hemácias, provoca a formação de ácido láctico e desvios no pH, $CHCO_3^-$ e excesso de base até o nível de acidose metabólica. O consumo de oxigênio

pelos leucócitos e plaquetas diminui a pO_2 e aumenta a pCO_2 . A queda da pO_2 é acelerada se a pO_2 original da amostra for elevada.³⁰

Se uma amostra é mantida sob a temperatura ambiente por 30 minutos, as seguintes alterações se processarão:¹²

pH	- 0,021 ± 0,008
pCO_2	+0,86 ± 1,02 mmHg +0,11 ± 0,14 kPa
$CHCO_3^-$	- 0,44 ± 0,50 mmol/L
Excesso de base	- 0,77 ± 0,41 mmol/L
pO_2 (faixa normal)	- 7,5 ± 3,7% do valor original (60-120 mmHg ou 8,0-16,0 kPa)
pO_2 (faixa alta)	- 30,1 ± 2,9% do valor original (140-200 mmHg ou 18,7-26,7 kPa)

Estes dados foram apurados a partir de pacientes gravemente doentes, internados em unidades de terapia intensiva.¹² Em pacientes sem anemia ou leucocitose, as reduções de pO_2 são menores do que usualmente encontradas.³⁰ Os processos metabólicos são minimizados quando se esfria a amostra, procedimento necessário se a análise for demorar 15 minutos após a coleta. O material é colocado em um recipiente com uma mistura de água com gelo. O gelo em cubos grandes não esfria adequadamente, e a amostra deve ficar completamente submersa.

5.1.2 Liberação de íons das células sanguíneas: A estocagem prolongada, a vibração durante o transporte da amostra, a fragilidade extrema das hemácias e a trombocitose severa são fatores que aumentam as concentrações de potássio e fosfato e diminuem a de cálcio ionizado no plasma. Durante a primeira hora de estocagem em água com gelo, a média de aumento da concentração plasmática de potássio é de 0,1 mmol/L.^{8,31}

5.1.3 Escape dos gases: Como mencionado no tópico 2.2, frascos feitos de material plástico não são impermeáveis aos gases; então as alterações de pO_2 se tornam detectáveis em alguns minutos. Frascos e tubos capilares de vidro são gás-impermeáveis por várias horas.^{3,8}

5.2 Procedimentos recomendados para o armazenamento

Se uma amostra sanguínea for colocada em um frasco de vidro (seringa ou tubo capilar) bem vedado e esfriado em água com gelo, este pode ser armazenado por 2 horas para poderem ser mensurados o pH, gases, saturação de oxigênio, hemoglobina, hematócrito e cálcio ionizado. Se a dosagem de potássio for incluída, o tempo de estocagem não pode exceder 1 hora.

Se são incluídas as medições de pO_2 e sO_2 , o sangue coletado em seringas plásticas não deve ser colocado no gelo, mas posicionado em temperatura ambiente e analisado dentro de 15 minutos. Entretanto, nestas condições, pode ocorrer erros pré-analíticos adicionais quando há extrema leucocitose (>50/nL), trombocitose (>600/nL) ou anemia (Hb <75g/L). No caso de severa anemia, a capacidade da hemoglobina de "tamponar" o influxo endógeno de oxigênio é reduzida. A análise imediata é a preferida quando a história do paciente não é conhecida.

A amostra sanguínea que presumivelmente possua uma pO_2 maior que 200mmHg (27kPa) deve ser coletada em seringas de vidro e analisadas o mais rapidamente possível.

Se somente as análises do equilíbrio ácido-básico e eletrolitos são desejadas, a amostra pode ser armazenada em água com gelo por 30 minutos.

Para a dosagem somente os eletrólitos, a amostra não pode ser armazenada por mais de 1 hora a fim de evitar a liberação excessiva de potássio das hemácias. Se o cálcio ionizado está incluído para análise, a amostra deve ser esfriada a 4°C.

6 HOMOGENEIZAÇÃO PARA A MEDIÇÃO

Após qualquer período de armazenamento, a homogeneização da amostra antes de ser analisada se faz necessária, especialmente se as determinações de hemoglobina, hematócrito e concentrações de oxigênio são requeridas. As amostras contidas em tubos capilares são homogeneizadas movimentando-se a barra de metal ("flea") por 5-10 minutos antes da análise. As amostras que estão em seringas de plástico ou vidro devem ser invertidas por 10 vezes e rodadas horizontalmente por 10 segundos.

A homogeneização do sangue em seringas pode ser facilitada se usado um misturador de metal (espessura de 1mm), o qual é de certa forma menor em diâmetro do que a parte interna da seringa. A chapa é introduzida dentro da seringa antes do preenchimento do espaço-morto com a heparina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boink A.B.T.J., Buckley B. M., Christiansen T. F., *et al.* IFCC Recommendation on sampling, transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum. *Clin. Chim. Acta.* 1991; 202:S13-S22. *Ann. Biol. Clin.* 1991; 49:434-8. *J. Automatic Chem.* 1991; 13:235-9. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1991; 29:767-72. *JIFCC* 1992; 4:147-52.
2. Siggaard-Andersen O. In: The acid base status of the blood. 4th ed. Copenhagen: Munksgaard, 1974:152.
3. Scott P.V., Horton J.N., Mapleson W.W. Leakage of oxygen from blood and water samples stored in plastic and glass syringes. *Brit. Med. J.* 1971; 275:512-6.
4. Rosenberg E., Price N. Diffusion of CO₂ and O₂ through the walls of plastic syringes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1973; 51:608-11.
5. Mahoney J.J., Harvey J.A., Wong R. J., Van Kessel A. L. Changes in oxygen measurements when whole blood is stored in iced plastic or glass syringes. *Clin. Chem.* 1991; 37:1244-8.
6. Fletcher G., Barber J. L. Effect of sampling technique on the determination of PaO₂ during oxygen breathing. *J. Appl. Physiol.* 1966; 21:463-8.
7. Hilty H., Karendal B. Effect of syringe material on oxygen tension in stored blood. *Acta. Soc. Upsal.* 1969;193-205.
8. Müller-Plathe O., Heyduck S. Stability of blood gases, electrolytes and haemoglobin in heparinized whole blood samples: influence of the type of syringe. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1992; 30:349-55.
9. Schmidt C., Müller-Plathe O. Stability of pO₂, pCO₂ and pH in heparinized whole blood samples; influence of storage temperature with regard to leucocyte count and syringe material. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1992; 30:767-73.
10. Narayanan S. Relative merits of plasma derived from three heparin salts and serum for sodium and potassium measurements by direct and indirect potentiometry. In: Maas A.H.J., Boink F.B.T.J., Saris N.E., Sprokholz R., Wimberley P.D., eds. *Methodology and clinical applications of ion-selective electrodes.* 1986;7:209-12. This paper, and Refs. 13,18,24, and 25, may be obtained through the IFCC Technical Secretariat, Centre du Medicament, Université de Nancy, 30 rue Lionnais, F 54000 Nancy, France.
11. Siggaard-Andersen O. Sampling and storing of blood for determination of acid-base status. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1961;13:196-204.
12. Müller-Plathe O. *Säure-Basen-Haushalt und Blutgase.* 2nd. ed. Stuttgart-New York: Thieme, 1982:152.
13. Müller-Plathe O., Schreiber R. Electrolyte adapted heparin solution for the determination of gases, electrolytes and substrates in whole blood. In: Maas A.H.J., Buckley B., Manzoni E., *et al.*, eds. *Methodology and clinical applications of ion-selective electrodes.* 1989; 10:89-95.
14. Hutchinson A.S., Ralston S.H., Dryburgh F.J., *et al.* Too much heparin: possible source of error in blood gas analysis. *Br. Med. J.* 1983;287:1131-2.
15. Fraser D., Jones G., Kooh S. W., Radde I. C. Calcium and phosphate metabolism. In: Tietz N. W., ed. *Textbook of clinical chemistry.* Philadelphia: Saunders, 1986.
16. Bradley J. G. Errors in the measurement of blood pCO₂ due to dilution of the sample with heparin solution. *Br. J. Anaesth.* 1972; 44:231-2.
17. Fogh-Andersen N., Wimberley P. D., Thode J., Siggaard-Andersen O. Determination of sodium and potassium with ion-selective electrodes. *Clin. Chem.* 1984; 30:433-6.
18. Buckley B. M., Rawson K. M., Russell L. J. The effect of hemolysis on ionized calcium measurement. In: Burritt M. D., Cormier A. D., Maas A. H. J., *et al.*, eds. *Methodology and clinical applications of ion-selective electrodes.* 1987;9:141-6.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Blood Gas Pre-analytical Considerations: Specimen Collection, Calibration, and Controls; Approved Guideline. *NCCLS document C27-A.* Villanova, PA: NCCLS, 1993.
20. Ishikawa S., Fornier A., Borst C.H., Segal M.S. The effects of air bubbles and time delay on blood gas analysis. *Ann Allergy* 1974;33: 72-7.
21. Madieto G., Sciacca R., Hause L. Air bubbles and temperature effect on blood gas analysis. *J. Clin. Pathol.* 1980;33: 864-7.
22. Biswas C.K., Ramos J.M., Agroyannis B., Kerr D.N.S. Blood gas analysis: effect of air bubbles in syringe and delay in estimation. *Br. Med. J.* 1982;284:923-7.
23. Siggaard-Andersen O., Engel K., Jorgensen K., Astrup P. A micro method for determination of pH, carbon dioxide tension, base excess and standard bicarbonate in capillary blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1960;12:172-6.
24. Van Kessel A.L., Ariagno R.L., Robin E.D. Clinical application of capillary and transcutaneous gas measurements in prematurely born infants. In: Maas A.H.J., Boink F.T.B.J., Saris N.E., *et al.* eds. *Physiology and Methodology of Blood Gases and pH.* 1986;6:33-43.
25. Siggaard-Andersen O., Thode J., Wandrup J. The concentration of free calcium ions in the blood plasma ionized calcium. In: Siggaard-Andersen O., ed. *Blood pH, carbon dioxide, oxygen and calcium-ion* 1981;2:163-90.
26. Wimberley P.D., Hansen E., Bucher D., Olesen H. Ear, finger and vein blood: analytical variation. In: *Nordkem Posters and supplement* 1984;53-5. Helsinki: The Finnish Government Printing Center.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture; Approved Standard. *NCCLS document H4-A3.* Villanova, PA: NCCLS, 1991.
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Percutaneous Collection of Arterial Blood for Laboratory Analysis; Approved Standard. *NCCLS document H11-A2.* Villanova, PA: 1992.
29. Alström T., Dahl M., Gräsbeck R., *et al.* Recommendation for collection of skin puncture blood from children, with special reference to production of reference values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1987;47:199-205.
30. Eldridge F., Fretwell F.K. Change in oxygen tension of shed blood at various temperatures. *J. Appl. Physiol.* 1965; 20:790-2.
31. Fleisher M., Gladstone M., Crystal D., Schwartz M. Two whole-blood multi-analyzers evaluated. *Clin. Chem.* 1989; 35:1532-5.

Infecções parasitárias e o hospedeiro imunocomprometido: diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses

Parasitic infections and the compromised host: laboratory diagnostic of intestinal parasites

Geraldo Attilio de Carli¹, Paulo Jaconi Saraiva² & Roberto M. Silveira Issler³

RESUMO – Neste artigo são revisados os diferentes parasitas que podem causar doenças infecciosas nos hospedeiros imunocomprometidos. São descritos, também, os procedimentos e o diagnóstico laboratorial destes organismos.

PALAVRAS-CHAVE – Hospedeiro imunocomprometido, enteroparasitas, diagnóstico de laboratório.

SUMMARY – In this article we review the parasitic organisms that tend to cause parasitic infections in the compromised host.

KEY WORDS – Compromised host, intestinal parasites, laboratory diagnosis.

O homem possui mecanismos efetivos de defesa que o protegem contra as doenças causadas pelos invasores estranhos. As infecções produzidas por vários agentes etiológicos estimulam os mecanismos imunológicos de defesa e a resposta depende basicamente da identidade e tipo de antígeno.

Três importantes sistemas atuam como elementos de defesa do hospedeiro: fatores naturais ou de superfície, sistema celular e sistema humoral. As barreiras naturais, tanto físicas como bioquímicas, são fundamentais para que haja ação ativa das imunidades celular e humoral, tanto a inata (não específica) quanto a adaptativa (específica). O sistema celular é primordial e tanto os elementos da linhagem mielóide (neutrófilos, macrófagos), que constituem a resposta imunológica inata quanto os componentes da linhagem linfóide (linfócitos T e B), responsáveis pela resposta adaptativa, desenvolvem componentes efetores, produzindo citocinas e anticorpos com a função dinâmica de regular a resposta imune e eliminar os agentes invasores.

Nas imunodeficiências, quer sejam congênitas ou adquiridas, a susceptibilidade às infecções aumenta e os pacientes passam a ser enquadrados em duas categorias: aqueles com defeito na produção de proteínas plasmáticas (imunoglobulinas, complemento) e que conseqüentemente diminuem a capacidade das células do sistema inato (macrófagos, neutrófilos), facilitando o desenvolvimento de infecções bacterianas e, por outro lado, os pacientes com deficiências em nível de imunidade celular adaptativa (linfócitos), que são aqueles que desenvolvem infecções por fungos, vírus e parasitas, cosmopolitas no ambiente e que geram as conhecidas doenças oportunistas. Estes pacientes estão sendo hoje encontrados com maior frequência nas clínicas médicas e o seu diagnóstico e tratamento é problema em ascensão.

Avaliando este contexto, os indivíduos imunocomprometidos, em especial os pacientes com AIDS/SIDA, são altamente susceptíveis a infecções por organismos não viru-

lentos ou de baixa insidiosidade. Nestes pacientes, as parasitoses intestinais costumam ocorrer concomitantemente com outras infecções causadas por fungos, vírus e bactérias.

Pessoas imunodeficientes, ao serem infectadas por alguns organismos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Microsporídeos* (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*) e *Strongyloides stercoralis*, apresentam quadro clínico diferente com os indivíduos imunocompetentes.

O diagnóstico laboratorial é outro fator importante na avaliação do paciente e as várias metodologias hoje disponíveis permitem não apenas a definição do agente infeccioso, como a possibilidade de avaliação da resposta do indivíduo no aspecto imunológico e a evolução do mesmo referente à utilização de agentes terapêuticos.

Entamoeba histolytica

A amebiose apresenta-se sob as formas de disenteria, colite amebiana e ameboma.

A disenteria amebiana manifesta-se por diarreia aguda com ulcerações na mucosa do cólon. Os sintomas incluem cólicas, dores na parte inferior do abdômen e, nos casos mais graves, diarreia mucosa e sangüinolenta.

As formas crônicas da colite amebiana produzem sintomas semelhantes àqueles da colite ulcerativa ou outras formas de doença inflamatória do intestino, ocorrendo por longos períodos e apresentando diarreia, algumas vezes sangüinolenta.

Ameboma, a mais freqüente das complicações do tipo crônico, é constituído por tecido granulomatoso firme, em resposta à infecção amebiana, resultando em uma lesão local do intestino, que pode ser confundida com outras condições patológicas.

Abscessos amebianos ocorrem no fígado e, ocasionalmente, nos pulmões, cérebro e em outros órgãos.

Recebido em 10/02/96

¹Laboratório de Parasitologia, ²Laboratório de Imunologia, Faculdade de Farmácia e ³Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Os trofozoítas da *E. gingivalis* podem causar confusão no diagnóstico dos abscessos pulmonares amebianos, pois podem ser encontrados no exame morfológico do material pulmonar. Apesar de esta ameba ser isolada em pacientes com piorréia alveolar, ela continua sendo considerada não patogênica.^{8,9,14}

Diagnóstico de Laboratório^{7,11}

Amebose Intestinal

Estágios detectados: Trofozoítas e cistos (Fig. 1).

1. Amostra: Fezes.

Exames: Pesquisa de parasitas. Exames após concentração e esfregaço permanente corado (hematoxilina férrica ou tricrômio).

Resultado: Trofozoítas e cistos.

Exames: Detecção direta (EIE).

Resultados: Identificação de antígeno.

2. Amostra: Sigmoidoscopia, biópsia ou raspagem.

Exames: Esfregaço permanente corado (hematoxilina férrica ou tricrômio) e coloração histológica de rotina (hematoxilina eosina, HE).

Resultados: Trofozoítas.

3. Amostra: Soro.

Exames: Testes sorológicos (HAI, IFI, CIE, ID, EIE).

Resultados: Os testes sorológicos não são recomendados para a doença intestinal. Os resultados podem ser negativos, ou apresentar títulos baixos indicando exposição presente ou passada.

4. Procedimento: Estudo radiológico (bário).

Resultados: Anormalidades intestinais (pode também ser normal).

Amebose Extra - Intestinal

Estágios detectados: Trofozoítas (Fig.1).

1. Amostra: Fezes.

Exames: Pesquisas de parasitas. Exame após concentração e esfregaço permanente corado (hematoxilina férrica ou tricrômio)

Resultados: Os organismos (trofozoítas) não são encontrados em aproximadamente 50% dos casos.

2. Amostra: Sigmoidoscopia, biópsia ou raspagem.

Exames: Esfregaço permanente corado (hematoxilina férrica ou tricrômio) e coloração histológica de rotina (HE).

Resultados: Os organismos (trofozoítas) não são encontrados em aproximadamente 50% dos casos.

3. Amostra: Soro.

Exames: Testes sorológicos utilizados HIA e EIE, também são indicados IFI, CIE, ID.

Resultados: Os títulos podem ser baixos em pacientes imunocomprometidos.

4. Procedimentos: Ultra-sonografia.

Resultados: Evidência de espaço ocupado pela lesão.

Giardia lamblia

G. lamblia é o flagelado mais encontrado no trato intestinal e, provavelmente, o mais comum em diferentes áreas do mundo. Este parasita tem sido identificado

como o agente etiológico de numerosos surtos epidêmicos, devido à contaminação da água. A giardose é mais prevalente entre as crianças do que entre os adultos, sendo endêmica em muitos países. As infecções são também frequentes em centros de lazer e entre campistas e homossexuais masculinos (via anal-oral). O homem adquire a giardose pela ingestão de cistos contidos em água ou alimentos contaminados.

A localização mais comum da *G. lamblia* é nas criptas do duodeno e do jejuno. Os trofozoítas invadem o intestino delgado superior, sem, entretanto, penetrar nos tecidos. O período de incubação varia entre 5 dias e várias semanas, com uma média de aproximadamente 9 dias. A infecção pode causar uma variedade de sinais e sintomas, entre os quais náuseas, cólicas e, com frequência, evacuações líquidas ou pastosas, malcheirosas, de coloração clara ou acinzentada. O estágio clínico agudo da giardose pode evoluir para formas subagudas ou crônicas, que se manifestam, com frequência, por náuseas, anorexia, vômitos, distensão e desconforto abdominal, flatulência, lassidão e perda de peso, além de diarreia intermitente, de curta duração.^{8,9,12,13}

Diagnóstico de Laboratório^{7,11}

Estágios detectados: Trofozoítas e cistos (Fig.1)

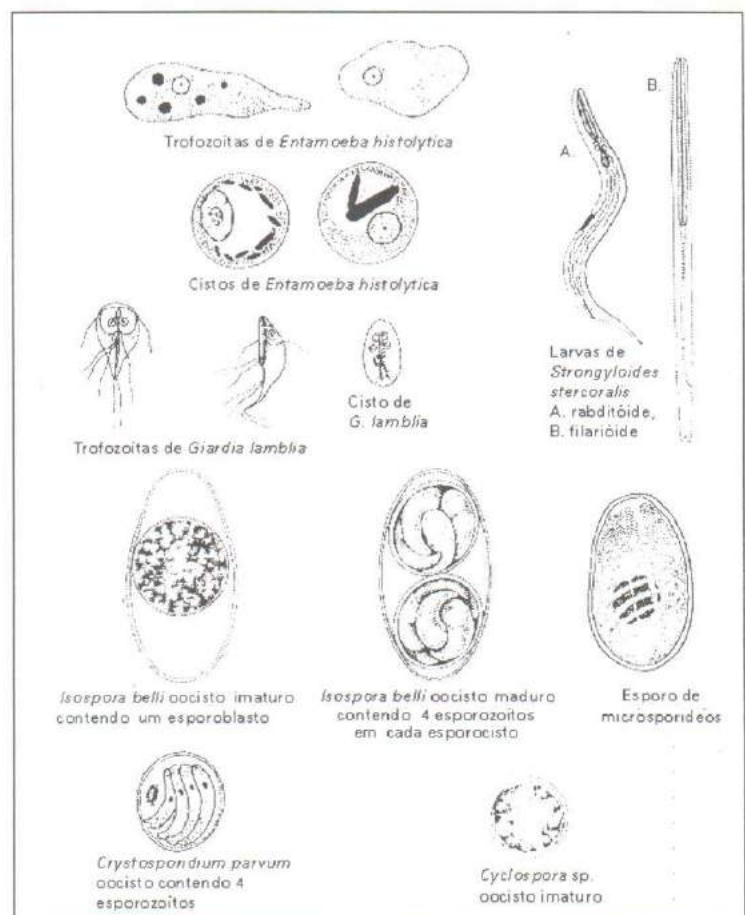


Fig.1 - Estágios de diagnóstico de parasitas que podem ser encontrados no hospedeiro imunocomprometido. Trofozoítas e cistos de *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Desenhos de Mabuko Kitamura, em Garcia, L. S. & Bruckner, D. A. *Diagnostic medical parasitology*. 2nd. ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993. - Esporo de Microsporídeos. Desenho de Sharon Belkin, em Bryan, R. T.; Cali, A.; Owen, R. L. & Spencer, H. C. In: Sun T. (ed.) *Progress in clinical parasitology*. vol. II, Field and Wood Medical Publisher, New York, 1991. - Oocistos de *Isospora belli* e *Cyclospora* sp., desenhos de Elliot Hoffman, em Leventhal, R. & Cheadle, R. F. *Medical parasitology. A self-instructional text*. 4th ed. F. A. Davis Company, Philadelphia, 1996. - Larvas rabióide e filarióide de *Strongyloides stercoralis*. Desenhos de Adele Spigler, em Larsh, J. E. *Outline of medical parasitology*. McGraw-Hill Book Company, New York, 1964.

1. Amostra: Fezes.

Exames: Pesquisa de parasitas. Exames após concentração e esfregaço permanente corado (hematoxilina férrica ou tricrômio).

Resultados: Trofozoítas e cistos (podem não ser, frequentemente, detectados).

Exames: Detecção direta (IFA, EIE).

Resultados: Cistos, identificação de antígeno.

2. Amostra: Aspirado duodenal.

Exames: Exame direto a fresco, concentração e esfregaços permanentes corados (hematoxilina férrica ou tricrômio).

Resultados: Trofozoítas.

3. Amostra: Entero-Test™ (cápsula).

Exames: Exame direto a fresco, concentração e esfregaços permanentes corados (hematoxilina férrica ou tricrômio).

Resultados: Trofozoítas.

4. Amostra: Biópsia.

Exames: Coloração histológica de rotina (HE) e colorações especiais.

Resultados: O trato intestinal superior pode apresentar mudanças e/ou trofozoítas.

5. Amostra: Soro.

Exames: Testes sorológicos (EIE, IFI).

Resultados: Em processo de experimentação.

Cryptosporidium parvum

Criptosporidiose é uma doença parasitária causada pelo *C. parvum*, que se diferencia essencialmente dos outros coccídios pelo fato de invadir e desenvolver-se sobre a membrana superficial, da célula hospedeira ou no interior da borda em escova dos enterócitos dos aparelhos digestivo e respiratório dos vertebrados.

A criptosporidiose é uma zoonose com ampla distribuição geográfica, que não possui especificidade de hospedeiro, sendo a principal forma de transmissão a via fecal-oral. Esse coccídio pode infectar, ocasionalmente, células de outros órgãos em hospedeiros imunocomprometidos.¹⁶ As manifestações da criptosporidiose podem ser agrupadas em 2 tipos, dependendo do estado do portador: gastroenterite transitória, em pacientes imunocompetentes; e manifestações persistentes, com sinais e sintomas clínicos marcados, em pacientes imunodeprimidos. Nestes a diarreia caracteriza-se por evacuações coleriformes, alternadas com períodos de constipação e de evacuação normal, podendo durar de semanas a meses, ou mesmo até à morte, resultando em distúrbios hidroeletrólitos e desnutrição grave. Outros sintomas complementam o quadro clínico: anorexia, náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaléia e febre.^{5,6,7,8,9,10,16}

Diagnóstico de Laboratório^{7,11}

Estágios detectados: Estágios em desenvolvimento no interior da borda em escova dos enterócitos e oocistos nas fezes (Fig.1).

1. Amostra: Fezes.

Exames: Método de Ziehl-Neelsen modificado.

Resultados: Oocistos.

Exames: Detecção direta (IFD, EIE).

Resultados: Oocistos, identificação de antígeno.

2. Amostra: Biópsia da mucosa intestinal.

Exames: Coloração histológica de rotina (HE).

Resultados: Podem ser vistos estágios em desenvolvimento (1 µm) ao longo da célula em escova.

Exames: Microscopia eletrônica

Resultados: Estágios em desenvolvimento ou possivelmente oocistos.

3. Amostra: Soro.

Exames: Testes sorológicos (EIE, IFI, IFD).

Resultados: Em processo de experimentação. Não são recomendados devido à dificuldade de identificar a doença aguda e a infecção passada.

Cyclospora cayetanensis

Durante os últimos anos foram descritos vários surtos de diarreia em pacientes imunocompetentes ou imunocomprometidos, especialmente em aidéticos, associados a um organismo arredondado medindo de 8 a 10 µm, com ampla distribuição mundial. Os indivíduos infectados com esse organismo, com frequência, apresentam fraqueza, febre baixa e diarreia intensa, com mais de 7 evacuações diárias, por 1 a 3 semanas. Os pacientes podem, ainda, apresentar fadiga, náuseas, vômitos, mialgia, anorexia e perda de peso, com diminuição da diarreia em 3 a 4 dias, seguida de recidiva, com duração acima de 4 semanas.^{8,10,11} Não se conhece ainda um tratamento efetivo para esta doença.^{8,9}

Diagnóstico de Laboratório^{7,11}

Estágios detectados: Oocistos (Fig.1)

1. Amostras: Fezes.

Exames: Método de Ziehl-Neelsen modificado.

Resultados: Oocistos

Exames: Epifluorescência (Ultravioleta).

Resultados: Os oocistos autofluorescem.

2. Amostra: Biópsia da mucosa intestinal.

Exames: Coloração histológica de rotina (HE).

Resultados: Oocistos.

Exames: Microscopia eletrônica.

Resultados: Exibem características das ciano-bactérias.

Isospora belli

A infecção por *I. belli*, ou isosporose, tem sido diagnosticada em pacientes com AIDS/SIDA. Os sintomas incluem diarreia, náuseas, febre, esteatorréia, dor de cabeça e perda de peso. A doença pode persistir por meses ou anos.^{5,6,7,8}

Diagnóstico de Laboratório^{7,11}

Estágios detectados: Oocistos (Fig. 1).

1. Amostra: Fezes

Exames: Pesquisa de parasitas. Exame após concentração e coloração pelo método de Ziehl-Neelsen modificado.

Resultados: Oocistos (podem ser vistos em vários estágios de desenvolvimento).

2. Amostra: Biópsia da mucosa intestinal.

Exames: Coloração histológica de rotina (HE).

Resultados: Estágios de desenvolvimento dentro das células da mucosa.

Microsporídeos

Os microsporídeos são parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados em inúmeros vertebrados e invertebrados. Somente os gêneros *Enterocytozoon* e *Encephalitozoon* (*Septata*) permanecem como parasitas intestinais; os outros três gêneros (*Encephalitozoon*, *Nosema* e *Pleistophora*) foram observados em diferentes tecidos. Esses parasitas têm sido diagnosticados em pacientes com AIDS/SIDA e em outros indivíduos imunocomprometidos. A infecção humana é adquirida pela ingestão de pequenos esporos. As espécies *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* são patógenos intestinais cujos esporos são liberados no lúmen do intestino e eliminados nas fezes. Esses esporos são resistentes ao meio ambiente e podem ser ingeridos por outro hospedeiro humano. Infecções pelos microsporídeos em pacientes imunocompetentes podem ser autolimitadas, com sintomas moderados e de curta duração; uma situação similar à encontrada na criptosporidiose e na isosporose.^{2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 15, 17}

Diagnóstico de Laboratório^{7,11}

Estágios detectados: Esporos (Fig. 1)

1. Amostra: Biópsia da mucosa intestinal.

Exames: Coloração histológica de rotina (HE) ou colorações pela prata-metanamina ou Ziehl-Neelsen ou PSA-positivo ou Giemsa.

Resultados: Esporos e estágios em divisão.

Exames: Microscopia eletrônica.

Resultados: esporos e estágios em divisão.

2. Amostra: Fezes.

Exames: Esfregaço permanente corado pelo método do tricrômio modificado.

Resultados: Esporos.

Exames: Detecção direta (IFD)

Resultados: Esporos (teste em processo de experimentação).

Exames: Microscopia eletrônica.

Resultados: esporos e estágios em divisão.

3. Amostra: Soro.

Exames: Testes sorológicos (EIE).

Resultados: Em processo de experimentação.

Strongyloides stercoralis

A estrogiloidose apresenta ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, estendendo-se até as áreas quentes e temperadas. As fêmeas partenogênicas parasitas vivem mergulhadas nas criptas do duodeno e na porção superior do jejuno. Os machos parasitas não participam da biologia dessa parasitose. A infecção se estabelece pela penetração da larvas infectantes por via cutânea, podendo persistir por décadas, como resultado da auto-infecção interna ou hiperinfecção (endógena), no cólon, e da auto-infecção externa (exógena), na região perianal. As infecções leves são assintomáticas e as demais produzem quadros de enterite ou de enterocolite crônica, que podem ser graves ou fatais se houver imunodepressão. Indivíduos com infecção latente e que desenvolvem um quadro de

TABELA 1
Infecções parasitárias: sintomas encontrados nos hospedeiros normal e imunocomprometido

Organismo	Hospedeiro normal	Hospedeiro Imunocomprometido
<i>Entamoeba histolytica</i>	Varia de assintomático ao estado de portador crônico. Eventualmente ocorre amebiose intestinal	Pode apresentar doença extra-intestinal.
<i>Giardia lamblia</i>	Varia de assintomático à síndrome de mal absorção.	Certas imunodeficiências predispoem à infecção.
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Infecção autolimitada, com diarreia e dor abdominal.	A infecção não é autolimitada. Pode haver perda de mais de 10 litros de líquidos por dia; pode ter envolvimento multissistêmico.
<i>Isospora belli</i>	Infecção assintomática ou autolimitada, com diarreia leve.	Diarreia grave, dor abdominal, podendo levar à morte (raros casos relatados).
Microsporídeos	Sabe-se muito pouco dessa infecção em hospedeiro normal.	Pode ocorrer em várias partes do organismo e causar a morte.
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Pode ser assintomática ou causar dores abdominais moderadas. Os parasitas podem permanecer no hospedeiro vários anos, mantendo uma auto-infecção interna.	Pode resultar em uma doença disseminada (hiperinfecção), pode apresentar dor abdominal, pneumonite, sepse e meningite por bacilo Gram-negativo e eosinofilia.

Fonte: Garcia & Shimizu (11)

TABELA 2
Características diferenciais de enteroparasitas

Espécies	Estágios de diagnóstico (fezes)	Tamanho (µm)	Forma
<i>Entamoeba histolytica</i>	Trofozoíta Cisto	10-60 (média 15-20) 10-20 (média 12-15)	Esférico
<i>Giardia lamblia</i>	Trofozoíta Cisto	10-20 x 5-15 (média 12-15) 8-19 (média 11-14 x 7-10)	Piriforme Elipsóide, arred. ou oval
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Oocisto	4-6	Arredondado ou oval
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	Oocisto	8-10	Arredondado
<i>Isospora belli</i>	Oocisto Esporocisto	20-30 x 10-19 9-11	Elipsóide
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Esporo	0,8 x 1,5	Arredondado ou oval
<i>Encephalitozoon (Septata) intestinalis</i>	Esporo	1,2 x 2,0	Arredondado ou oval
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Larva rabditóide	180-380 x 14-20	Larval

Fonte: Garcia & Bruckner (9)

subnutrição (freqüentemente associado ao alcoolismo) e pacientes imunocomprometidos ou que receberam terapia imunossupressora apresentam um grande risco de desenvolver uma hiperinfecção pelo *S. stercoralis*.^{1, 8, 18}

Diagnóstico de Laboratório^{7, 11}

Estágios detectados: Larvas (Fig. 1).

1. Amostra: Fezes.

Exames: Pesquisa de larvas pelo método de Baermann ou Harada & Mori ou pela cultura de larvas em placa Petri com ágar.

Resultados: Larvas rabditóides.

Exame: Exame direto a fresco e concentração.

Resultados: Larvas rabditóides (larvas filarióides também podem ser encontradas).

2. Amostra: Aspirado duodenal.

Exames: Pesquisa de larvas pelo método de Baermann ou Harada & Mori ou pela cultura de larvas em placa Petri com ágar.

Resultados: Larvas rabditóides (larvas filarióides também podem ser encontradas).

Exames: Exame direto a fresco.

Resultados: Larvas rabditóides (usualmente).

Observação: Larvas rabditóides e filarióides, adultos e ovos podem ser encontrados no aspirado duodenal.

3. Amostra: Entero-TestTM (cápsula).

Exames: Exame direto a fresco e concentração.

Resultados: Larvas rabditóides (usualmente).

As abreviaturas significam: HAI = Hemaglutinação indireta; IFI = Imunofluorescência indireta; CIE = Imunoeletroforese contra corrente; ID = Imunodifusão; IFD = Imunofluorescência direta; EIE = Enzima imunoensaio; HE = Hematxilina e eosina; PAS = Ácido periódico de Schiff.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ash, L. R. & Orihel, T. C. Intestinal Helminths. p. 782-795. In: Balows A., (ed.) *Manual of medical microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1991.
- Blanshard, C. & cols. Simultaneous infection with types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. *Gut* 33:418-420, 1992.

- Bryan, R. T. Microsporidia, p. 2513-2524. In: Mandell, G. L.; Bennett, J. E. & Dolin R. (eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th. ed. Churchill Livingstone, New York, 1995.
- Cal, A.; Kotler, D. P. & Orenstein, J. M. Septata intestinalis n.g. n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40: 101-112, 1993.
- Current, W. L. Human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 309: 614-615, 1983.
- Cenac, J.; Deluol, A. M.; Matheron, S.; Coulaud, J. P. Savel J. La cryptosporidiose. I. Une nouvelle protozoonose intestinale humaine. *Ann. Biol. Clin.* 42:389-397, 1984.
- De Carli, G. A. *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas*, Rio de Janeiro: MEDSI, 1994.
- De Carli, G. A. & Issler, R.M.S. Parasitoses Intestinais. p. 406-415. In: Duncan, B. B.; Schmidt, M. I. & Giugliani, E. R. J. (eds.) *Medicina Ambulatorial: condutas clínicas em atenção primária*. 2 ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 1995.
- Garcia, L. S. & Bruckner, D. A. *Diagnostic medical parasitology*. 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1993.
- Garcia, L. S. & Shimizu, R. Y. Diagnostic parasitology: An overview of topics. *Lab. Med.* 24: 13-18, 1993a.
- Garcia, L.S. & Shimizu, R. Y. Diagnostic parasitology: Parasitic infections and the compromised host. *Lab. Med.* 24: 205-15, 1993b.
- Healy, G. R. & Smith, J. W. Intestinal and urogenital protozoa. p. 751-770. In: Balows A. (ed.) *Manual of medical parasitology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1991.
- Healy, G. R. & Garcia L. S. Intestinal and urogenital protozoa., p. 1204-1228. In: P. R. Murray; Baron, M. A.; Tenover, F. C. & Tenover, R. H. (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 6th. ed. ASM Press, Washington, D. C., 1995.

- Markell, E. K.; Voge, M. & John, D. T. *Medical Parasitology*. 7th ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1992.
- Orenstein, J. M.; Dieterich, T. & Kotler, D. P. Systemic dissemination by a new recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS* 6:1143-1150, 1992.
- Pitlik, S.; Fainstein, V.; Garza, D. et al. Human cryptosporidiosis spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. *Arch. Intern. Med.* 6: 2269-2275, 1983.
- Pol, S. & cols. Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. *N. Engl. J. Med.*, 328: 95-99, 1993.
- Scowden, E. D.; Schaffner, W. & Stone W. J. Overwhelming strongyloidiasis: an unappreciated opportunistic infection. *Medicine* 57: 527-44, 1978.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

- Ash, L. R. & Orihel, T. C. *Parasites: A guide to laboratory procedures and identification*. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1987.
- Arakaki, T. & cols. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *J. Parasitol.* 76:425, 1990.
- Baerman, G. Eine einfache methode zur auffindung von Ankylostomum (Nematoden), p. 41. In: *Larven in Erdproben. Neded Geneesk Laborat Weltever Feestbundel*, 1917.
- De Carli, G. A. & Saraiva, P. J. Diagnóstico de laboratório da criptosporidiose humana. *Rev. Bras. Anál. Clin.* 23: 26-30, 1991.
- De Carli, G. A. & Rott, M. B. Amebas e amebose: permanente confusão. *RBAC* 27: 65-67, 1995.
- De Carli, G. A. Identificação de coccídios intestinais: modificações do método de Ziehl-Neelsen. *RBAC* 27: 83-87, 1995.
- De Carli, G. A. Identificação de enteroparasitas: Diagnóstico laboratorial de microsporídeos. *RBAC* 28: 134-137, 1996.
- Harada, U. & Mori, O. A. A new method for culturing hookworm. *Yonago Acta Med.* 1: 177-179, 1955.
- Koga, K. & cols. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:518, 1991.
- Leitch, G. J.; Visvesvara, G. S. & He, Q. Inhibition of microsporidian spore germination. *Parasitology Today* 9:422-424, 1993.
- Melvin, D. M. & Brooke, M. M. *Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites*. U.S. Department of Health, Education, and Welfare publication n° (CDC) 85-8282. U.S. Government Printing Office, Washington, D. C., 1985.
- Palmer, J. Modified iron hematoxylin/kinyoun stain. *Clin. Microbiol. News* 13: 39-40 (Letter), 1991.
- Wilson, M.; Schantz, P. & Pieniazek, N. *Diagnosis of parasitic infections: immunologic and molecular methods*, p. 1159-1170. In: P. R. Murray (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, D. C., 1995.

Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da Doença de Chagas*

Evaluation of alternative methods for the confirmatory diagnosis of Chagas' disease

E.M.V. Reiche¹ & J. V. Jankevicius²

RESUMO – Tendo em vista a ocorrência de resultados falso-positivos, falso-negativos, contraditórios e duvidosos em todos os métodos rotineiramente usados para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas (DC), o objetivo deste trabalho foi avaliar métodos alternativos que pudessem contribuir para o diagnóstico laboratorial confirmatório da DC. Entre eles, a detecção de antígenos circulantes do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) através de imunodifusão radial dupla (IDRD), contra-imunoelektroforese (CIE), eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western Blot* (WB); a detecção de antígenos urinários de *T. cruzi* por SDS-PAGE, WB e ensaio imunoenzimático (ELISA) de “sanduíche” de duplo anticorpo, e a detecção de anticorpos específicos contra frações antigênicas do *T. cruzi* pelo método do WB. Para tanto, utilizaram-se 4 grupos de amostras de soros obtidas de 203 pacientes com DC (crônica), de 23 pacientes com resultados sorológicos prévios inconclusivos para DC, de 53 pacientes com outras doenças e de 50 indivíduos saudáveis. Também se utilizaram 4 grupos de amostras de urina obtidas de 50 pacientes com DC (35 crônica e 15 congênita), de 20 pacientes com DC crônica, de 11 pacientes com outras doenças e de 13 indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos revelaram positividade de 4,70% a 25,00% na IDRD e de 50,00% na CIE. As técnicas de SDS-PAGE e WB não permitiram detectar a presença de antígenos circulantes de *T. cruzi*. Com as amostras de urina, a SDS-PAGE apresentou frações proteicas com peso molecular aparente de 20 a 84 kDa; no teste de WB, a maioria dessas frações foram reconhecidas tanto pelo soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi* como pelo soro pré-imune de coelho, caracterizando inespecificidade de reconhecimento. Através do ELISA detectaram-se antígenos urinários de *T. cruzi* em 50,00% das amostras de pacientes com DC (formas crônica e congênita), em 45,00% das amostras de pacientes com outras doenças e em nenhuma amostra de indivíduos saudáveis, resultando em índices de 50,00% de sensibilidade e 79,20% de especificidade. Das 136 amostras de soros de pacientes com DC, 118 (86,80%) tiveram o resultado sorológico prévio confirmado pelo teste de WB, 16 (11,76%) padrão indeterminado e 2 (1,47%) padrão negativo; das 23 amostras com resultados sorológicos prévios inconclusivos, nenhuma apresentou WB positivo, sendo 14 (60,86%) com resultados indeterminado e 9 (39,13%), negativo. Das 53 amostras de soros de pacientes com outras doenças, 28 (52,83%) apresentaram resultado indeterminado e 25 (47,16%), negativo no WB e das 50 amostras de soros de indivíduos saudáveis, apenas 8 (16,00%) mostraram reatividade com padrão indeterminado e 42 (84,00%) padrão negativo no WB. Esses valores corresponderam a índices de 86,80% de sensibilidade e 100% de especificidade. Os resultados obtidos permitem sugerir que os resultados sorológicos prévios para o diagnóstico da DC podem ser confirmados por diferentes métodos, principalmente pelo ELISA, para a detecção de antígenos urinários de *T. cruzi*, e pelo teste de WB, para a detecção de anticorpos específicos contra frações antigênicas do *T. cruzi*, que poderiam contribuir para limitar as consequências médicas, legais e sociais de um resultado sorológico prévio inconclusivo para o diagnóstico da DC. Esses resultados reforçam a necessidade de estudos adicionais e de contínuo esforço para o desenvolvimento de teste padrão ideal para o diagnóstico laboratorial confirmatório da DC.

PALAVRAS CHAVE – Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, imunodiagnóstico, *Western Blot*.

SUMMARY – Considering the occurrence of false positive, false negative, contradictory and dubious results in all routine laboratorial methods available for the Chagas' disease (CD) diagnosis, the aim of this work was to evaluate alternative methods for the confirmatory diagnosis of CD. Among them are the detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) by double immunodiffusion (IDRD), counterimmunoelectrophoresis (CIE), polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and *Western Blot* (WB); *T. cruzi* urinary antigen determination by SDS-PAGE, WB and double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the detection of specific antibodies to the *T. cruzi* antigenic fractions by the WB method. Serum samples were obtained from 203 chagasic patients (chronic form), from 23 patients with inconclusive previous serological results for CD, from 53 patients with other diseases and from 50 healthy individuals. Urine samples were also obtained from 50 chagasic patients (35 with the chronic form of the disease and 15 with the congenital form), from 20 chronic patients, from 11 patients with other diseases and from 13 healthy individuals. The results revealed a positivity of 4.70% and 25.00% in the IDRD and of 50.00% in the CIE. SDS-PAGE and WB did not permit the detection of circulating antigens of *T. cruzi*. SDS-PAGE of the urine samples showed bands of apparent molecular weight from 20 to 84 kDa, and the in WB, most of these bands were recognized both by hyperimmune anti-*T. cruzi* rabbit serum and by pre-immune rabbit serum. ELISA permitted the detection of *T. cruzi* urinary antigens in 50.00% of the samples from chagasic patients (chronic or congenital CD), in 45.00% of samples from patients with other diseases and in none of the samples from healthy individuals, resulting in 50.00% sensitivity and 79.20% specificity. The WB of 136 serum samples from chagasic patients permitted the confirmatory diagnosis of CD in 118 (86.80%), yielded an indeterminate pattern of reactivity in 16 (11.76%) and a negative pattern in only 2 (1.47%). Of the 23 serum samples from patients with inconclusive previous serological results for CD, none had positive pattern in the WB, 14 (60.86%) demonstrated indeterminate and 9 (39.13%) negative results. Of the 53 serum samples from patients with other diseases, 28 (52.83%) presented an indeterminate pattern and 25 (47.16%) gave negative results in the WB. Of the 50 serum samples from healthy individuals, 42 (84.00%) demonstrated negative results and only 8 (16.00%) indeterminate results in the WB. On the basis of these results, the WB method showed 86.80% of sensitivity and 100% of specificity. The results suggest that the previous serological results for CD could be confirm by different methods, mainly by ELISA, for the detection of *T. cruzi* urinary antigens, and by WB, for the detection of specific antibodies to *T. cruzi* antigenic fractions, which may reduce the medical, legal and social consequences of an inconclusive previous serological result for CD. These results also underscore the need for additional studies for continued efforts in the development of an ideal standard confirmatory test for CD.

KEY WORDS - Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, immunodiagnosis, *Western Blot*.

Recebido em 18/09/96

* Trabalho derivado da Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, com suporte financeiro do CNPq, CPG/UEL e PROUNI/LD.

¹ Farmacêutica-Bioquímica, docente de Imunologia Clínica do Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

² Biomédico, docente de Microbiologia Geral do Departamento de Patologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, uma infecção generalizada, essencialmente crônica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), continua sendo grande problema de saúde pública em áreas rurais, suburbanas e urbanas de muitos países do continente americano. Segundo Schmunis (1991), 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas, do México, na América do Norte, à Argentina e Chile, na América do Sul e segundo Rocha *et al.* (1994), mais de 90 milhões estão sob risco de sofrer a infecção natural.

Após a erradicação dos triatomíneos domiciliares, a transmissão natural do *T. cruzi* deixou de ser ativa (Dias, 1993) e a transmissão transfusional vem-se constituindo no Brasil e em outros países da América, no principal mecanismo de perpetuação dessa endemia. Na medida em que as formas clássicas de transmissão da DC, como a vetorial e a transfusional, estão sendo controladas por medidas sanitárias e por uma rigorosa triagem dos candidatos a doador de sangue, respectivamente, outras formas de transmissão menos freqüentes vêm assumindo importância crescente, como o transplante de órgãos de doadores infectados (Chocair *et al.*, 1979; Chocair *et al.*, 1981; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1989 e Ferraz & Figueiredo, 1993) e a transmissão congênita (Bittencourt, 1984). Em geral, o risco aceito de doença de Chagas congênita (DCC) alcança cerca de 1% das gestantes infectadas (Dias, 1992; Medina-Lopes *et al.*, 1992). Outras possibilidades menos freqüentes são a transmissão sexual, acidental e oral do *T. cruzi*.

Carlos Chagas, desde o início de suas observações, reconheceu dois quadros clínicos bem distintos na DC: o agudo e o crônico (Rassi *et al.*, 1989). A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática, sendo esta a mais freqüente. Dentre as alterações laboratoriais, observa-se alta parasitemia, presença de anticorpos inespecíficos e início de formação de anticorpos específicos das classes IgM e IgG, que alcançam concentrações séricas elevadas. Desaparecidas as manifestações da fase aguda, inicia-se a fase crônica, a princípio pela forma indeterminada, caracterizada por longo período assintomático, sem expressão de comprometimento visceral e positividade dos exames sorológicos e/ou parasitológicos. Posteriormente, em porcentagem variável de casos, aparece o comprometimento visceral (forma cardíaca e/ou digestiva). Nesta fase observa-se baixa parasitemia e presença de anticorpos específicos da classe IgG, sendo a IgM detectada esporadicamente e em baixos títulos.

Para a detecção das alterações presentes na fase aguda (incluindo a DCC) e na fase crônica da DC, pode-se utilizar grande variedade de métodos laboratoriais específicos, divididos em dois grupos: métodos parasitológicos, que têm com objetivo demonstrar o parasita ou seus componentes, e métodos sorológicos, que avaliam a resposta imune específica do hospedeiro contra o parasita. Recentemente temos o desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular (Romanha, 1992).

A pesquisa direta do *T. cruzi* pelos métodos a fresco (entre lâmina e lamínula), após coloração, pelo método de concentração de Strout ou pelo micro-hematócrito é em geral positiva nas primeiras semanas da doença. Já os métodos parasitológicos indiretos apresentam limitações quanto ao tempo de leitura (30 a 60 dias para o xenodiagnóstico e 20 a 150 dias para a hemocultura) e da eficácia, tornando problemático seu emprego para diagnóstico rápido e preciso da DC. Chiari (1992) cita que o xenodiagnóstico e a hemocultura, apesar de altamente específicos, são de procedimento laborioso e os parasitas são detectados somente em 50% dos casos de indi-

víduos infectados, quando apenas uma amostra de sangue é analisada.

A detecção de exoantígenos solúveis do *T. cruzi* em fluidos biológicos pode constituir método diagnóstico confirmatório, principalmente quando os testes que detectam anticorpos forem negativos ou duvidosos. A presença de antígenos livres ou complexados com anticorpos no soro de animais ou seres humanos infectados por *T. cruzi* já foi demonstrada exaustivamente por vários autores, empregando diferentes métodos (Siqueira *et al.*, 1966; Araújo, 1976; Araújo, 1979; Corral *et al.*, 1992). Antígenos presentes na urina de animais e seres humanos infectados por *T. cruzi* também foram demonstrados por Corral *et al.* (1988); Corral *et al.* (1989); Katzin *et al.* (1989a); Katzin *et al.* (1989b); Umezawa *et al.* (1991), Umezawa *et al.* (1993) e Alexandre *et al.* (1994).

Katzin & Umezawa (1991) apontam inúmeras vantagens da detecção de antígenos urinários de *T. cruzi* em pacientes com DC. Entre elas estão a rapidez na obtenção dos resultados, a alta sensibilidade, a utilização em estudos epidemiológicos de larga escala e a elucidação de resultados sorológicos duvidosos. O diagnóstico rápido da DCC torna-se de grande valor na medida em que quanto mais precocemente se comprovar a infecção, maior a possibilidade de cura dos pacientes (Freilij, 1992; Sarasúa, 1993).

Diante das limitações dos diagnósticos clínicos e parasitológicos, a pesquisa de anticorpos séricos contra componentes do *T. cruzi* constitui importante metodologia que pode vir a contribuir para a confirmação diagnóstica da DC. Para a detecção da resposta imune específica a antígenos do parasita, diversos métodos sorológicos têm sido utilizados, com vários graus de sensibilidade e especificidade. Entre eles a fixação de complemento (FC), precipitação, floculação (FO), aglutinação direta (AD), aglutinação indireta (AI), hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e métodos imunoenzimáticos (ELISA). Muitos desses métodos fornecem resultados específicos e sua sensibilidade permite a utilização em triagens sorológicas iniciais da infecção. No entanto, reações cruzadas com soros de pacientes com outras doenças infecciosas e parasitárias são encontradas em todos os métodos sorológicos, em função da complexidade antigênica observada no *T. cruzi* (Stolf, 1992).

Uma das mais utilizadas rotineiramente é a técnica de IFI, desenvolvida por Camargo (1966), que emprega formas epimastigotas do *T. cruzi* fixadas em lâminas de vidro, permitindo detectar anticorpos das classes IgG e IgM anti-*T. cruzi* com a utilização de conjugados fluorescentes anti-IgG e anti-IgM humanas, respectivamente, tendo grande aplicação não só no diagnóstico sorológico da fase crônica da DC, como também na detecção de anticorpos IgM na fase aguda da doença e na DCC (Camargo & Amato Neto, 1974).

No entanto, resultados falso-negativos também podem ocorrer. Anticorpos IgM anti-*T. cruzi* por IFI não foram observados em soros de recém-natos com DCC (Szarfman *et al.*, 1975; Pehrson *et al.*, 1982; Vieira *et al.*, 1983 e Bittencourt *et al.*, 1984). Lorca (1993) cita que a demonstração de anticorpos IgM específicos contra *T. cruzi* deveria ser utilizada para o diagnóstico da DCC, mas a técnica rotineiramente empregada, a IFI, mostra não mais que 60% de sensibilidade. Portanto, uma pesquisa negativa para anticorpos anti-*T. cruzi*, principalmente da classe IgM, não excluiria o diagnóstico da DC, tanto da forma adquirida quanto da congênita, ficando nítida a necessidade do emprego de outros métodos, tal como o ELISA, com maior sensibilidade e especificidade, com o emprego, por exemplo, de antígenos específicos obtidos através de técnicas recombinantes.

O método imunoenzimático (ELISA) possibilitou melhores resultados na detecção de antígenos, anticorpos e imunocomplexos circulantes da DC. Resultados satisfatórios, foram inicialmente relatados por Voller *et al.* (1975) quando descreveram o uso do ELISA para mensuração de anticorpos na DC, obtendo sensibilidade e especificidade similares às da reação de IFI. Posteriormente, inúmeros autores desenvolveram métodos imunoenzimáticos empregando diferentes antígenos do *T. cruzi*, comprovando sua importância no diagnóstico laboratorial da DC.

Luquetti (1993) assinala que antígenos purificados, antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos são candidatos para aprimorar os resultados obtidos nas reações sorológicas para o diagnóstico da DC, principalmente em inquéritos soroepidemiológicos, em bancos de sangue, no diagnóstico da fase aguda e da DC congênita, assim como no acompanhamento de pacientes tratados. No entanto, Camargo (1992b) salienta a menor sensibilidade obtida com os antígenos recombinantes em relação aos extratos do *T. cruzi* e afirma que essa sensibilidade pode ser aumentada gradativamente pela associação de antígenos recombinantes que se mostrem complementares. Mais recentemente, Camargo (1995) assinala que a seleção de frações antigênicas específicas, associadas em "poliantígenos", garantiria a máxima sensibilidade do ELISA, uma vez que a eficiência da fração antigênica no imunodiagnóstico depende de sua expressão em cepas de diferentes regiões, enquanto para obter sensibilidade satisfatória haverá necessidade da associação de frações complementares.

Wendel (1993a) salienta que nenhum método sorológico disponível é 100% seguro; portanto, deve-se usar, pelo menos, dois métodos na triagem sorológica. Além disso, a baixa prevalência da DC em candidatos a doador de sangue, na maioria dos serviços hemoterápicos, propicia maior número de resultados falso-positivos, que devem ser confirmados por outros métodos. Soma-se a estes fatos a possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada, em diferentes graus, de acordo com o antígeno utilizado, com soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV) devido a epítomos comuns entre *T. cruzi* e *Leishmania*. Determinantes comuns podem ser também encontrados em diferentes estruturas como hemácias de carneiro ou tecidos humanos como miocárdio e nervos. Resultados falso-positivos devidos a anticorpos IgM são frequentemente observados, principalmente em pacientes com baixo nível socio-econômico, provavelmente induzidos pela fosfocolina, fração antigênica comum a vários parasitas, tais como *T. cruzi*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Filaria*, *Toxocara* e bactérias (CAMARGO, 1992a). Portanto, a sorologia tradicional vem cumprindo adequadamente seu papel na triagem sorológica em bancos de sangue, mas apresenta problemas relacionados com resultados falso-positivos, que devem ser confirmados por outras técnicas, entre as quais o *Western Blot* (WB) se apresenta como a alternativa mais viável e adequada que, gradativamente, vem sendo aplicada no diagnóstico confirmatório de doenças infecciosas e parasitárias. Scanduzzi *et al.* (1991); Soussumi *et al.* (1994); Teixeira *et al.* (1994) e Ferreira *et al.* (1995) relatam a confirmação de resultados sorológicos duvidosos para DC obtidos nos testes de HAI, IFI e ELISA, rotineiramente empregados.

O conhecimento das limitações dos métodos parasitológicos diretos e indiretos e das reações sorológicas, principalmente na detecção de anticorpos da classe IgM anti-*T. cruzi* em imunodeficientes e em recém-natos, põe em evidência as dificuldades do diagnóstico da DC aguda e da DCC. Os resultados obtidos por Reiche *et al.* (1994b) demonstraram 1,07% de positividade nas reações sorológicas para DC em gestantes atendidas no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (HURNP), Londrina, Paraná, no

período de 1990 a 1994; no entanto, 1,06% das amostras de recém-natos apresentaram apenas anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi* por IFI, e em nenhuma das amostras se detectaram anticorpos específicos da classe IgM. Esses resultados levaram-nos a suspeitar da ocorrência de resultados falso-negativos e avaliar outros métodos alternativos já descritos, numa tentativa de expandir os recursos existentes para o diagnóstico da DCC.

Também nos chamou a atenção os resultados sorológicos inconclusivos, ou seja, somente uma reação sorológica com resultado reagente para DC em amostras de soros de candidatos a doador de sangue do Hemocentro do HURNP e na população atendida nas diferentes clínicas desse hospital, na ordem de 2,46% e 1,85%, respectivamente (Reiche *et al.*, 1994a; Reiche *et al.*, 1994b). Todos esses dados, somados aos resultados contraditórios, devidos às sensibilidades e especificidades limitadas das reações sorológicas convencionais utilizadas para o diagnóstico da DC, e a falta de um teste padrão-ouro, levou-nos a uma avaliação de métodos alternativos, tais como a pesquisa de antígenos solúveis e de anticorpos específicos contra frações antigênicas do *T. cruzi*, que se revelassem mais sensíveis e específicos, para serem utilizados como confirmatórios dos resultados obtidos pelas reações sorológicas rotineiramente empregadas, com a finalidade de diagnosticar de forma mais cuidadosa e adequada a DC crônica, e evitar as consequências médicas, sociais e legais que surgem com os resultados falso-positivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Soro humano: As amostras de soro humano utilizadas neste trabalho foram distribuídas por 4 grupos:

Grupo I

Constituído por 89 amostras de soros de pacientes atendidos no HURNP e Ambulatório do Hospital de Clínicas (HC) e 114 amostras de soros de candidatos a doador de sangue do Hemocentro do HURNP, todos ligados à Universidade Estadual de Londrina (UEL). As 203 amostras apresentaram, pelo menos, duas reações sorológicas convencionais (HAI, IFI e ELISA) reagentes para DC. As reações sorológicas foram realizadas no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HURNP.

Grupo II

Constituído por 23 amostras de soros, 17 de pacientes atendidos no HURNP e HC e 6 de candidatos a doador de sangue do Hemocentro do HURNP com apenas um teste sorológico convencional reagente para DC.

Grupo III

Constituído por 53 amostras de soros, todas soronegativas para DC, obtidas de pacientes do HURNP com diagnóstico laboratorial de outras doenças ou presença de anticorpos auto-ímunes.

Grupo IV

Constituído por 50 amostras de soros de candidatos a doador de sangue do Hemocentro do HURNP, todos soronegativos para DC, sífilis, vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (AgHBs e anti-HBc), vírus da imunodeficiência humana (VIH), vírus linfotrófico de célula T humana (HTLV I e HTLV II) e concentração sérica normal de transaminase glutâmico pirúvica (TGP).

Urina humana: As amostras de urina utilizadas neste trabalho foram distribuídas por 4 grupos:

Grupo V

Constituído por 35 amostras de urina concentrada de pacientes com DC crônica, provenientes do Instituto de Cardiologia "Dante Pazzanese", São Paulo, e 15 não-concentradas de pacientes com DC congênita, gentilmente cedidas pelo Dr. Alejandro Miguel Katzin, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

Grupo VI

Constituído por 20 amostras de urina de pacientes atendidos no HURNP e HC com DC crônica, com pelo menos dois testes sorológicos convencionais reagentes para DC.

Grupo VII

Constituído por 11 amostras de urina de pacientes com outras doenças: malária por *Plasmodium falciparum* (4); esquistossomose mansônica (3), insuficiência renal crônica (2) e LTA (2).

Grupo VIII

Constituído por 13 amostras de urina normal, de indivíduos sadios com sorologia não-reagente para DC.

As amostras de urinas não-concentradas foram filtradas e concentradas pelo método utilizado por Freilij *et al.* (1987) e Corral *et al.* (1989), consistindo da precipitação com 3 volumes de etanol gelado (75% v/v) por 48 horas a -20°C. O sedimento concentrado foi obtido por centrifugação a 2500 x g, por 30 minutos, a 4°C, e ressuspenso em 0,5-1,0ml de PBS 0,15M, pH 7,2. Posteriormente foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Soro normal de coelho, soro pré-imune de coelho, soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi* e soro hiperimune humano anti-*T. cruzi*.

Cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*): formas vivas da cepa Y do parasita *T. cruzi*, gentilmente cedidas pela Dra. Maria Júlia Manso Alves, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, S. Paulo, foram cultivadas em meio LIT, descrito por Camargo (1964).

Reações Sorológicas para Detecção de anticorpos Anti-*T. cruzi*

Hemaglutinação indireta (HAI)

Qualitativa e quantitativa, realizada com hemácias sensibilizadas (EBRAM, Produtos Laboratoriais Ltda., São Paulo, SP), com diluição inicial do soro de 1:32. Conforme recomendações do fabricante, foi considerada reagente a amostra de soro que promoveu aglutinação com título de anticorpos igual ou superior a 1:32.

Imunofluorescência indireta (IFI)

Qualitativa e quantitativa, segundo Camargo (1966), realizada com *T. cruzi* fixado em lâminas disponíveis comercialmente (LIO SERUM, Indústria e Comércio de Equipamentos e Produtos para Laboratórios Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo e CECON, São Paulo, São Paulo), anti-IgG humano conjugado com isotiocianato de fluoresceína (LABORCLIN, Produtos para Laboratórios Ltda., Pinhais, Paraná, e THE BINDING SITE Ltda., Birmenhan, England), previamente titulado e diluição inicial do soro humano de 1:40 em PBS. Nas amostras de soros de recém-natos, empregou-se também o conjugado fluorescente anti-IgM humano (LABORCLIN, Produtos para Laboratórios Ltda.,

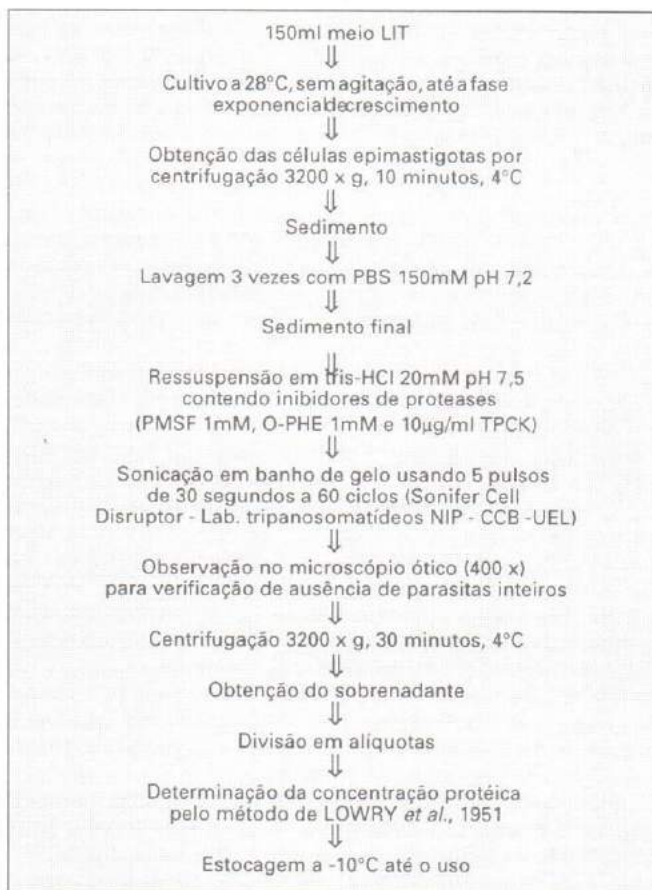
Pinhais, Paraná), com diluição inicial do soro de 1:8 em PBS. Para a leitura, utilizou-se microscópio de fluorescência com epi-iluminação de halogênio (NIKON LABOPHOT, Japan, com aumento de 400x). Foi considerado reagente o soro que apresentou título igual ou superior a 1:40 para anticorpos das classes IgG e IgM, segundo Camargo (1966), Camargo & Amato Neto (1974) e Amato Neto *et al.* (1984).

Enzimaimunoensaio (ELISA)

Qualitativa, realizada com produtos disponíveis comercialmente (ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, São Paulo, e WIENER Laboratórios, Rosário, Argentina), de acordo com as instruções técnicas dos fabricantes. Foi considerado reagente o soro que apresentou repetidamente valores de absorbância (492nm) superiores ao valor do *cutoff* diário da reação e não-reagente o soro com valores de absorbância menores que o valor do *cutoff* diário. Amostras de soro com valores de absorbância entre $\pm 20\%$ do valor do *cutoff* diário, considerada "zona-cinza", foram retestadas em duplicata, utilizando-se a mesma amostra para confirmação do resultado inicial.

Foi considerado um caso de DC quando a amostra de soro humano apresentou reatividade sorológica (títulos HAI $\geq 1:32$; IFI $\geq 1:40$ e ELISA repetidamente superior ao *cutoff*) em pelo menos duas das técnicas realizadas (Wendel, 1993b).

QUADRO I Protocolo utilizado para obtenção da suspensão antigênica da cepa Y do *T. cruzi*



LIT = liver infusion tryptose.

PBS = solução tampão fosfato.

PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfônico diluído em isopropanol.

O-PHE = ortofenanolina; TPCK = N-tosil-L-fenilalanina clorometilacetona diluído em água destilada.

NIP-CCB-UEL = Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina.

Obtenção do Antígeno da Cepa Y do *T. cruzi*:

Células epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, cultivadas em 150 ml de meio LIT, a 28°C, sem agitação, na fase exponencial de crescimento, determinada pela curva de crescimento, foram coletadas para o preparo da suspensão antigênica, de acordo com padronizações descritas por Araujo & Gupttill (1984), Israelski et al. (1988), Ouasssi et al. (1991) e Teixeira et al. (1994), com algumas modificações. O protocolo final está descrito no Quadro I.

Deteção de antígenos circulantes do *T. cruzi* no soro de pacientes com DC.

Imunodifusão radial dupla (IDRD) de Ouchterlony

Foi utilizada a técnica descrita por Siqueira et al., 1966. As amostras de soros de pacientes com DC foram testadas frente ao soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi* e soro pré-imune de coelho. As reações de IDRD foram realizadas também em 5 amostras de soros humanos normais.

Contra-imunoelektroforese (CIE)

Foi adotada a técnica descrita por Araújo (1976), Moretti et al. (1985), Alonso et al. (1986) e Kohanteb et al. (1987) com algumas modificações. As amostras de 20 µl de soros humanos, puros e concentrados (5 vezes através de diálise em celofane contra goma arábica em pó, por 3 horas) foram aplicadas no cátodo e os soros pré-imune e hiperimune de coelho anti-*T. cruzi*, no ânodo. A reação foi realizada também em 5 soros humanos normais e com soro pré-imune de coelho como controle.

Por SDS-PAGE

Amostras de 50 µl de soros de pacientes com DC, previamente diluídos a 1:5 em solução fisiológica e posteriormente diluídos em tampão de amostra 2x (v/v), foram aplicadas em cada poço do gel e submetidas a SDS-PAGE. A eletroforese, em placa vertical de 16,5 cm x 14,5 cm, foi realizada em gradiente de gel de poli-acrilamida, variando de 7,5% a 15%, em gel de 8,5 cm de altura por 1 mm de espessura, segundo o sistema proposto por Laemmli (1970).

Por WB

Amostras de 50 µl de soro de pacientes com DC, previamente diluídas a 1:5 em solução fisiológica e posteriormente diluídas em tampão de amostra 2x (v/v), foram aplicadas em cada poço do gel (dois de cada vez) e submetidas a SDS-PAGE. Após a corrida eletroforética, os géis foram utilizados para a transferência de proteínas, pelo método de WB, segundo Towbin et al. (1979). Para a detecção de antígenos circulantes de *T. cruzi*, utilizou-se soro humano hiperimune anti-*T. cruzi* diluído a 1:50 em tampão de saturação, como fonte de anticorpos. Como controle de reatividade inespecífica, utilizou-se também soro humano normal diluído a 1:50 em tampão de saturação. Após incubação de 1 hora à temperatura ambiente, com agitação lenta, as membranas foram lavadas 4 vezes (10 minutos cada) e incubadas com o conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase, diluído a 1:2000 em tampão de saturação, por 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação lenta. Após nova lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato 4-cloro-1-naftol durante 15-30 minutos. Após a lavagem com água destilada, procedeu-se à leitura visual do aparecimento das frações.

Deteção da Presença do Antígeno de *T. cruzi* na Urina

Por SDS-PAGE

Amostras de 50 µl de urina concentrada, diluídas em tampão de amostra 2x (v/v), fervidas durante 3 minutos, foram aplicadas em cada poço e submetidas à SDS-PAGE, segundo o sistema proposto por Laemmli (1970) e posteriormente utilizado por Freilij et al. (1987) e Corral et al. (1989).

Por WB

O procedimento de transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose obedeceu a orientação preconizada por Towbin et al. (1979), e posteriormente adotada por Corral et al. (1989) e Umezawa et al. (1993).

Por Enzimaimunoensaio (ELISA)

Foi utilizado o método de "sanduíche" de duplo anticorpo, descrito inicialmente por Voller et al. (1980), e depois adotado por Freilij et al. (1987), Corral et al. (1988) e Corral et al. (1989) para detecção de antígenos urinários de *T. cruzi*. Microplacas de tiras descartáveis de poliestireno (Corning Glass Works, New York, USA) foram sensibilizadas com 100 µl de fração de IgG purificada de soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi* diluída a 1:500 em tampão carbonato 0,1M, pH 9,8. As placas foram incubadas em câmara úmida, a 4°C, por 18 horas. Após esse tempo, os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem. Os poços foram bloqueados incubando-se com tampão de bloqueio por 1 hora, a 37°C. Os poços foram lavados 4 vezes e 100 µl das amostras e controles foram adicionados e incubados a 37°C por 4 horas. Após esse tempo, os poços foram lavados 4 vezes, novamente com tampão de lavagem e 100 µl da fração IgG purificada de soro hiperimune humano anti-*T. cruzi* foram adicionados e incubados, a 37°C, por 1 hora. Os poços foram lavados novamente e 100 µl de conjugado de coelho anti-IgG humano marcado com peroxidase diluído a 1:50.000 em PBS 0,01 M, pH 7,2, contendo Tween 20 0,1% foram colocados em cada poço da reação. Após incubados durante 60 minutos a 37°C e lavados 4 vezes, 100 µl do substrato ortofenilenodiamino peróxido de hidrogênio (OPD) foram adicionados. Após 10 minutos, protegida da luz, a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico 1N. A leitura foi realizada a 492 nm. Os controles utilizados no teste foram: controle positivo, preparado artificialmente misturando a suspensão antigênica da cepa Y (2080 µg/ml) do *T. cruzi* em amostra de urina normal, concentrada, numa diluição final de 1:10; controle negativo, constituído por amostra de urina normal, concentrada; controle da fração de IgG de soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi*, no qual o tampão carbonato substituiu a amostra teste; controle do conjugado, no qual o tampão carbonato substituiu a amostra e a fração de IgG de soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi*; controle do substrato, no qual o tampão carbonato substituiu todos os reagentes anteriores e controle sem sensibilização, no qual a reação foi realizada em poço sem sensibilização.

O valor do *cutoff* para o ELISA foi determinado pela adição de 2 desvios-padrões (DP) ao valor médio das absorbâncias obtidas, em duplicata, em 13 amostras de urina normal concentradas, seguindo os mesmos critérios utilizados por Freilij et al. (1987) e Petray et al. (1992).

Teste de Wb para Deteção de Anticorpos Séricos Específicos Contra Frações Antigênicas do *T. cruzi*

O volume de 10 µl de uma mistura de padrões de peso molecular e 50 µl de suspensão antigênica da cepa Y do *T. cruzi*, ambos diluídos em tampão de amostra 2x (v/v) e fervidas por 3 minutos, foram aplicados no primeiro e

demais poços do gel, respectivamente. Após a corrida eletroforética, fez-se a transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose, obedecendo o preconizado por Towbin *et al.* (1979). Tiras verticais de membrana de nitrocelulose com 5-7mm de largura, contendo as frações antigênicas da cepa Y do *T. cruzi*, separadas eletroforeticamente, foram colocadas em canaletas individuais, incubadas com 2,0 ml de tampão de saturação por 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação lenta. Após o bloqueio, as tiras foram incubadas com as amostras de soros dos grupos I, II, III e IV diluídas a 1:100 em tampão de saturação, por 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação lenta. Em seguida, foram lavadas com tampão de lavagem, 4 vezes, com intervalo de 10 minutos entre cada troca de tampão, com agitação lenta. Foram incubadas com 2,0 ml do conjugado de coelho anti-IgG humana marcado com peroxidase, diluído a 1:2000 em tampão de saturação, por 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação lenta. Após nova lavagem, adicionaram-se, em cada canaleta, 2,0 ml da solução de substrato 4-cloro-1-naftol, por 15 minutos, até o aparecimento das frações, sendo em seguida lavadas com água destilada, secas e fotografadas. Em cada série de testes de WB, duas tiras foram utilizadas como controles: positivo, utilizando soro humano "reagente" para anticorpos anti-*T. cruzi*, e negativo, usando o soro humano normal.

Os critérios de reatividade utilizados para este trabalho foram os mesmos utilizados por Teixeira *et al.* (1994): frequência do número de frações reconhecidas pelas amostras de soros dos grupos I, II, III e IV e frequência de reatividade das diferentes proteínas da suspensão antigênica da cepa Y do *T. cruzi*, que foram reconhecidas por essas amostras.

Foi considerado resultado **positivo** o reconhecimento de pelo menos 5 frações antigênicas dentre as 10 frações com maior frequência de reconhecimento. Foi considerado **indeterminado**, quando a amostra de soro reconheceu menos de 5 frações antigênicas entre as 10 de maior frequência e o resultado foi **negativo** quando não houve reconhecimento de nenhuma fração do grupo das 10 com maior frequência.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a performance do ELISA e do WB propostos, foram determinados os índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e índice de concordância *kappa* (*k*), segundo Kramer & Feinstein (1981). A reprodutibilidade intra-ensaio do ELISA foi avaliada pelos testes de correlação de Pearson e o teste *t* de Student, ao nível de 95% de significância (Zar, 1996).

O valor do *cutoff* foi estimado como a média das absorvâncias obtidas nas amostras de urina normal acrescida de 2 desvios-padrões ($X + 2DP$). A análise estatística foi realizada empregando o programa EPI INFO.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas reações de IDRD e CIE para a detecção de antígenos nos soros de indivíduos sadios, nos de pacientes com títulos variáveis de anticorpos anti-*T. cruzi*, frente aos soros pré-ímmune e hiperímmune de coelho anti-*T. cruzi* estão apresentados na Tabela 1. Através da IDRD, detectaram-se linhas de precipitação frente ao soro hiperímmune em 4 (4,70%) dos 85 soros não-concentrados, e em 2 (25,00%) dos 8 soros 5 vezes concentrados. Duas (2,35%) amostras de soros não-concen-

trados também apresentaram linhas de precipitação frente ao soro pré-ímmune. Através da CIE, detectaram-se linhas de precipitação em 4 amostras de soros (50,00%), tanto dos 8 não-concentrados como nos 5 vezes concentrados, embora em uma amostra de soro 5 vezes concentrado também se observaram linhas de precipitação frente ao soro pré-ímmune. A precipitação consistia em apenas uma linha de intensidade variável. Nos 5 soros controles normais testados por IDRD e CIE, não se observaram linhas de precipitação.

Quando os soros de pacientes com DC foram submetidos a SDS-PAGE, frações com peso molecular aparente de 29kDa a 180kDa foram fortemente coradas pelo *Coomassie brilliant blue R 250* a 0,25%. Quando submetidas ao teste de WB, frações com peso molecular aparente de 25 a 135kDa foram reconhecidas pelo soro humano hiperímmune anti-*T. cruzi*, enquanto a maioria das frações também foram reconhecidas pelo soro humano normal, no experimento controle.

Amostras de urinas concentradas de pacientes com DC na fase crônica (grupo VI), quando submetidas à SDS-PAGE e após coloração específica para proteínas, apresentaram frações com peso molecular aparente de 20kDa a 84kDa. Uma amostra de urina de indivíduo normal (grupo VIII) apresentou 2 frações com 55kDa e 82kDa. Quando submetidas ao teste de WB, 14 (48,27%) das 29 amostras de urina concentrada de pacientes com DC (grupos V e VI) analisadas apresentaram frações com peso molecular aparente de 23kDa a 76kDa. Uma amostra de urina de paciente com insuficiência renal crônica (grupo VII) apresentou frações de 35kDa a 160kDa e uma amostra de urina normal (grupo VIII) apresentou uma fração de 48kDa. No entanto, quando submetidas as mesmas amostras de urina ao WB e as tiras de nitrocelulose incubadas com soro pré-ímmune de coelho, a maioria das frações foram também reconhecidas.

Na padronização do ELISA para detecção de antígenos urinários de *T. cruzi*, os valores de absorvância obtidos em duplicata das 13 amostras de urina normal, concentrada forneceram um valor médio de $0,522 \pm 0,062$. Tendo definido como *cutoff* da reação a média dos controles negativos acrescida de 2 desvios-padrões (Freilij *et al.*, 1987 e Petray *et al.*, 1992), obteve-se o valor de 0,646 como ponto de corte para se caracterizar a reatividade das amostras analisadas.

Os resultados obtidos no ELISA, realizada nas amostras de urina dos grupos V, VI, VII e VIII, estão apresentados na Tabela 2. De 36 amostras de urina de pacientes com DC, na forma crônica ou congênita, 18 (50,0%) apresentaram reatividade superior ao *cutoff* do ELISA. Das 11 amostras de urina de

TABELA 1
Frequência de positividade na detecção de antígenos circulantes do *T. cruzi* através de IDRD e CIE, nos soros de pacientes com DC e de indivíduos sadios

MÉTODO	Nº de soros testados	Formaram linhas de precipitação				Não formaram linhas de precipitação	
		Soro pré-imune de coelho		Soro hiperimune de coelho anti-T. cruzi			
		n	%	n	%	n	%
IDRD	85 ^a	02	2,35	04	4,70	81	95,30
	08 ^b	00	0,00	02	25,00	06	75,00
	05 ^c	00	0,00	00	0,00	05	100,00
CIE	08 ^a	00	0,00	04	50,00	04	50,00
	08 ^b	01	12,50	04	50,00	04	50,00
	05 ^c	00	0,00	00	0,00	05	100,00

IDRD: Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony; CIE: Contra-imunoelektroforese; DC: Doença de Chagas; a: amostra de soro de paciente com DC não concentrado; b: amostra de soro de paciente com DC 5 vezes concentrado; c: amostra de soro de indivíduo sadio.

pacientes com outras doenças, 5 (45,0%) apresentaram valores mais elevados que o *cutoff*. Das 13 amostras de urina de indivíduos sadios, nenhuma apresentou reatividade ao ELISA proposto. A sensibilidade obtida foi de 50,0% (33,20-66,80%) e a especificidade foi de 79,20% (57,30-92,10%). Não levando em consideração a prevalência da DC na população estudada, tem-se o valor preditivo positivo de 78,30% (55,8-91,70%) e o valor preditivo negativo de 51,40% (34,70-67,50%), com o coeficiente *k* de 0,2675 (desvio-padrão de 0,1175, Estatística *Z* = 2,28, *p* = 0,011), que segundo Landis & Koch, apud Kramer & Feinstein (1981), tem uma concordância razoável.

Teste De Wb para detecção de anticorpos específicos contra frações antigênicas do *T. cruzi*

As amostras de soros dos grupos I, II, III e IV, quando submetidas ao teste de WB reconheceram as diferentes frações antigênicas da cepa Y do *T. cruzi*, em frequência e intensidade de reação variáveis. As amostras do grupo I reconheceram, em média, 7,71 frações da suspensão anti-

gênica da cepa Y do *T. cruzi*, enquanto as amostras dos grupos II, III e IV reconheceram, em média, 1,47, 0,98 e 0,28 frações, respectivamente. Nenhuma amostra dos grupos II, III e IV reconheceu mais que 5 frações antigênicas.

A Tabela 3 apresenta os títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* obtidos na reação da IFI, a relação entre valor da absorbância da amostra no ELISA para o diagnóstico sorológico da DC e o valor do *cutoff* e os resultados do teste de WB nas amostras dos grupos I, II, III e IV analisadas. Das 136 amostras de soros de pacientes com DC, 118 (86,8%) apresentaram resultado positivo no teste de WB, 16 (11,76%), indeterminado e 2 (1,47%), negativo. Nas 23 amostras do grupo II, constituído de pacientes com resultados contraditórios na reação de IFI e no ELISA empregadas na triagem sorológica inicial, nenhuma teve resultado positivo no WB, 14 (60,86%) apresentaram resultado indeterminado e 9 (39,13%), negativo. Das 53 amostras de soro de pacientes com outras doenças, 28 (52,83%) apresentaram padrão indeterminado de reatividade no teste de WB e 25 (47,16%), negativo. Das 50 amostras de soros de indivíduos sadios, 42 (84,0%) apresentaram resultado negati-

TABELA 2
Resultados da reatividade das amostras de urina dos grupos V, VI, VII e VIII no ELISA, para detecção de antígenos de *T. cruzi*

GRUPO	Diagnóstico	ELISA ^a reagente			ELISA não-reagente			TOTAL
		n	%	Relação ^b Abs/cutoff	n	%	Relação Abs/cutoff	
V	DC crônica	11	50,0	1,000 - 2,422	11	50,0	0,478 - 0,917	22
	DC congênita	05	50,0	1,145 - 1,345	05	50,0	0,804 - 0,950	10
VI	DC crônica	02	50,0	1,017 - 1,029	02	50,0	0,846 - 0,852	04
VII	Malária	01	25,0	1,018	03	75,0	0,763 - 0,794	04
	Esquistossomose mansônica	01	33,0	1,151	02	66,7	0,823 - 0,866	03
	IRC	01	50,0	3,434	01	50,0	0,755	02
	LTA	02	100,0	1,160 - 1,226	00	00,0	0,000	02
VIII	Normal	00	00,0	0,000	13	100,0	0,662 - 0,958	13

a: ELISA: Enzaimunoensaio de duplo anticorpo em placas sensibilizadas com 8,50µg/ml de IgG de soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi*, 60,68µg/ml IgG soro hiperimune humano anti-*T. cruzi* para detecção, conjugado de coelho anti-IgG humano-peroxidase 1:50.000, revelada com OPD-H₂O₂, leitura 492nm, *cutoff* 0,646 (X negativos + 2 DP); especificidade: 79,20%; sensibilidade: 50,00%; valor preditivo positivo: 78,30%; valor preditivo negativo: 51,40%; b: relação do valor da absorbância obtida com a amostra e o *cutoff* do ELISA (492nm); DC: Doença de Chagas; IRC: Insuficiência renal crônica; LTA: Leishmaniose tegumentar americana.

TABELA 3
Relação dos resultados obtidos na reação de IFI e no ELISA para o diagnóstico sorológico da DC e no teste de *Western Blot* (WB) realizados nas amostras de soros dos grupos I, II, III e IV

Grupo	Resultado das reações sorológicas para DC		Nº de amostras de soros	Título de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> na IFI	Relação Abs/cutoff do ELISA	Resultado no WB					
						P		I		N	
	IFI	ELISA				n	%	n	%	n	%
I	R	R	136	1:40 - 1:10.240	1,264 - 11,627	118	86,8	16	11,76	2	1,47
II	R	NR	4	1:80 - 1:160	0,613 - 0,845	0		3		1	
	NR	R	19	< 1:40	1,077 - 2,414	0		11		8	
			23	< 1:40 - 1:160	0,613 - 2,414	0		14	60,86	9	39,13
III	R	NR	3	1:40 - 1:80	0,341 - 0,538	0		2		1	
	NR	R	1	< 1:40	1,497	0		1		0	
	NR	NR	49	< 1:40	0,148 - 0,853	0		25		24	
			53	< 1:40 - 1:80	0,148 - 1,497	0		28	52,83	25	47,16
IV	NR	NR	50	< 1:40	0,099 - 0,871	0		8	16,0	42	84,0

IFI: Imunofluorescência indireta; ELISA: Enzaimunoensaio; WB: *Western Blot*; R: Reagente; NR: Não-reagente; Abs: Absorbância de 490nm; P: Positivo; I: Indeterminado; N: Negativo; DC: Doença de Chagas.

Grupo I: Amostras de soros de pacientes com DC.

Grupo II: Amostras de soros de pacientes com apenas uma reação sorológica reagente para DC.

Grupo III: Amostras de soros de pacientes com outras doenças.

Grupo IV: Amostras de soros de indivíduos sadios.

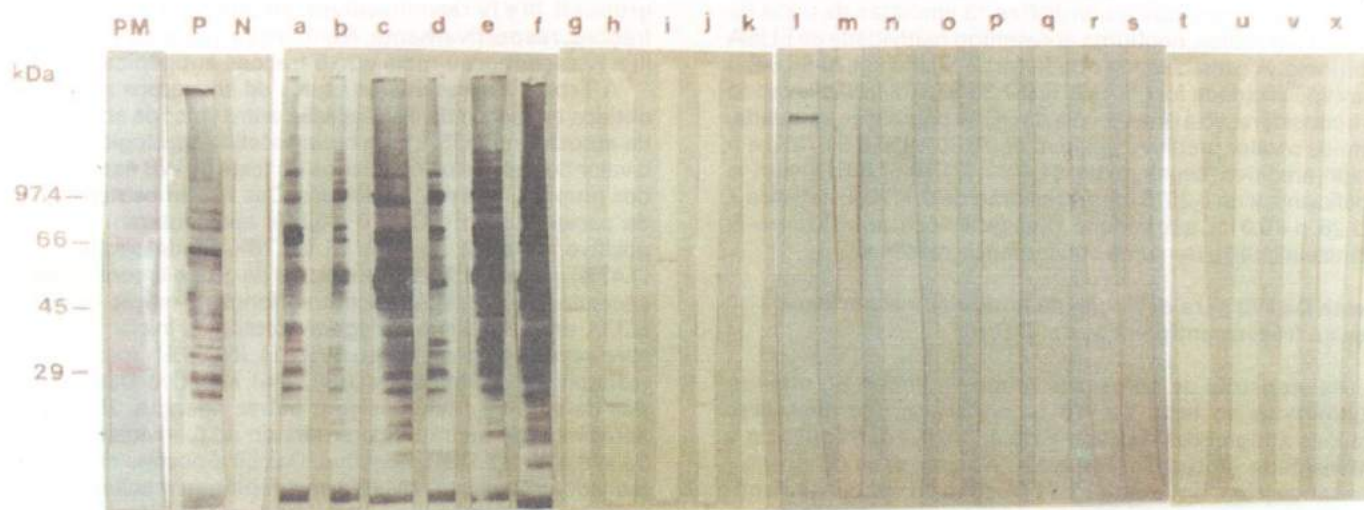


Fig. 1 - Western Blot de frações antigênicas de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, reconhecidas pelas amostras de soros do grupo I, de pacientes com doença de Chagas (linhas a-f); grupo II, de pacientes com apenas uma reação sorológica reagente para doença de Chagas (linhas g-k); grupo III, de pacientes com outras doenças (linhas l-s) e grupo IV, de indivíduos sadios (linhas t-y). Padrões de peso molecular (PM), soro controle positivo (P), soro controle negativo (N). As amostras de soros foram diluídas a 1:100, conjugado anti-IgG humana-peroxidase a 1:2.000 e 4-cloro-1-naftol como substrato.

vo, apenas 8 (16,0%) padrão indeterminado e nenhuma amostra apresentou resultado positivo no teste de WB. A sensibilidade foi de 86,80% (79,69-91,89%) e a especificidade de 100,00% (91,10-100,00%), com intervalo de confiança de 95,00%. Não levando em consideração a prevalência da DC na população estudada, obteve-se valor preditivo positivo de 100,00% (96,10-100,00%), valor preditivo negativo de 73,50% (61,20-83,20%) e coeficiente k de 0,7789 (estatística $Z = 10,89$, $p < 0,0001$). Segundo Landis & Koch, apud Kramer & Feinstein (1981), houve uma concordância considerável.

Quando 136 amostras de soros do grupo I foram submetidas ao teste de WB, 21 proteínas principais, com peso molecular aparente variando de 11 a 145kDa (11, 16, 25, 30, 33, 37, 39, 45, 49, 52, 60, 64, 70, 75, 82, 88, 92, 97, 100, 105, 120, 125, 130, 135 e 145kDa) foram reconhecidas, mas a frequência e intensidade de reação foram variáveis. As proteínas com 25, 30, 33, 37, 39, 45 e 70kDa foram reconhecidas por mais de 50,0% das amostras analisadas, com a frequência de 55,1%, 82,3%, 69,1%, 50,7%, 52,9%, 50,0% e 50,0%, respectivamente. Nas 23 amostras de soros do grupo II, o teste de WB permitiu detectar anticorpos que reconheceram proteínas com peso molecular aparente de 11 a 75kDa, sendo as de 30, 39 e 45kDa reconhecidas por 21,7% das amostras. Quando as 53 amostras de soros do grupo III foram submetidas ao teste de WB, em 25 amostras nenhuma proteína foi reconhecida. Nas 28 restantes, proteínas com peso molecular de 16 a 160kDa foram reconhecidas, todas com frequência inferior a 19,0% e com fraca intensidade de reação. Das 50 amostras de soros do grupo IV, somente 8 reconheceram fracamente frações protéicas com peso molecular de 18 a 97kDa, com frequência não superior a 6,0%.

A Figura 1 mostra os padrões de reatividade obtidos nas amostras de soros dos grupos I, II, III e IV, quando analisadas pelo teste de WB.

DISCUSSÃO

Altos índices de positividade na detecção de antígenos solúveis, empregando técnicas com mais baixa sensibilidade, tais como a FC e a precipitação em gel, foram obtidos por Siqueira *et al.* (1966), para a DC. Deve-se ressaltar que

esses resultados podem ter sido decorrentes dos altos índices de antigenemia apresentados pelos animais estudados. Araújo (1979) demonstrou que a maior concentração de antígenos circulantes de *T. cruzi*, detectada por CIE e FC no plasma de animais agudamente infectados, estava presente durante o pico de parasitemia. Considerando que as amostras de soros analisadas em nosso trabalho eram provenientes de pacientes com DC na fase crônica, quando ocorre uma baixa ou até mesmo não-detectável parasitemia, os índices de positividade de 4,70% a 25,0% obtidos na IDRD, e de 50%, na CIE, estão de acordo com os relatados na literatura (Tabela 1).

A simples SDS-PAGE de soros de pacientes com e sem DC não possibilitou o reconhecimento de frações específicas do *T. cruzi*, devido ao grande número de frações com peso molecular semelhante e possivelmente comum aos soros de pacientes com DC, ao soro normal (25 a 135kDa) e à suspensão antigênica do *T. cruzi* (18 a 115kDa). A não-obtenção de resultados satisfatórios poderia ser atribuída ao fato de que foram utilizadas amostras de soros não-concentradas e de pacientes na fase crônica da DC, quando a parasitemia é baixa.

Quando analisadas pelo método de WB obtivemos importante reação inespecífica, uma vez que a maioria das frações também foram reconhecidas pelo soro humano normal. A utilização de soros hiperimunes anti-*T. cruzi* de outras espécies animais e, conseqüentemente, de conjugados não-específicos contra IgG humana poderia melhorar a especificidade do reconhecimento das frações protéicas.

Na SDS-PAGE, a amostra de urina de indivíduo normal (grupo VIII) apresentou 2 frações protéicas com peso molecular aparente de 58 e 82kDa. O aparecimento dessas frações protéicas seria explicado pela proteinúria fisiológica. Sannazzaro *et al.* (1995) afirmaram que, mesmo em condições fisiológicas ideais, ocorre passagem normal, fisiológica, de proteínas séricas através dos capilares glomerulares até o espaço de Bowman, alcançando uma concentração na urina primitiva da ordem de 34-80mg%, segundo a técnica utilizada para a dosagem protéica.

Com relação aos resultados obtidos na SDS-PAGE das amostras de urina de pacientes com DC (grupos V e VI), as frações protéicas detectadas tinham peso molecular aparente de 20 a 84kDa, enquanto as frações com 20, 27, 45, 49 e 82-84kDa apresentavam peso molecular próximo ou semelhante às frações detectadas na suspensão antigênica da cepa Y do *T. cruzi*. Algumas destas frações são concordantes com as demonstradas por Freilij *et al.* (1987) que detectaram e caracterizaram glicoproteínas de *T. cruzi* com 80 e 55kDa na urina de crianças com DC aguda e congênita. Fernandes-Ferreira *et al.* (1989), quando analisaram amostras de urina concentradas 100 vezes de pacientes com DC, indicaram que pelo menos 3 frações protéicas, entre aquelas com 100, 98, 76, 72, 45 e 33kDa, estavam presentes.

Quando submetidas ao WB, as amostras de urina dos quatro grupos analisados, apresentaram frações que foram reconhecidas tanto pelo soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi* quanto pelo soro pré-imune de coelho, caracterizando um reconhecimento inespecífico das proteínas urinárias.

A especificidade do teste de WB poderia ser melhorada com a utilização de anticorpos mono-específicos contra antígenos de *T. cruzi* eliminados na urina (Corral *et al.*, 1989; Katzin *et al.*, 1989a; Katzin *et al.*, 1989b).

Tendo obtido resultados ainda não satisfatórios para o diagnóstico da DC, através desses métodos alternativos, avaliamos a detecção de frações do *T. cruzi* na urina, empregando o ELISA, o que poderia ser considerado equivalente como método de diagnóstico, à detecção do parasita inteiro, com a vantagem da maior rapidez na obtenção dos resultados. Embora exija tempo de aproximadamente de 7 horas para ser completado, é de fácil execução e apresentando índice de especificidade de 79,20%, com valor preditivo positivo de 78,30%, poderia ser considerado como técnica alternativa para elucidação ou confirmação de resultados sorológicos prévios. Quanto ao custo, essa técnica pode ser padronizada com soros policlonais obtidos em animais de laboratório, não exigindo reagentes de alto custo e utilizando uma infra-estrutura laboratorial já implantada para o diagnóstico de outras doenças, tais como a infecção pelo VIH. A utilização de mais de uma amostra de urina de cada paciente poderia aumentar a sensibilidade dessa reação para a detecção dos antígenos urinários, conforme recomendam Alexandre *et al.* (1994). No caso da DCC, a pesquisa de antígenos solúveis possibilitaria diagnóstico rápido da infecção, ainda durante a permanência da mãe e do recém-nato no hospital, viabilizando o tratamento precoce e o fato de que os antígenos do *T. cruzi*, circulantes ou na urina, deixam de ser detectados com a cura do paciente, torna esse método muito útil e prático para a monitorização dos resultados terapêuticos.

Os índices de especificidade e sensibilidade obtidos diferem dos já registrados na literatura, o que poderia ser explicado por vários fatores como a utilização de anticorpos policlonais e o método utilizado para a concentração das amostras de urina.

Por último, avaliamos o método de WB como alternativa para o diagnóstico confirmatório da DC.

Diferenças no peso molecular das proteínas reconhecidas pelos diferentes soros têm sido observadas quando resultados obtidos em diferentes estudos são comparados. Muitas dessas diferenças podem ser devidas a variações na mensuração da distância de migração da fração no gel (Teixeira *et al.*, 1994). Enquanto Snary & Hudson (1979) e Schechter *et al.* (1983) descreveram a reatividade do soro de pacientes com DC com a proteína de 90kDa, nossos resultados demonstraram reatividade com a proteína cujo peso molecular aparente era de 92kDa. Da mesma forma, Teixeira *et al.* (1994) demonstraram 74% de reatividade à proteína com 55kDa, enquanto nossos resultados apontam 43,38% de reatividade para a

proteína com 52kDa. A maior frequência de reatividade foi obtida com a proteína com 30kDa, quando 82,35% das amostras de soros de pacientes com DC a reconheceram. Este dado concorda com os relatados por Teixeira *et al.* (1994), que encontraram 100% de reatividade para a mesma proteína. Outra proteína de *T. cruzi*, com peso molecular de 25kDa, bem caracterizada por Scharfstein *et al.* (1985), foi reconhecida por 55,14% dos soros de pacientes com DC por nós analisados, não sendo reconhecida por soros de pacientes com outras doenças e por soros de indivíduos normais, confirmando sua especificidade e utilidade no imunodiagnóstico da DC.

Stolf (1992) cita que não há um consenso claro acerca da definição dos principais antígenos de *T. cruzi* na literatura, principalmente devido à sua complexidade antigênica, associada com as limitações dos resultados obtidos por diferentes técnicas. Na realidade, a maioria dos resultados podem ser definidos como um complexo padrão de reatividade do soro, demonstrando antígenos com pesos moleculares de 15 a 200kDa.

A frequência do número de frações reconhecidas pelas amostras dos soros dos grupos I, II, III e IV está de acordo com os resultados obtidos por Mendes *et al.* (1995), que foram de 12 para pacientes com DC, 0,63 para não chagásicos e 0,50 para pacientes com LTA.

A amostra foi por nós considerada positiva, no teste de WB proposto, quando reconhecia, pelo menos 5 frações entre as 10 que tiveram as maiores frequências de reconhecimento, ou seja entre as de 25, 30, 33, 37, 39, 45, 52, 70, 75 e 92kDa.

Grande número de antígenos polipeptídicos da forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi* foram reconhecidos pelos soros de pacientes com DC. A maioria dos polipeptídeos reconhecidos, com frequência e intensidade variável de cor, tinham peso molecular aparente de 11 a 145kDa. A sensibilidade de 86,80% foi obtida entre as 136 amostras de soros de pacientes com DC, quando a positividade do WB ocorreu em 118 amostras, as quais apresentaram altos valores de absorbância no ELISA, para a detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, e elevados títulos de anticorpos detectados pela reação de IFI. Em contraste, quando os níveis de anticorpos eram mais baixos, revelados pela menor absorbância do ELISA e menor título de anticorpos na IFI, o WB apresentou resultado indeterminado ou negativo, como se mostra na Tabela 3. Esses resultados indicam que as amostras que apresentaram títulos baixos de anticorpos anti-*T. cruzi*, com reatividade na "zona cinza" ou próxima do *cutoff* do ELISA e da IFI, não tiveram resultado confirmado pelo WB.

Das 23 amostras de soros do grupo II cujos resultados nas reações de ELISA e IFI para DC foram limítrofes, embora apresentassem anticorpos que reconhecessem antígenos polipeptídicos do *T. cruzi* com peso molecular aparente de 11 a 75kDa, esse reconhecimento ocorreu com menor frequência do que observada com as amostras de soros de pacientes com DC (grupo I). Nenhuma amostra apresentou a reatividade mínima considerada como critério de positividade para o WB, não tendo sido confirmado, o diagnóstico de DC.

Resultados falso-positivos na triagem sorológica inicial de doadores de sangue são esperados e devem ser elucidados. Em se tratando de candidatos a doador de sangue, o sangue colhido deve ser eliminado e o indivíduo encaminhado para acompanhamento clínico e laboratorial, com a realização de novos exames para a confirmação ou não dos resultados prévios. Não se confirmando a existência de infecção pelo *T. cruzi*, pelo teste de WB, ter-se-ia um importante dado que, juntamente com os exames clínicos e os dados epidemiológicos, poderia descartar-se o diagnóstico da DC. Assim, minimizaríamos as consequências médicas, sociais e legais de um resultado sorológico falso-positivo.

A especificidade de 100% obtida no teste WB foi decorrente dos resultados das 53 amostras de soros de pacientes com outras doenças (grupo III) e das 50 amostras de soros de indivíduos saudáveis (grupo IV). Embora 28 amostras do grupo III e 8 amostras do grupo IV apresentassem anticorpos que reconheceram antígenos polipeptídicos do *T. cruzi*, o número de frações, a frequência e a intensidade da reação foram insuficientes para considerá-las como sendo um resultado positivo. Em 8 amostras de soros de pacientes com LTA houve o reconhecimento de proteínas com peso molecular aproximado de 18, 30, 39, 45, 52, 64, 70 e 82kDa, tendo sido reconhecidas as proteínas de 18, 64 e 82kDa apenas por 1,47%, 14,7% e 23,52%, respectivamente, das amostras de soros de pacientes com DC, que poderiam corresponder a antígenos comuns ao *T. cruzi* e a *Leishmania sp.* que não são imunogênicos no *T. cruzi*.

Quanto ao procedimento técnico, os testes sorológicos para a pesquisa e a confirmação da presença de anticorpos anti-VIH, anti-HTLV I e anti-HTLV II têm trazido o método de WB para a rotina laboratorial. Em relação ao WB utilizado para a detecção de anticorpos específicos contra frações antigênicas do *T. cruzi*, além de apresentar índices de 86,8% de sensibilidade e 100% de especificidade, mostrou ser rápido, podendo efetuar-se em até 4 horas, sendo a leitura realizada visualmente ou por densitometria. Com relação ao procedimento técnico, as etapas de produção das tiras (SDS-PAGE e eletroimunotransferência) contendo as frações antigênicas do parasita, são as partes consideradas mais difíceis do teste. No entanto, uma vez produzidas, as tiras são geralmente estáveis (TSANG *et al.*, 1989).

A grande vantagem que vemos no teste de WB, além de proporcionar maior detalhamento da análise da resposta imune humoral para os diferentes antígenos do *T. cruzi*, é que pode aumentar a eficiência no diagnóstico da DC, na medida que possibilita a seleção de frações polipeptídicas mais específicas, associadas naturalmente em "poliantígenos", garantindo o reconhecimento específico pelos anticorpos anti-*T. cruzi* presentes na amostra a ser analisada, dando máxima sensibilidade ao teste.

CONCLUSÕES

A reação de contra-imunoelektroforese mostrou maior sensibilidade (50,00%) que a imunodifusão radial dupla de Ouchterlony (4,70-25,00%) na detecção de antígenos circulantes do *T. cruzi* nas amostras de soros analisadas;

Os métodos de eletroforese em gel de poliácridamida e *Western Blot* não permitiram a detecção de antígenos circulantes de *T. cruzi* nas amostras de soros analisadas devido ao grande número de frações com peso molecular aparente comum entre os soros analisados (25 a 135kDa) e a suspensão antigênica da cepa Y do *T. cruzi* (18 a 115kDa), assim como por causa do reconhecimento inespecífico da maioria das frações, tanto por intermédio de soro hiperimune humano anti-*T. cruzi* como pelo soro humano normal, no *Western Blot*;

O método de eletroforese em gel de poliácridamida permitiu a detecção de frações protéicas com peso molecular aparente de 20 a 84kDa em amostras de urinas de pacientes com doença de Chagas. Frações com peso molecular aparente de 58 e 82kDa foram detectadas em amostras de urina de indivíduos saudáveis, sendo atribuída sua presença à proteína fisiológica;

Através do *Western Blot*, a maioria das frações detectadas nas amostras de urina foram reconhecidas tanto pelo soro hiperimune de coelho anti-*T. cruzi* quanto pelo soro pré-imune de coelho, caracterizando um reconhecimento

inespecífico das proteínas urinárias pelos soros e conjugado empregados;

O ensaio imunoenzimático de "sanduíche" de duplo anticorpo utilizado apresentou sensibilidade de 50,00% e especificidade de 79,20%, na detecção de antígenos urinários de *T. cruzi* nas amostras analisadas;

Os anticorpos séricos presentes nas amostras de pacientes com doença de Chagas reconheceram pelo *Western Blot*, frações antigênicas da cepa Y do *T. cruzi*, com peso molecular aparente de 11 a 145kDa, tendo sido reconhecidas com maior frequência e com maior intensidade de reação as frações com 25, 30, 33, 37, 39, 45, 52, 70, 75 e 92kDa. O método de *Western Blot*, empregando antígenos de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, apresentou índices de 86,80% de sensibilidade e 100,00% de especificidade nas amostras de soro analisadas;

O padrão indeterminado de reatividade no *Western Blot* foi observado em 60,86% das amostras de soros de pacientes com apenas uma reação sorológica reagente para doença de Chagas (grupo II); em 52,83% das amostras de soros de pacientes com outras doenças (grupo III) e em 16,00% das amostras de soros de indivíduos saudáveis (grupo IV), confirmando a ocorrência de reatividade cruzada entre estruturas antigênicas comuns ao *T. cruzi* e a várias bactérias e parasitas, bem como a interação com aglutininas inespecíficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, S.R.; Altcheh, J.; Bertot, G.; Corral, R.; Grinstein, S.; Katzin, A. M.; Pereira-Chioccolla, V.L.; Petray, P.; Rapoport, M.; Silva Cruz, S.F.; Umezawa, E.S. Detection of urine antigens in chronic chagasic patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 89, supl I, p. 163, 1994.
- Alonso, J.M.; Pividori, S.; Guilleron, C. Antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi* em chagásicos de área endêmica. *Medicina (B. Aires)*, v. 46, p. 69-72, 1986.
- Amato Neto, V.; Nagasse, T.K.; Moreira, A.A.B.; Gomes, A. E.C.; Campos, R. Utilização, em politransfundidos, da pesquisa de anticorpos IgM anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Toxoplasma gondii* para detectar infecções pós-transfusionais recentes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 26, n.2, p. 83-86, 1984.
- Araújo, F.G. Immunology of Chagas' disease. I- Circulating antigens in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 18, n. 6, p. 433-439, 1976.
- Araújo, F.G. Studies on the circulating antigens of *Trypanosoma cruzi*. In: Congresso Internacional Sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 1979. Anais...Rio de Janeiro, 1979. p. F-11-13.
- Araújo, F.G.; Guptill, D. Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 33, n. 3, p. 362-371, 1984.
- Bittencourt, A.L. Doença de Chagas congênita na Bahia. *Rev. Baiana Saúde Pública*, v. 11, p. 159-209, 1984.
- Bittencourt, A.L.; Vieira, G.O.; Tavares, H.C.; Mota, E.; Maguirre, J. Esophageal involvement in congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 33, n. 1, p. 30-34, 1984.
- Camargo, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypansomies in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 6, p. 93-100, 1964.
- Camargo, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modifica-

- tion employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 8, p. 227-234, 1966.
11. Camargo, M.E. Serological diagnosis: an appraisal of Chagas' disease serodiagnosis. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M. E.; Rassi, A. *Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT Brazil 92, São Paulo, Brazil, p. 165-178, 1992a.
12. Camargo, M.E. Apreciação das técnicas sorológicas atuais para o diagnóstico da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 25, supl. III, p. 10-11, 1992b.
13. Camargo, M.E. Diagnosis of Chagas' disease, a challenge for serology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 90, supl. I, p. 32-33, 1995.
14. Camargo, M.E.; Amato Neto, V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 16, n. 4, p. 200-202, 1974.
15. Chiari, E. Diagnostic tests for Chagas' disease. Parasitological diagnosis. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E.; Rassi, A. *Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT 92, São Paulo, Brazil, p. 153-163, 1992.
16. Chocair, P.R.; Sabbaga, E.; Amato Neto, V.; Shiroma, M. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. In: Congresso Internacional Sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 1979. *Anais...* 1979. p. 43.
17. Chocair, P.R.; Sabbaga, E.; Amato Neto, V.; Shiroma, M.; Góes, G.M. de. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 23, n. 6, p. 280-282, 1981.
18. Corral, R.; Örn, A.; Freilij, H.; Bergman, T.; Grinstein, S. *Trypanosoma cruzi*: purification and characterization of an 80-kDa urinary antigen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 83, supl. I, p. 138, 1988.
19. Corral, R.S.; Örn, A.; Freilij, H.L.; Bergman, T.; Grinstein, S. Purification and characterization of an 80-kDa *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, n. 1, p. 145-151, 1989.
20. Corral, R.S.; Örn, A.; Grinstein, S. Detection of soluble exoantigens of *Trypanosoma cruzi* by a dot-immunobinding assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 46, n. 1, p. 31-38, 1992.
21. Dias, J.C.P. Epidemiology Of Chagas' disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M. E.; Rassi, A. *Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT Brazil 92. São Paulo. 1992, p. 49- 80.
22. Dias, J.C.P. Chagas' disease control: current status and perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 88, supl., p. 93-96, 1993.
23. Fernandes-Ferreira, E.; Junqueira, A.C.V.; Bongertz, V. *Trypanosoma cruzi*: circulating antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 84, supl. II, p. 83, 1989.
24. Ferraz, A.S.; Figueiredo, J.F.C. Transmission of Chagas' disease through transplanted kidney: occurrence of the acute form of the disease in two recipients from the same donor. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 35, n. 5, p. 461-463, 1993.
25. Ferreira, A.F.A.; Furtado, P.B.; Nakasawa, M.; Abath, F.G. C.; Malta, J.A.; Gomes, Y.M. Reevaluation of the diagnosis of Chagas' disease in patients with previous conflicting serological diagnosis: use of indirect immunofluorescence and Western Blotting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 90, supl. I, p. 175, 1995.
26. Freilij, H. Congenital Chagas' disease in a non endemic area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, supl. II, p. 78-79, 1992.
27. Freilij, H.L.; Corral, R.S.; Katzin, A.M.; Grinstein, S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 25, n. 1, p. 133-137, 1987.
28. Israelski, D.M.; Sadler, R.; Araújo, F.G. Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 39, n. 5, p. 445-455, 1988.
29. Katzin, A.M.; Alves, M.J. M.; Abuin, G.; Colli, W. Antigenuria in chronic chagasic patients detected by a monoclonal antibody raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, p. 341-343, 1989a.
30. Katzin, A.M.; Marcipar, A.; Freilij, H.; Corral, R.; Yanovsky, J. F. Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' disease by agglutination test. *Exp. Parasitol.*, v. 68, p. 208-215, 1989b.
31. Katzin, A.M.; Umezawa, E.S. Detection of urinary *T. cruzi* antigens in human chronic chagasic patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86, supl. I, p. 69-70, 1991.
32. Kohanteb, J.; Ardehali, S.M.; Rezai, H.R. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 578-580, 1987.
33. Kramer, M.S.; Feinstein, A.R. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 29, n. 1, p. 111-123, 1981.
34. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)*, v. 227, p. 680-685, 1970.
35. Lorca, M. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Chile. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 26, supl. II, p. 27-28, 1993.
36. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265, 1951.
37. Luquetti, A.O. New advances in diagnosis: recombinant antigens and synthetic peptides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 88, supl., p. 61-62, 1993.
38. Medina-Lopes, M. das D.; Rosa, A.C.O.; Teixeira, A.R.L. Fatores que determinam a transmissão materno-infantil da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 25, supl. III, p. 91, 1992.
39. Mendes, R.P.; Hoshino-Shimizu, S.; Silva, A.M.M. da; Mota, I.; Luquetti, A.O.; Rimmel, A.; Guzman Heredia, A.; Leser, P.G. Confirmative technique for Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 90, supl. I, p. 173, 1995.
40. Moretti, E.R.A.; Basso, B.; Vottero-Cima, E. Exoantigens of *Trypanosoma cruzi*. I. Conditions for their detection and immunogenic properties in experimental infections. *J. Parasitol.*, v. 32, n. 1, p. 150-153, 1985.
41. Ouassii, M.A.; Taibi, A.; Loyens, M.; Martin, U.; Afchain, D.; Maidana, C.; Caudioti, C.; Cornette, J.; Martelleur, A.; Velge, P.; Marty, B.; Capron, A. *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 45, n. 2, p. 214-225, 1991.
42. Pehrson, P.O.; Wahlgren, M.; Bengtsson, E. Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 31, n. 3, p. 449-451, 1982.
43. Petray, P.; Bonardello, N.; Clark, R.; Agranatti, M.; Corral, R.; Grinstein, S. Evaluación del método de ELISA para detección de antígenos y complejos inmunes circulantes

- de *Trypanosoma cruzi* através de um estudo de campo em uma zona endêmica de Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 34, n. 2, p. 141-147, 1992.
44. Rassi, A.; Porto, C.C.; Rezende, J.M. de. Doença de Chagas. In: Amato Neto, V.; Baldy, J.L. da S. *Doenças Transmissíveis*. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 1989, p. 247-263.
 45. Reiche, E.M.V.; Inouye, M.M.Z.; Pontello, R.; Morimoto, H. K.; Itow Jankevicius, S.; Jankevicius, J. V. Rates of positive serological reactions for Chagas' disease in blood donors of the Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, Londrina, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 89, supl. I, p. 166, 1994a.
 46. Reiche, E.M.V.; Inouye, M.M.Z.; Pontello, R.; Vogler, I.H.; Jankevicius, J.V. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in patients attended by different clinics at Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, Londrina, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 89, supl. I, p. 166, 1994b.
 47. Rocha, A.; Meneses, A.C.O. de; Silva, A.M. da; Ferreira, M. S.; Nishioka, S.A.; Burgarelli, M.K.N.; Almeida, E.; Turcato Jr. G.; Metze, K.; Lopes, E.R. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 50, n. 3, p. 261-268, 1994.
 48. Romanha, A.J. Utilização do PCR no diagnóstico da doença de Chagas humana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 25, supl. III, p. 27-29, 1992.
 49. Sannazzaro, C.A.C.; Coelho, L.T.; Rosin, C.A.; Juncioni, M.R. Fisiopatologia da proteinúria. *LAES & HAES*, Ano XVI, n. 92, p.42-54, 1995.
 50. Sarasúa, W.M. Detection de la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Artigas, Uruguay. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 26, supl. II, p. 28, 1993.
 51. Scanduzzi, M.C.P.; Garcia, M.P.; Lauria-Pires, L.; Tinoco, D.L.; Teixeira, A.R.L. Confirmation by immunoblotting of doubtful serological results for Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86, supl. I, p. 226, 1991.
 52. Scharfstein, J.; Luquetti, A.; Murta, A.C.M.; Senna, M.; Rezende, J.M.; Rassi, A.; Mendonça-Previato, L. Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp 25 antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 34, n. , p. 1153-1160, 1985.
 53. Schechter, M.; Voller, A.; Marinkelle, C.J.; Flint, J.E.; Guhl, F.; Miles, M.A. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of south american trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet*, p. 939-941, 1983.
 54. Schmunis, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, v. 31, n. 6, p. 547-557, 1991.
 55. Shikanai-Yasuda, M.A.; Tolezano, J.E.; Lopes, M.H.; Higaki, Y.; Moreira, A.A.B.; Odoni, V.; Barone, A.A.; Umezawa, E.S.; Guilherme, S.C.; Funayama, G.; Shiroma, M.; Nunes, E.V.; Possi, D.; Oselka, G.; Amato Neto, V. Doença de Chagas aguda no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: vias de transmissão e controle pós-terapêutico. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 31, supl. 7, p. S17, 1989.
 56. Siqueira, A.F.; Ferrioli Filho, F.; Carneiro, J. da R. Um antígeno solúvel presente no soro de ratos infectados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 8, n. 3, p. 148, 1966.
 57. Snary, D.; Hudson, L. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS. LETT.*, v. 100, p. 166-170, 1979.
 58. Soussumi, L.M.T.; Bonini, P.V.; Piuvezam, M.; Silva, J.S.; Voltarelli, J.; Covas, D. Confirmação sorológica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* por Western Blotting. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, supl. I, p. 173, 1994.
 59. Stolf, A.M.S. *Trypanosoma cruzi* antigens in serodiagnosis. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E.; Rassi, A. *Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT Brazil 92. São Paulo, Brazil, 1992, p. 195-205.
 60. Szarfman, A.; Cossio, P.M.; Arana, R.M.; Urman, J.; Kreutzer, E.; Laguens, R.P.; Segal, A.; Coarasa, L. Immunologic and immunopathologic studies in congenital Chagas' disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 4, p. 489-499, 1975.
 61. Teixeira, M.G.M.; Borges Pereira, J.; Netizert, E.; Souza, M.L.N.X.; Peralta, J.M. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop. Med. Parasitol.*, v. 45, p. 308-312, 1994.
 62. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
 63. Tsang, V.C.W.; Brand, J. A.; Boyer, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer Blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infec. Dis.*, v. 1, p. 50-59, 1989.
 64. Umezawa, E.S.; da Silveira, J.F.; Cotrin, P.C.; Paranhos, G.S.; Shikanai-Yasuda, M. A.; Katzin, A.M. Detection of urinary *T. cruzi* antigens in human chronic chagasic patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86, supl. I, p. 225, 1991.
 65. Umezawa, E.S.; Shikanai-yasuda, M.A.; da Silveira, J.F.; Cotrim, P.C.; Paranhos, G.S.; Katzin, A.M. *Trypanosoma cruzi*: Detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetitive antigen. *Exp. Parasitol.*, v. 76, p. 352-357, 1993.
 66. Vieira, G.O.; Maguire, J.; Bittencourt, A.L.; Fontes, J.A.S. Doença de Chagas congênita. Apresentação de um caso com paralisia cerebral. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 25, n. 6, p. 305-309, 1983.
 67. Voller, A.; Draper, C.; Bidwell, D.E.; Bartlett, A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet*, p. 426-428, 1975.
 68. Voller, A.; Bidwell, D.; Bartlett, A. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Rose, R.N.; Friedman, H. (eds). *Manual of Clinical Immunology*. Washington: American Society for Microbiology, 1980. cap.45, p. 359-351.
 69. Zar, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 662 p.
 70. Wendel, S. Blood banking preventive approaches for Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 88, p. 59-60, 1993a.
 71. Wendel, S. Triagem sorológica em doadores de sangue para doença de Chagas: o dilema da notificação e aconselhamento do doador reativo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 26, supl. II, p. 74-75, 1993b.

Endereço para correspondência
Edna Maria Vissoci Reiche
Rua Piauí, 717 - apto. 201
86.020-320 - Londrina, PR

Saúde em assentamentos rurais: uma questão de parcerias e política social

Health in rural settlement: a question of partnership and social policy

Áurea R. Telles Pupulin¹, Vanalice Paulino², Ana Paula Agostinho Mexia²,
Iracilides Borges² & Silvana Marques de Araújo¹

RESUMO – Através de convênio estabelecido entre a Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a Cooperativa Central de Reforma Agrária (CCA), com a participação de acadêmicos do curso de Enfermagem da UEM, foi realizado um estudo para determinar a prevalência de enteroparasitos no Assentamento Novo Paraíso – Pitanga/PR. Um total de 101 amostras fecais foi coletado sendo 42 amostras de crianças de 0 a 14 anos e 59 de adultos. Foram utilizados os métodos parasitológicos de Kato-Katz e Willis modificado com sulfato de zinco. As famílias responderam a um questionário sobre condições de vida e saneamento básico no assentamento. Após o diagnóstico parasitológico e análise das respostas do questionário, foi feito o tratamento específico dos parasitados e foram desenvolvidas atividades de educação sanitária. Estas atividades abordaram transmissão, profilaxia e controle das enteroparasitoses, noções de higiene pessoal, nutrição e cuidados com os alimentos, enfocando principalmente a água. Após 2 meses de trabalho foram realizados novos exames parasitológicos concluindo-se que embora a melhoria possa ser constatada ela não é totalmente efetiva. O saneamento básico e a educação sanitária são as mais importantes medidas administrativas a serem pensadas. A necessidade de se fazer trabalhos continuados fica evidente, mesmo em comunidades organizadas.

PALAVRAS-CHAVE – Enteroparasitoses; Assentamentos; Profilaxia e controle.

SUMMARY – An agreement between the State University of Maringá (UEM) and the Central Cooperative for Agricultural Reform (CCA), with the participation of some nursing academics from UEM, was set up to develop a survey of intestinal parasites in Novo Paraíso, a rural settlement in Pitanga-Paraná, Brazil. A total of 101 stools specimens were collected. Forty-two and 59 samples were collected from children (0-14 years) and adults, respectively. These samples were examined by Kato-Katz and Willis Zinc modified techniques. Families in the settlement was asked to fill in a questionnaire about their lives and basic sanitation conditions. Right after the diagnosis and questionnaire analysis a treatment was initiated with the infected people. Also, sanitary measures were taken and basic hygiene lessons were taught. Discussion about intestinal parasite transmission, prophylaxis and control of intestinal parasites, basic hygiene notions, nutrition and special care with food water, were carried out. After two month of work new parasitological tests were done but a not very satisfactory result was achieved. Still, basic sanitation, basic personal hygiene notions and health educational are the most important administrative decision to be taken. It seems clear that a serious and continued work is essential to control intestinal parasites even in organized communities.

KEY WORDS – Intestinal parasites; Prophylaxis and control; Rural settlement.

INTRODUÇÃO

A saúde é uma das primeiras necessidades do povo. As doenças de um modo geral, incluindo as enteroparasitoses conduzem a uma perda sócio-econômica da família e da comunidade.¹ Os programas de controle das parasitoses intestinais em colaboração com outros programas coletivos de saúde mostram-se efetivos e muito bem sucedidos quando há entre eles integração.¹ A OMS preconiza a participação dinâmica da população nos programas de controle² e como salientado por pesquisadores que trabalham não apenas no controle de parasitoses intestinais, mas em outros tipos de parasitoses, ações educativas conduzidas de forma concreta constituem instrumento facilitador da participação.³ As campanhas de controle e erradicação das

enteroparasitoses não requerem ações que exijam equipamentos médicos complexos, de alta e avançada tecnologia nem de mão-de-obra técnica altamente especializada, mas são necessárias decisões radicais com conscientização das comunidades sobre higiene e educação sanitária onde os cuidados com alimentos, água e destino de dejetos sejam enfocados primordialmente. A Universidade através dos professores, alunos e funcionários envolvidos em projetos de extensão é elemento valioso para a divulgação dos conhecimentos básicos de educação comunitária e incentivo à mudança de hábitos.

Os assentamentos rurais na região sul são geralmente organizados pelo Movimento Sem Terra (MST) carregando consigo o preconceito que a mídia impinge à sociedade brasileira. Seus integrantes são vistos como pessoas que

Recebido em 18/11/96

¹Setor de Parasitologia Básica, ²Departamento de Enfermagem,
Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR - CP 331 - Cep: 87020-900

invadem terras promovendo anarquia. Este trabalho apresentará um outro lado dos assentamentos, que muitas pessoas desconhecem. A força de vontade, capacidade de lutar, trabalhar, progredir, e produzir de pessoas que passam por dificuldades de todo nível caracterizam estas populações que com apoio de órgãos competentes crescem e se mostram orgulhosas e agradecidas pelo desenvolvimento alcançado.

Convênios estabelecidos entre a Universidade Estadual de Maringá e a Cooperativa Central de Reforma Agrária (CCA) permitem o desenvolvimento de projetos sobre diferentes temas por acadêmicos de vários cursos. Estes alunos passam não só a conhecer a realidade dessas comunidades como atuam de forma decisiva na melhoria da qualidade de vida dos assentados.

O Assentamento Novo Paraíso localizado em Pitanga/Pr., com 27 famílias, é composto de uma população jovem, trabalhando em regime de cooperativa, não dispõe de qualquer serviço de saúde e possui precárias condições sanitárias e de higiene.

Baseado nas informações obtidas a respeito desta comunidade este trabalho foi orientado no sentido de promover a esta população melhoria de vida de uma maneira geral, através de conscientização dos problemas existentes a nível de saúde envolvendo doenças parasitárias, higiene, saúde pública e nutrição.

MATERIAL E MÉTODOS

População estudada: O Assentamento Novo Paraíso fica a 32 km da cidade de Pitanga/Pr., ocupa uma área de 720 hectares regularizada em junho/1992. Possui 24 casas sendo 12 de lona (50%), 11 de madeira e lona (45,8%) e 1 de madeira (4,2%), geralmente com quatro pessoas ou mais residindo em um espaço de cerca de 10 m². As residências são de chão batido com banheiro sempre situado ao lado da casa com fossa séptica.

As casas têm sua pequena horta, mas geralmente utilizam a horta comunitária que fica a 400 m das residências. Com relação aos animais existentes no assentamento podem ser destacados cães, gatos, galinhas e patos que são criados em liberdade. Caprinos, bovinos, equinos e suínos são criados em regime de confinamento.

Com relação a água para abastecimento da comunidade apesar de existir um poço artesiano já perfurado, por questões burocráticas ainda não fora instalado. Desta forma o fornecimento de água era feito por uma fonte duvidosa, sem as mínimas condições de higiene de onde também os animais se serviam livremente.

A alimentação em dias de trabalho é feita em refeitório comunitário, ao final de semana as refeições são feitas individualmente em cada casa.

A população deste assentamento é constituída por 101 pessoas com idades que variam de um mês a 47 anos. A maioria trabalha. Até os sete anos as crianças ficam na creche recebendo cuidados das mulheres que não têm condições de realizar outras ocupações (mulheres que amamentam). Quando completam sete anos, as crianças vão para a escola localizada na própria fazenda e retornam em outro período para a creche. A partir dos 11 anos, começam a trabalhar por meio período. Como os assentados trabalham em regime de cooperativa são anotadas todas as horas trabalhadas por cooperado por período.

O acesso a uma consulta médica é praticamente impossível para os assentados uma vez que a cidade mais próxima localiza-se a 32 km do assentamento. Além disso, o posto de saúde começa a atender às sete horas da manhã e os habitantes do assentamento não têm como chegar mais cedo. São obrigados em muitas ocasiões recorrer a fitoterápicos como alternativa de cura.

METODOLOGIA

Informações coletadas no assentamento: Através de questionário próprio foram investigadas condições de vida e de saneamento básico das 27 famílias assentadas.

Exame parasitológico de fezes: Foram realizados 101 exames parasitológicos de fezes em crianças e adultos do assentamento. Os métodos parasitológicos usados foram: Kato Katz⁴ e Willis modificado com sulfato de zinco.⁵

Após o diagnóstico parasitológico as crianças e adultos receberam tratamento aloterápico específico. Dois meses após o tratamento foram realizados novamente os exames coprológicos para controle de cura.

Educação sanitária: Após análise das respostas do questionário e o resultado do primeiro exame parasitológico da comunidade foram realizadas reuniões com líderes da comunidade com o objetivo de se estabelecer medidas viáveis para melhoria das condições de vida da população.

O trabalho de educação sanitária para os adultos consistiu de palestras mensais perfazendo um total de 6 palestras sobre nutrição e cuidados com os alimentos, transmissão e profilaxia das enteroparasitoses. Paralelamente foi feita a distribuição de panfletos educativos abordando principalmente a questão da água como veiculador de patógenos. Para as crianças foram realizados teatros e brincadeiras sobre as parasitoses e higiene.

As comparações estatísticas foram feitas utilizando-se o teste do Qui-quadrado com nível crítico de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram realizados 101 exames parasitológicos de fezes sendo 42 de crianças (0 a 14 anos) e 59 de adultos, ou seja, em 100% da população assentada.

A Tabela 1 mostra que das 42 crianças examinadas, 29 apresentaram resultados positivos para enteroparasitas (69%). Para a população adulta, dos 59 indivíduos examinados 31 apresentaram resultados positivos (52,6%).

A Tabela 2 expressa a prevalência de protozoários e helmintos intestinais sendo que o maior percentual foi

TABELA 1
Positividade de exames parasitológicos de fezes em crianças de 0 a 14 anos e adultos do Assentamento Novo Paraíso - Pitanga/Pr., 1995

Resultado	Nº de Crianças	%	Nº de Adultos	%
Positivos	29	69	31	52,6
Negativos	13	31	28	47,4
Total	42	100	59	100

TABELA 2
Prevalência de protozoários, helmintos e poliparasitismo em crianças e adultos do Assentamento Novo Paraíso - Pitanga/Pr., 1995

Parasito	Nº de Crianças	%	Nº de Adultos	%
Protozoários	5	17,25	14	46
Helmintos	4	13,79	11	34,5
Protozoários/Helmintos	20	68,96	06	19,5
Total	29	100	31	100

TABELA 3
Diferentes espécies de protozoários e helmintos em crianças de 0 a 14 anos e adultos no Assentamento Novo Paraíso - Pitanga/Pr., 1995

Parasito	Nº de Crianças	%	Nº de Adultos	%
<i>E. coli</i>	18	42.9	12	20.3
<i>G. lamblia</i>	09	21.4	06	10.2
<i>E. histolytica</i>	06	14.3	02	3.4
<i>E. nana</i>	04	9.5	02	3.4
<i>I. butschili</i>	0	0	02	3.4
<i>A. lumbricoides</i>	08	19.0	01	1.7
<i>Ancilostomídeos</i>	06	14.3	11	18.6
<i>S. stercoralis</i>	05	11.9	03	5.1
<i>H. nana</i>	03	7.1	01	1.7
<i>Taenia sp.</i>	0	0	01	1.7

observado para poliparasitismo (protozoários e helmintos) na faixa etária de 0 a 14 anos enquanto que para a população com faixa etária >14 anos obteve-se uma maior prevalência de protozoários.

A Tabela 3 mostra as diferentes espécies de protozoários e helmintos na população adulta e infantil. Na população infantil a espécie *Ascaris lumbricoides* (8 casos - 19%) foi a mais freqüente seguida por *Ancilostomídeos* (6 - 14,3%) e *Strongyloides stercoralis* (5 - 11,9%). Para os protozoários obteve-se maior freqüência de *Entamoeba coli* (18 - 42%) seguida de *Giardia lamblia* (9 - 21,4%) e *Entamoeba histolytica* (6 - 14,4%). Na população adulta os ancilostomídeos foram os helmintos mais freqüentes (11 - 18,6%). Com relação aos protozoários *Entamoeba coli* (12 - 20,3%) foi a espécie mais freqüente seguida de *Giardia lamblia* (6 - 10,2%).

Após a detecção das parasitoses mais freqüentes nos assentados foi estabelecido um programa para o controle destas. Toda a população parasitada foi submetida às atividades de educação sanitária e tratada com medicação específica.

Com relação a comportamento e atitudes, a população infantil passou a usar calçados constantemente, passou a relatar atos simples de higiene pessoal como lavar as mãos antes das refeições e após ir ao banheiro. O poço artesiano foi colocado em funcionamento. Os adultos passaram a trabalhar na terra com botas. Houve melhoria nas condições gerais de higiene na produção de alimentos principalmente na lida com vacas leiteiras e com suínos.

Os resultados dos exames coprológicos realizados após as atividades de educação sanitária e o tratamento específico são mostrados na Tabela 4. Os percentuais de cura para os helmintos variam de 42,5 a 100%. Para os protozoários estes percentuais variam de 14,1 a 61%.

DISCUSSÃO

As helmintoses intestinais são ainda consideradas como nosologias de repercussões importantes à saúde humana, principalmente na idade escolar onde são encontrados os índices de prevalência mais elevados. Na primeira reunião internacional sobre a campanha "Educação Básica para Todos" realizada em Estocolmo em 1989 pela UNESCO⁶ as helmintoses intestinais foram consideradas como primeiro alvo para ações imediatas de intervenção. Embora exista orientação no sentido de controlar helmintoses intestinais através de programas de desparasitação periódicos, duas a três vezes por ano com drogas polivalentes^{7,8,9,10} os fatores determinantes da prevalência são complexos pois estão relacionados a aspectos sociais, econômicos e culturais. Desta forma é importante considerar as recomendações da Organização Mundial da Saúde quanto à participação da população no controle das parasitoses. Essa participação deve ser dinâmica e consciente seja no planejamento, na implantação, monitoração e avaliação das campanhas.²

Segundo Gilmar Mauro, coordenador do Movimento Sem Terra (MST) "a ocupação é um dos únicos meios de demonstrar que existem terras improdutivas, passíveis de desapropriação; de dizer ao governo que a situação no meio rural é insustentável, e que a miséria é generalizada". Com a formação de assentamentos essa situação não se modifica de um momento ao outro. Para que ocorra a melhoria é preciso que a população tenha decisão e auxílio de profissionais e órgãos específicos. O presente trabalho

TABELA 4
Número de exames positivos para espécies de protozoários e helmintos em crianças e adultos do Assentamento Novo Paraíso-Pitanga/PR antes e após tratamento específico associado à educação sanitária

Parasito	Antes do tratamento		Após tratamento		% Cura	χ^2 1gl	p
	Nº	%	Nº	%			
<i>E. coli</i>	30	29.7	11	12.8	57.0	7.770	0.0053
<i>Giardia lamblia</i>	15	14.9	11	12.8	14.1	0.166	0.6839
<i>E. histolytica</i>	8	7.9	4	4.7	40.5	0.828	0.3628
<i>E. nana</i>	6	5.9	2	2.3	61.0	2.676	0.1019
<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	2.0	1	1.2	40.0	0.197	0.6572
<i>Ascaris lumbricoides</i>	9	8.9	0	0	100	8.04	0.0046
<i>Ancilostomídeos</i>	17	16.8	7	8.1	56.9	3.141	0.0764
<i>Strongyloides stercoralis</i>	8	7.9	1	1.2	84.8	4.633	0.0314
<i>Taenia sp.</i>	1	1.0	0	0	100	117.1	< 0.001
<i>Hymenolepis nana</i>	4	4	2	2.3	42.5	0.400	0.5269
Total de pessoas examinadas	101	-	86	-	-	-	-

mostra efetivamente esta realidade mesmo abordando uma fatia diminuta desta problemática.

Embora não tenham sido utilizadas as ferramentas específicas comumente usadas em estudos epidemiológicos e o percentual de infecção por parasitos seja o único parâmetro mensurável utilizado a convivência do dia a dia com a população detectou melhorias significativas, revelando o estado de consciência desenvolvido pela comunidade. Essa convivência possibilitou ainda a sugestão que intervenções continuadas em comunidades com um mínimo de organização pode ser a solução para problemas básicos de saúde e higiene em um país onde a miséria ainda acomete grande parte da população.

Na infra-estrutura do Assentamento de Pitanga foi observada melhoria, principalmente envolvendo questões sobre água, manipulação de alimentos, hábitos pessoais e sociais visando a queda na prevalência dos parasitos mais freqüentes. A constatação da queda está clara na Tabela 4 onde os parasitos passíveis de controle por melhoria dos hábitos de higiene pessoal e proteção ao lidar com a terra tiveram sua prevalência significativamente reduzida.

Com relação a água, como resultado da conscientização atingida, não é mais ingerida água da mina, uma vez que foi instalado o poço artesiano. Essa problemática foi bastante trabalhada visto que a maior incidência de parasitos foi de enteroprotózoários, que segundo Pessoa & Martins¹¹ estaria diretamente relacionada a veiculação hídrica. Conforme observado na Tabela 4 o maior índice foi de *Entamoeba coli* (29,7%) que embora seja comensal reflete o grau de contaminação da água e alimentos por dejetos fecais. O encontro de *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii* confirmam o exposto. As prevalências de *Giardia lamblia* (14,9%) e *Entamoeba histolytica* (7,9%) reforçam tal idéia. Estes dados são preocupantes quando pensamos que *E. histolytica* pode levar à morte e que após um ano de trabalho com indicações de que a população estivesse consciente do problema o percentual de cura foi de no máximo 57%.

A presença de *Ascaris lumbricoides* (8,9%), *Ancilostomídeos* (16,8%) e *S. stercoralis* (7,9%) revelam a contaminação do peridomicílio e solo de uma maneira geral. A prevalência do *A. lumbricoides* foi maior em crianças o que concorda com a literatura.¹² No caso dos *Ancilostomídeos* a prevalência foi maior em adultos revelando trabalho com a terra. Após o tratamento específico e todo o trabalho de conscientização foi verificado menores percentuais de indivíduos infectados com estes helmintos. Foi significativa a redução no percentual de positividade para *S. stercoralis*. A utilização de botas durante o trabalho e o uso de calçados foram hábitos incorporados tanto aos costumes da população adulta como infantil e que serviram para prevenção destas helmintoses. Da mesma forma o hábito de lavar as mãos antes das refeições e após ir ao banheiro passou a ser rotina entre a população sendo que as próprias crianças criticavam quem não os exercia.

Os baixos percentuais observados para *Taenia sp.* devem ser considerados com precaução devido a pouca especificidade dos métodos utilizados para o diagnóstico.

Foram implantadas melhorias na obtenção de alimentos, em especial o leite. Foi criado um novo estábulo, inclusive com pedilúvio favorecendo a limpeza no interior do recinto.

Em conjunto estes dados sugerem que o saneamento básico e a educação sanitária são as mais importantes medidas administrativas a serem pensadas. Sugerem ainda que embora a melhoria possa ser constatada ela não é totalmente efetiva, mesmo trabalhando-se com comunidades organizadas. A necessidade de se fazer trabalhos continuados fica evidente.

Este trabalho comprova a importância de se estabelecer parcerias entre sociedade organizada e assentados, desmistificando a imagem marginal do assentado e comprovando que os indivíduos podem "participar efetivamente no planejamento, implemento e avaliação de programas de controle, contribuindo ativamente para prevenção de parasitoses e promoção de saúde".² Cria também a perspectiva de participação e compromisso de acadêmicos de universidades públicas com a saúde em geral. Em um país onde é grande o nível de carência e miséria, onde o sistema de saúde está longe de ser no mínimo satisfatório, cidadãos que tiveram o privilégio de usufruir de ensino gratuito devem se sentir responsáveis pela doação de parte do conhecimento recebido através de ações práticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Carli, G.A.; Spalding, S.M.; Rott, M.; Ribeiro, L.; Chaves, L.; Silva, A.M.C.; Wendorff, A.; Matos, S.; Pozza, C. *Rev. Bras. Anál. Clín.*, 26(4): 123-125, 1994.
2. Organization Mondial De La Santé. Group scientifique des infections intestinales à Protozoaires et à Helminthes. Genève 1980. *Séries Rapport Techniques* 666, 1982.
3. Pedrazzani, E.S.; Mello, D.A.; Pizzigatti, C.P.; Pripas, S.; Fucci, M.; Santoro, M.C.M. *Rev. Saúde Públ., S. Paulo*, 23(3):189-195, 1989.
4. Katz, N. Chaves, A. & Pelegrino, J., 1972. A simple device quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 14(6):397-400.
5. Golvan, Y.J., 1977. Coprologia parasitária. In: *Exames de Laboratório: Técnicas em parasitologia, Técnicas em micologia* (Y.J. Golvan, I.C. Pettory, E. Drouhet, G. Segretain, F. Mariat), pp.21, Barcelona, Ed. Jems.
6. Halloran, M. E.; Bundy, D.A.P.; Pollit, E., 1989. Infections disease and the UNESCO basic initiative. *Parasitology Today*, 5: 359-362.
7. Botero, B., 1981. Posibilidades de control de las geohelminthiasis mediante tratamientos e massa. *Boletín Chileno de Parasitología*, 34:39-47.
8. Bundy, D.A.P., 1990. New initiatives in the control of helminths. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 467-468.
9. Cropton, D.W.T.; Nesheim, M. C.; Pawlowski, Z. S., editors, 1989. *Ascariasis and its Prevention and Control*. Taylor & Francis.
10. Hall, A.; Anwar, K. S.; Tomkins, A.M., 1992. Intensity of reinfection with *Ascaris lumbricoides* and its implications for parasite control. *The Lancet*, 339:1253-1265.
11. Pessoa, S.B. & Martins, A.M., 1982. *Parasitologia Médica*. 11ª. edição, 872 pp, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A.
12. Marzochi, M.C.A. & Carvalheiro, J.R., 1978. Estudo dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas. III - Distribuição de algumas enteroparasitoses em dois grupos populacionais da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 20(1): 31-35, 1978.

Endereço para correspondência

Áurea R. Teles Pupulin:
Setor de Parasitologia Básica,
Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
Av. Colombo 5790, CP 331 - Cep: 87020-900
Telefone: (044)226-2727 Ramal 374

Perfil do Farmacêutico Bioquímico Analista Clínico

É o profissional universitário preparado especialmente para o Laboratório de Análises Clínicas, no qual realiza os exames complementares necessários para o diagnóstico, prevenção, controle e tratamento das doenças humanas.

É o único profissional universitário da área de saúde que tem preparação sólida nas áreas da química, da física e da biologia, necessárias para sua especialização em Análises Clínicas.

O seu curso universitário é constituído de três partes:

Na *primeira parte*, lhe é fornecido um excepcional suporte químico e físico, graças às disciplinas de química geral, química orgânica, química inorgânica, física geral e físico-química. Além desses conhecimentos básicos, cursa as disciplinas de química orgânica experimental, análise física, análise orgânica, química analítica e bioquímica, que são imprescindíveis para a sua atuação na profissão.

Além dessas disciplinas citadas, lhe é fornecido um suporte básico da área biológica, graças às disciplinas de anatomia, histologia, embriologia, genética, patologia, microbiologia, imunologia básica, parasitologia e higiene social, todas necessárias para a sua especialidade, assim como, as disciplinas de estatística e cálculo diferencial integral.

A *segunda parte* de seu currículo constitui verdadeiramente o seu curso de especialização em Análises Clínicas. Nesta etapa, lhe são dadas todas as disciplinas de aplicação especializada nas Análises Clínicas, nas quais tem destaque os métodos e técnicas aplicadas ao diagnóstico e controle das doenças humanas utilizados no laboratório: bioquímica clínica, hematologia clínica, microbiologia clínica, imunologia clínica, parasitologia clínica, radioimunoensaio e controle de qualidade.

Para complementar a sua formação, na *terceira parte*, o profissional, após a conclusão de todas as disciplinas, realiza obrigatoriamente um estágio supervisionado de 500 horas em laboratório de Análises Clínicas de hospital universitário ou laboratório credenciado pela Faculdade.

Portanto, são praticamente cinco anos de estudos e práticas laboratoriais que credenciam o Farmacêutico Bioquímico como capacitado para o exercício das Análises Clínicas.