

ISSN 2448-3877



SBAC

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

Volume 49 - Nº 03 | Ano 2017

★ 50 ANOS
SBAC

A sbac completa 50 anos em 2017

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, maior entidade do país no setor, trabalha há meio século em prol do desenvolvimento da especialidade e dos Laboratórios Clínicos.

Sempre apoiando a estruturação e o aprimoramento de nossos associados, servimos como referência científica e administrativa para o mercado dentro e fora do Brasil.

>> **Seja parte de nossa história!**

Confira nosso diferencial acessando www.sbac.org.br

 **SBAC**
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas



RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

Editor-chefe/Editor-in-Chief
Paulo Murillo Neufeld (RJ)

Editores Eméritos/Honorary Editors
Mateus Mandu de Souza (RJ)

Editores Associados/Associate Editors
Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)
Paulo Jaconi Saraiva (RS)

Publicação oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC
Official Publication of Brazilian Society of Clinical Analyses

Volume 49 - Nº 3 - 2017
Edição online - ISSN 2448-3877

Produção Editorial/Publisher
Trasso Comunicação Ltda
www.trasso.com.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

DIRETORIA EXECUTIVA/EXECUTIVE BOARD

Luiz Fernando Barcelos (RS)
Presidente/President

Maria Elizabeth Menezes (SC)
Vice-Presidente/Vice-President

Lenira da Silva Costa (RN)
Secretário-Geral/General Secretary

Mauren Isfer Anghebem (PR)
Secretário/Secretary

Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)
Tesoureiro/Treasurer

Marcos Kneip Fleury (RJ)
Tesoureiro Adjunto/Assistant Treasurer

Conselho Fiscal/Fiscal Board Titulares/holders

Vanderlei Eustáquio Machado (MG)
Alverne Passos Barbosa (GO)
Jurandi David da Silva (PE)

Suplentes/Alternates

Nilson Lima Lopes (BA)
Tereza Neuma de Souza Brito (RN)
Paulo Roberto Hatschbach (PR)

Endereço para correspondência/Editorial Office

Rua Vicente Licínio, 99 - Tijuca
Rio de Janeiro, RJ - Brasil
20270-902 – Fone: 21 2187-0800 – Fax: 21
2187-0805 E-mail: rbac@sbac.org.br

Afiliações/Affiliations



Asociación Mercosur de Normalización



Comitê Editorial/Editorial Board

Bioquímica Clínica/Clinical Biochemistry

Álvaro Largura (PR), Marcelo Quintão Mendes (MG), Geraldo Picheth (PR), Marileia Scartezini (PR), Arício Treitinger (SC), Paolo Mocarelli (ITA), Dulcineia Saes Parra Abdalla (SP), Ary Henrique Filho (GO), Daniel Mazziota (AR), Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Marinez Oliveira Sousa (MG), José Edson P. da Silva (RS), Rafael Noal Maresco (RS)

Citologia Clínica/Clinical Cytology

Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Carlos Eduardo de Queiroz Lima (PE), Rita Gorete Amaral (GO), Alexandre Sherley Casimiro Onofre (SE), Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade/Quality Control

José Abol Corrêa (RJ), Luiz Fernando Barcelos (RS), Mateus Mandu de Souza (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Gabriel de Souza Lima Oliveira (SP)

Endocrinologia/Endocrinology

Carlos Alberto Camargo (SP), Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia/Toxicology

Regina Helena Queiroz (SP), Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia Clínica/Clinical Microbiology

Antônio Márcio Lopes (MG), Raimundo Diogo Machado (RJ), Estevão José Colnago (RJ), Amauri Braga Simionetti (RS), Cássia Maria Zoccoli (SC), Carmen Paz Oplusti (SP), Raissa Mayer R. Catão (PB)

Imunologia Clínica/Clinical Immunology

Mateus Mandu de Souza (RJ), Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira (SP), Adelaide José Vaz (SP), Sílvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto Pucca (SP)

Parasitologia Clínica/Clinical Parasitology

Antônio Pedro Soares (MG), Geraldo Atilio de Carli (RS), Jerolino Lopes Aquino (MT), Alverne Passos Barbosa (GO), Mauren Isfer Anghebem Oliveira (PR)

Micologia Clínica/Clinical Micology

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Maria José Gianini (SP), Regina Célia Candido (SP), Rosane Rhan (MT)

Biologia Molecular/Molecular Biology

Mário Hiroyuki Hirata (SP), Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Marcelo Ávilla Mascarenhas (RS), Kelly Melo (SP), Maria Elizabeth Menezes (SC)

Hematologia Clínica/Clinical Hematology

Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Celso Spada (SC), Paulo César Naoum (SP), Julio Cezar Merlin (PR), Paulo Henrique da Silva (PR), Robson Ferreira Ferraz Santos (RJ), José Edson Paz da Silva (RS)

Entidades mantidas pela SBAC Entities maintained by the SBAC

PNCQ – Programa Nacional de Controle de Qualidade/National Program of Quality Control

Coordenador/Coordinator: Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

SNA / DICQ – Sistema Nacional de Acreditação/ National System of Accreditation

Coordenador/Coordinator: André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)

CEPAC – Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas Post Graduation Center

Coordenadora/Coordinator: Maria Elizabeth Menezes (SC)

CB-36 – ABNT

Superintendente/Superintendent: Humberto Marques Tiburcio (MG)

CSM-20

Coordenador Técnico/Technical Coordinator
Luiz Fernando Barcelos (RS)

Comissões Institucionais/ Institutional Comissions

Coordenador Geral/General Coordinator

Jerolino Lopes Aquino (MT)

Comissão de Congressos/Congress Comission

Coordenador Geral de Congressos/
General Congress Coordinator: Irineu K. Grinberg (RS)
Assessoria Científica/Scientific Advice:
Jerolino Lopes Aquino (MT), Luiz Fernando Barcelos (RS),
Marcos Kneip Fleury (RJ)

Normas e Habilitação/Norms and Qualification

Coordenação/Coordination:
Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)
Membros/Members: Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ),
Mateus Mandu de Souza (RJ), Estevão José Colnago (RJ),
Luiz Fernando Barcelos (RS)

Ensino/Education

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Mateus Mandu de Souza (RJ)

Ética/Ethics

Henrique Tommasi Netto (ES), Francisco Einstein do Nascimento (CE), Maria da Conceição L. Oliveira (SE)

Sumário/Contents

CARTA DO PRESIDENTE/LETTER FROM THE PRESIDENTE

- 223** 50 anos da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Barcelos LF

EDITORIAL/EDITORIAL

- 224** *Investigação Translacional em Análises Clínicas*
Translational Research in Clinical Analyses
Neufeld PM

ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW

- 227** Cystatin C: a promising biomarker to evaluate renal function
Cistatina C: um biomarcador promissor para a avaliação da função renal
Porto JR, Gomes KB, Fernandes AP, Domingueti CP
- 235** Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina
Mechanisms of resistance of Candida albicans to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin
Vieira AJH, Santos JI
- 240** Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica
Use of phenotypic tests for the research of carbapenamases in enterobacteria: a tool for clinical orientation
Abrantes JA, Nogueira JMR

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 245** Estudo *in vitro* do efeito do ácido ascórbico sobre os parâmetros de ureia e creatinina
In vitro effect of ascorbic acid on urea and creatinine parameters
Moura FHR, Alexandre JVL, Saraiva RA, Veras HNH
- 249** Avaliação epidemiológica, hematológica e imunofenotípica de pacientes adultos portadores de leucemia aguda diagnosticados no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, Brasil
Epidemiological, hematological and immunophenotypic evaluation of adult patients with acute leukemia diagnosed at the Regional Hospital of Mato Grosso do Sul, Brazil
Righes CS, Garcia DVO, Silva PC, Almeida EB, Pellegrin JC
- 256** Análise da proteinúria após exercício físico intenso
Analysis of proteinuria after intense physical exercise
Melo Neto OP, Carvalho AS, Nicolau LS, Costa AC, Dias GPS

Sumário/Contents

- 263** Valores de referência dos índices plaquetários e construção de algoritmo para liberação do plaquetograma
Reference values for the platelet indices and algorithm for plateletgram evaluation
Monteiro L
- 268** Análise das concentrações de ureia e creatinina em soro e plasma com ácido etilendiamino tetra-acético e citrato de sódio
Analysis of the urea and creatinine concentrations in serum and plasma with ethylenediamine tetraacetic acid and sodium citrate
Andrade DM, Chellini PR, Leite JB, Corrêa JOA
- 275** Estabilidade de antígenos eritrocitários humanos para controle interno da qualidade imunohematológica
Stability of human erythrocyte antigens for immunohematological Internal Quality Control
Sutter B, Paulo MP, Bordini CV, Costa DC, Geraldo A
- COMUNICAÇÃO BREVE/SHORT COMMUNICATION**
- 283** Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná, Brasil
Etiology of hospital infections and profile of antimicrobial sensitivity in a hospital of southwest Parana, Brazil
Bordignon JC, Lima LR
- 289** Ocorrência de micoses superficiais em um centro de saúde pública localizado na cidade de Patos - PB, Brasil
Occurrence of superficial mycoses in public health unit in the city of Patos - PB, Brazil
Oliveira EP, Andrade FS, Lima-Neto RG
- 294** Estudo comparativo da associação entre a ocorrência de parasitos intestinais e diferentes variáveis clínicas e epidemiológicas em moradores da comunidade Ribeira I, Araci - BA, Brasil
Comparative study of the association between the occurrence of intestinal parasites and different epidemiological and clinical variables in the Ribeira I community residents, Araci - BA, Brazil
Amor ALM, Oliveira VF
- 301** Uso de amostras individualizadas e em *pool* no diagnóstico de parasitos intestinais
Use of individualized and pooled samples in the diagnosis of intestinal parasites
Matos JS, Ramos AR, Barbosa AS, Bastos OMP, Uchôa CMA
- RELATO DE CASO/CASE REPORT**
- 307** Hemoglobinopatias: relato de caso familiar
Hemoglobinopathies: family case report
Silva LCM, Castro FS
- 312** **INSTRUÇÕES AOS AUTORES / INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**



Luiz Fernando Barcelos

50 anos da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

A SBAC está em festa: completaremos 50 anos de história no dia 28 de novembro deste ano. Criada no ano de 1969, a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas pôde contar ao longo de toda a sua trajetória com o entusiasmo, a perspicácia e o brilhantismo de inúmeros profissionais que se reuniram na entidade com a intenção de construir um espaço de excelência voltado para o desenvolvimento das análises clínicas.

A sociedade de caráter científico-profissional foi idealizada por nomes ilustres da área, como o professor Mateus Mandú de Souza, João Ciribelli Guimarães, Durval Mazzei Nogueira, Antônio Marques D'Almeida, Ney Haushan e José Abol Corrêa – criador e hoje Diretor administrativo do Programa Nacional de Controle de Qualidade, o PNCQ, instituição patrocinada pela SBAC, respeitada dentro e fora do país, e responsável por monitorar o desempenho dos laboratórios clínicos participantes.

E foi pouco depois de sua origem que a SBAC lançou a primeira edição da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. De cunho científico e disponibilizada sem custo para a comunidade da área, a RBAC foi se aprimorando cada vez mais com o passar dos anos.

O primeiro Congresso Brasileiro de Análises Clínicas organizado pela entidade aconteceu em 1971. Do primeiro até hoje são 44 congressos realizados de norte a sul pelo território nacional. O CBAC é um encontro anual que envolve atualização científico-profissional e socialização com colegas de todo o país e do exterior, contando com uma qualificada programação científica e uma exposição de equipamentos.

Desde então, seguimos produzindo ferramentas que fomentem o zelo pelo aperfeiçoamento, pela mestria e pela competência, como o Título de Especialista em Análises Clínicas – TEAC, outorgado a profissionais aprovados em concurso de provas escritas e práticas de conhecimento e títulos; o Sistema Nacional de Acreditação – SNA/DICQ, primeiramente departamento da sociedade e logo organização científica de acreditação de sistema de qualidade reconhecida internacionalmente; o Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – CEPAC, que realiza atividades teóricas presenciais e a distância assim como aulas práticas laboratoriais com objetivo de difundir o conhecimento com a formação de profissionais que façam diferença no mercado onde atuam.

A SBAC se tornou representante brasileira da Confederação Latino-Americana de Bioquímica Clínica – COLABIOCLI, fundada juntamente com sociedades científicas profissionais da especialidade de outros países da América Latina. Também em âmbito internacional, somos filiados à *International Federation of Clinical Chemistry* – IFCC, a maior sociedade científica mundial de análises clínicas, à *Clinical and Laboratory Standards Institute* – NCCLS, da qual vários de nossos dirigentes se tornaram *advisors* e a *International Society for Quality in Healthcare* – ISQua. A sociedade é também a mantenedora – Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico *in vitro* – CB36 da ABNT.

Hoje, a SBAC conta com mais de 4.000 sócios efetivos e possui Regionais e Delegacias em vários estados do país. Para nós da sociedade, essa história é apenas o começo!

Dr. Luiz Fernando Barcelos

Presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

Investigação Translacional em Análises Clínicas

Translational Research in Clinical Analyses

Durante a última década, o conceito de investigação translacional ganhou grande espaço dentro da comunidade científica internacional. Esse termo tem origem na expressão inglesa *translational research* e está associado com a transferência de conhecimentos biomédicos gerados em pesquisas básicas para as diferentes áreas da investigação clínica, sobretudo no que se refere ao diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças. Na realidade, o objetivo da investigação translacional é promover a integração entre os produtores e os usuários da pesquisa científica.⁽¹⁾ Atualmente, considera-se que a investigação translacional é a forma mais rápida para que a informação científica seja transmitida tanto para a investigação clínica quanto para a prática assistencial. Isso significa uma transferência efetiva dos novos conhecimentos, mecanismos e técnicas em prol da saúde da população, colaborando, de forma inequívoca, para a tomada de decisões médicas e políticas.^(2,3) É importante reiterar que a investigação translacional não é aquela que busca conhecer isoladamente os fundamentos patológicos de uma determinada enfermidade (objeto de estudos básicos), mas sim é aquela que busca desenhar e estudar, o mais rapidamente possível, novas aproximações diagnósticas e/ou terapêuticas, baseadas nos mais recentes avanços da ciência básica e/ou da tecnologia.^(1,4)

Historicamente, a investigação translacional tem início com a abordagem hermenêutica de distintas áreas do conhecimento como a linguística (estudo da linguagem verbal humana), semiótica (estudo dos signos e da semiose) e teorias da informação (estudo e conceituação matemática da informação) e da comunicação (estudo dos efeitos, origens e funcionamento do fenômeno da comunicação social), o que possibilitou uma melhor interpretação dos sentidos e significados dos diferentes textos escritos na humanidade, tornando mais eficiente, assim, a tradução desse material entre os vários idiomas.⁽¹⁾ No âmbito da saúde, a palavra translacional foi empregada, inicialmente, em 1975, para se referir à transferência, intercambiamento e interpretação dos dados obtidos tanto em pesquisas básicas quanto médicas na área da endocrinologia clínica e diabetes.^(1,5) Na década de 1990, o termo foi empregado na literatura para descrever os esforços científicos para o desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas. Consecutivamente, na década de 2000, o termo foi sistematizado e seu escopo definido, passando a ser utilizado em cardiologia, neurologia, psiquiatria, patologia clínica e em muitas outras áreas da medicina.^(6,7)

Importa mencionar que, para que uma investigação translacional possa ocorrer e cumprir seus objetivos, é necessário que exista uma equipe de trabalho integrada e constituída por diversos profissionais com expertises diferentes capazes de identificar e priorizar necessidades e situações de maior complexidade com a finalidade de empregar, de forma efetiva, os resultados obtidos para a resolução de problemas clínicos ou de saúde pública.⁽¹⁾ Dentro do conceito inicial de investigação translacional, dois momentos distintos da pesquisa científica têm sido considerados: investigação translacional T1 e T2.⁽⁷⁾ Na investigação T1, há a transmissão de novos conhecimentos produzidos em laboratórios vinculados às ciências básicas acerca de mecanis-

mos de produção de doença e resistência a drogas e quimioterápicos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, tratamento e prevenção de diferentes patologias. Aqui podem ser realizados ainda tanto estudos pré-clínicos quanto os primeiros testes em humanos.^(2,8) No momento T2, a investigação objetiva assegurar que os novos modelos de diagnóstico e tratamento cheguem aos pacientes ou às populações para as quais foram desenhados e que sejam aplicados de forma correta e com uma relação custo-benefício aceitável.^(2,9) Exemplificando, o desenvolvimento de uma nova droga pode ser considerada o ponto final de T1, no entanto, será o ponto de partida para T2, que buscará melhorar a qualidade de acesso e a organização e coordenação dos sistemas de cuidado.

Resumidamente, então, a investigação translacional se caracteriza como um processo bifásico, já que os novos conhecimentos passam da ciência básica para a ciência clínica (*bench to bedside* - do laboratório à beira do leito) e da ciência clínica para a saúde dos pacientes e saúde pública (*bedside to practice* - da beira do leito à assistência à saúde), e bidirecional, pois o fluxo de informação migra do laboratório à clínica e da clínica volta ao laboratório (*bench - bedside - back again*).^(3,8,10) Para o funcionamento desse processo, a investigação T1 requer laboratórios universitários ou de centros de pesquisa que trabalhem com biologia molecular, citologia, bioquímica, biofísica, farmacologia, microbiologia e/ou imunologia com infraestrutura e tecnologia de ponta. A investigação T2, em contrapartida, tem como laboratório de ensaio o hospital e o ambiente da comunidade, associado a intervenções baseadas nos grupos humanos e populacionais, epidemiologia, estatística, observação e evidência clínica, psicologia e ciências do comportamento, investimento privado, políticas governamentais e financiamento público.^(1,3,8)

Além do modelo T1-T2 de transmissão de novos conhecimentos, modernamente, um modelo ampliado e fundamentado na epidemiologia, que contém pelos menos cinco fases ou etapas operacionais (T0-T4) de investigação translacional, tem sido proposto.^(2,8) Nesse modelo de transmissão, T0 representa pontualmente a descoberta e a descrição do achado científico pela equipe de pesquisadores, T1 representa a fase que vai da descoberta à aplicação clínica ou em saúde (testes, intervenções), T2 representa a fase que vai da aplicação clínica ou em saúde à avaliação da eficácia e à proposta de adoção ou recomendação baseada nas evidências, T3 representa a fase de operacionalização e execução prática em saúde das recomendações ou diretrizes, T4 representa a fase de avaliação do impacto e dos resultados da prática em saúde na qualidade de vida da população e dos reais benefícios à sociedade.^(2,8,9) Encerrando o ciclo, há a fase T4 à T0, onde o conhecimento aplicado ou prático em saúde retorna ao laboratório solidificando ou dando nova orientação às linhas de pesquisas desenvolvidas. Finalmente, no cerne de todo o processo está a síntese do conhecimento, representada por uma abordagem sistemática para a revisão das evidências sobre o próprio conhecimento gerado na pesquisa translacional.^(2,9)

Particularmente no âmbito das análises clínicas, essa transferência de conhecimentos entre as ciências básica e clínica, a partir de investigações translacionais, tem produzido impactos nas áreas de imunologia, endocrinologia, oncologia, neurologia e neurociências e reprodução humana.⁽⁶⁾ Os resultados de investigações translacionais em análises clínicas irão refletir diretamente no manejo dos pacientes, já que essas investigações contribuem para uma melhor compreensão e percepção dos mecanismos fisiopatológicos e das complexas interações que ocorrem nos sistemas biológicos.⁽¹⁰⁾ Como um exemplo, a pesquisa por novos marcadores bioquímicos e/ou tumorais e sua aplicação no biodiagnóstico tem papel chave no controle, monitoramento e segurança dos pacientes, bem como na predição da eficácia de tratamentos frente a diferentes tipos de doenças neoplásicas, degenerativas e cardiovasculares.^(6,9) As análises clínicas translacionais podem fornecer maior apoio

científico às intervenções médicas, informando em que contexto essas intervenções irão ser mais efetivas, quando elas deverão ser procedidas e por quanto tempo deverão ser estabelecidas. As pesquisas translacionais na área do laboratório clínico têm como objetivo demonstrar de que maneira um grupo de variáveis bioquímicas e moleculares pode contribuir para a escolha da melhor intervenção clínico-cirúrgica e/ou farmacológica.⁽¹⁰⁾

REFERÊNCIAS

1. Bethancourt HA, Andalia RMR, Nápoles MM. Investigación translacional y transdisciplinaria en salud pública. *Rev Cubana Salud Pública*. 2014;40(2):239-45.
2. Baptista AS, Morel CM, Sozzi de Moraes IH. Proposta Conceitual de telessaúde no modelo de pesquisa translacional. *Rev Saúde Pública*. 2014;48(2):347-56.
3. Sáenz C, Sáenz M, Sáenz R. Medicina translacional: del laboratorio a la clínica y de la clínica hasta la acción. *Gastroenterología Latinoamericana*. 2011;22(3):263-4.
4. Cabral Filho JE, Silva Júnior JR, Agra KA. Pesquisa translacional e a importância da sua difusão. *Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil*. 2013;13(4):293-6.
5. Padilha MI. Pesquisa translacional: qual a importância para a prática da enfermagem? *Texto Contexto Enfermagem*. 2011;20(3):219-20.
6. Curry SH. Translational science: past, present, and future. *Biotechniques*. 2008 Feb;44(2):ii-viii.
7. Reinaldo G. Pesquisa translacional: uma interpretação. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2013;18(6):1731-44.
8. Schwartz J, Macomber C. So, You Think You Have an Idea: A Practical Risk Reduction-Conceptual Model for Academic Translational Research. *Bioengineering*. 2017;4(2). pii: E29.
9. Khoury MJ, Gwinn M, Ioannidis JP. The emergence of translational epidemiology: from scientific discovery to population health impact. *Am J Epidemiol*. 2010;172(5):517-2.
10. Lopes-Júnior LC. Pesquisa translacional e a enfermagem: da bancada de laboratório à beira do leito. *Journal of Nursing UFPE online*. 2015;9(12):1-2.

Paulo Murillo Neufeld, PhD

Editor-Chefe da Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)

Cystatin C: a promising biomarker to evaluate renal function

Cistatina C: um biomarcador promissor para a avaliação da função renal

Janaína Rodrigues Porto¹

Karina Braga Gomes²

Ana Paula Fernandes²

Caroline Pereira Domingueti³

Abstract

Accurate evaluation of the progression of renal function decline is very important, since the early establishment of renoprotective therapies can prevent or delay the occurrence of end stage renal disease. Until now, there is still no ideal biomarker to evaluate glomerular filtration rate, and cystatin C has been demonstrated to be a very promising one. In this review, we have assembled several studies that have evaluated the use of cystatin C to assess glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease, diabetes mellitus and hemodialysis, and also the use of cystatin C to predict the risk of cardiovascular outcomes. Besides cystatin C has been demonstrated by different authors to be equal or superior to the other available renal biomarkers, some limitations still need to be overcome so that cystatin C can be used in clinical to improve the early diagnosis of chronic kidney disease.

Keywords

Cardiovascular diseases; Cystatin C; Diabetic nephropathies; Kidney transplantation; Chronic renal insufficiency

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is an important public health problem worldwide, since it is associated with a high morbidity and mortality.⁽¹⁾ It is defined as the presence of abnormalities in renal function for more than three months, with implications to healthy.⁽²⁾ Patients with renal function impairment show not only a higher risk to develop end stage renal disease, but also to develop cardiovascular events.⁽¹⁾

Early diagnosis of CKD and the accurate evaluation of the progression of renal function decline and the risk to the development of cardiovascular complications are very important, because the early establishment of reno and cardioprotective therapies can prevent or delay the occurrence of these undesirable outcomes.⁽²⁾

Creatinine has been used to evaluate renal function for decades.⁽³⁾ Different formulas can be used to estimate glomerular filtration rate (GFR) based on creatinine serum levels, such as Cockcroft-Gault, MDRD and CKD-EPI.⁽⁴⁻⁶⁾ However, all of them have some limitations: Cockcroft-Gault formula tends to overestimate GFR, MDRD formula tends

to underestimate it, while CKD-EPI formula has not been extensively studied in different populations yet.⁽³⁾ As there is still no ideal biomarker to evaluate renal function, new biomarkers have been proposed and cystatin C seems to be a very promising one.⁽⁷⁾

This study aimed to realize a review of the literature about the use of cystatin C to evaluate renal function in different groups of patients, including patients with CKD, diabetes mellitus and hemodialysis, and the utility of cystatin C to predict the risk of cardiovascular outcomes.

STRUCTURE AND METABOLISM OF CYSTATIN C

Cystatin C has been discovered by Clausen in cerebrospinal fluid in 1961.⁽⁸⁾ In the same year, Butler and Flynn⁽⁹⁾ detected it in urine. In 1984, Barrett et al.⁽¹⁰⁾ suggested that its physiological function could be the regulation of cystine protease and proposed the name "cystatin C".

Cystatin C is a non-glycosylated protein with low molecular weight (13kDa), belonging to cysteinoproteases family. It is produced at a constant rate by lysosomes of

¹Graduada em Farmácia – Campus Centro Oeste Dona Lindu – Universidade Federal de São João Del Rei – Divinópolis - MG, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte - MG, Brasil.

³Doutor. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Campus Centro Oeste Dona Lindu – Universidade Federal de São João Del Rei – Divinópolis - MG, Brasil.

Instituição: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Campus Centro Oeste Dona Lindu - Universidade Federal de São João Del Rei – Divinópolis - MG, Brasil.

Conflito de interesse: sem conflito de interesse.

Artigo recebido em 14/12/2015

Artigo aprovado em 20/04/2016

DOI: 10.21877/2448-3877.201600446

all nucleated cells in the organism and can be found in several biological fluids, such as serum, seminal liquid and cerebrospinal fluid.⁽¹¹⁾ Because of its small size and positive charge, cystatin C is freely filtered by renal glomerulus. Unlike creatinine, it is not secreted by renal epithelial tubular cells, although it is reabsorbed. Once it is reabsorbed, it is metabolized by the renal epithelial tubular cells and do not return to bloodstream. Plasma levels of cystatin C seems not to be influenced by muscle mass.⁽⁷⁾ However, large doses of glucocorticoids may increase the production of cystatin C and thyroid dysfunction may affect its plasma levels, which is lower in hypothyroidism and higher in hyperthyroidism.⁽¹²⁾ In addition, other extra-renal factors, including age, body weight, smoking, C-reactive protein (CRP), cancer, inflammation and steroid therapy may also influence its plasma levels.⁽¹³⁾

CYSTATIN C AND CHRONIC KIDNEY DISEASE

Cystatin C has been shown to be as useful as creatinine to detect GFR reduction in patients with several renal diseases.⁽⁷⁾ Some studies have evaluated the use of cystatin C in patients with CKD or with risk to develop CKD are summarized in Table 1. Nitta et al.⁽¹⁴⁾ conducted a study with 140 patients with several renal diseases, aiming to evaluate the clinical application of serum cystatin C as a biomarker of GFR, comparing its levels with clearance of creatinine and clearance of insulin. They observed that serum cystatin C showed a better accuracy than serum creatinine to identify

individuals with reduced GFR, indicating that the determination of serum cystatin C is useful to estimate GFR and, particularly, to detect a mild decline of GFR in patients with various renal diseases.

In a similar study, Hojs et al.⁽¹⁵⁾ determined cystatin C and creatinine serum levels and calculated GFR, using Cockcroft-Gault and MDRD formulas, of 164 patients with CKD in stages 2-3 (GFR 30-89mL/min/1.73 m²), whose renal function had been previously evaluated by clearance of Cr-EDTA. They verified that serum cystatin C is a more accurate biomarker of GFR than serum creatinine and than GFR estimated by Cockcroft-Gault formula in female patients with mild or moderate renal function decline.

Kazama et al.⁽¹⁶⁾ evaluated the GFR of 220 patients with various renal diseases by the determination of sodium thiosulfate clearance and compared it with clearance of creatinine, serum creatinine and cystatin C. They concluded that cystatin C is superior to clearance of creatinine when a subclinical renal dysfunction is present. In another study, Villa et al.⁽¹⁷⁾ determined serum creatinine and cystatin C and the clearance of creatinine in 50 critical patients at risk to develop renal dysfunction. They observed that serum cystatin C is an accurate biomarker of subtle changes in GFR and is superior to creatinine to evaluate renal function of these patients.

Peralta et al.⁽¹⁸⁾ conducted a study to compare the classification of CKD by GFR estimated by creatinine and cystatin C. They determined the proportion of patients with GFR < 60 mL/min/1.73 m², based on creatinine, cystatin C or both, which was estimated by CKD-EPI formulas, in relation

Table 1 - Studies that have evaluated the use of cystatin C in patients with CKD or with risk to develop renal dysfunction.

Author	Population	Gold Standard	Data
Nitta et al. (2002)	140 patients with various renal diseases (age from 20 to 68)	Clearance of inulin	Cystatin C shows a better accuracy than serum creatinine to identify individuals with reduced GFR.
Kazama et al. (2002)	220 adult patients with various renal diseases (age > 18)	Sodium thiosulfate clearance	Cystatin C is superior to clearance of creatinine when subclinical renal dysfunction is present.
Villa et al. (2005)	50 critically ill patients with risk for developing renal dysfunction (age from 21 to 86)	Creatinine clearance	Cystatin C is an accurate biomarker of subtle changes in GFR and is superior to creatinine to evaluate renal function.
Hojs et al. (2006)	164 female patients with CKD stages 2-3 (age from 14 to 86)	Clearance of Cr-EDTA	Cystatin C is a more accurate than serum creatinine and Cockcroft-Gault formula in patients with mild or moderate renal function decline.
Peralta et al. (2011)	11,909 individuals with age > 45	Not used	Among individuals diagnosed with CKD using CKD-EPI formula based on creatinine, the worst prognostic is limited to a subgroup that also shows CKD according to formula based on cystatin C.
Peralta et al. (2011)	26,643 individuals with age > 45	Not used	The addition of cystatin C and albuminuria to creatinine to predict the risk of death and ESRD may reclassify individuals with more accuracy and distinguish important differences to prognosis.
Rule et al. (2013)	1,150 patients with mean age 65 years	Not used	GFR based on cystatin C improved the risk stratification of mortality and CKD as compared to GFR based on creatinine.
Hari et al. (2014)	42 children with CKD stage 1 (age from 2 to 18)	Clearance of 99mTcDTPA	Cystatin C based formula showed a better performance than creatinine based formula.

CKD = chronic kidney disease. GFR = glomerular filtration rate. ESRD = end stage renal disease.

to risk of mortality, cardiovascular events and cardiac insufficiency. They evaluated the ability of the GFR estimated by cystatin C to detect additional cases of GFR decline among people with GFR estimated by creatinine ≥ 60 mL/min/1.73 m², and to distinguish a group with a greater risk of chronic renal complications among those with GFR based on creatinine < 60 mL/min/1.73 m². They observed that among individuals diagnosed with CKD using CKD-EPI formula based on creatinine, the worst prognostic was limited to a subgroup that also had CKD according to the formula based on cystatin C. Therefore, cystatin C may have an important role in the identification of people with CKD that show a higher risk of complications.

In another study, Peralta et al.⁽¹⁹⁾ evaluated whether the combination of creatinine, cystatin C and albuminuria would improve the identification of complications associated with CKD in 26643 patients divided into eight groups defined by GFR based on creatinine < 60 mL/min/1.73 m², GFR based on cystatin C < 60 mL/min/1.73 m² and/or albuminuria ≥ 30 mg/g, in comparison to creatinine alone. They verified that the association of these three biomarkers improved the discrimination of the risk of death and end stage renal disease. Cystatin C and albuminuria were both strongly and independently associated with death among people with and without CKD defined by GFR based on creatinine. Moreover, the second largest group of risk to end stage renal disease was not detected by creatinine, but it was detected by cystatin C and albuminuria. Therefore, the addition of cystatin C and albuminuria to creatinine to predict the risk may reclassify people with more accuracy and distinguish important differences to prognosis.

Rule et al.⁽²⁰⁾ evaluated the GFR of 1150 patients with risk factors associated to CKD by the clearance of iothalamate and the formulas based on creatinine, cystatin C or both. They verified that the GFR based on cystatin C improved the risk stratification of mortality and renal insufficiency as compared to GFR based only in creatinine, suggesting that cystatin C may be considered a better biomarker for the risk stratification of CKD. In a study involving 42 children with CKD evaluated by the clearance of 99mTcDTPA, Hari et al.⁽²¹⁾ observed that the cystatin C based formula showed a better performance than the formula based on creatinine in children with early CKD.

CYSTATIN C AND DIABETES MELLITUS

Cystatin C has been suggested to provide a better estimative of the GFR than creatinine in diabetic patients.⁽⁷⁾ Some studies that have assessed the use of cystatin C to detect renal function decline in diabetic patients are summarized in Table 2. A study conducted by Maclsaac et al.⁽²²⁾ demonstrated that plasma cystatin C was at least as sensible and specific as the GFR estimated by creatinine to

detect renal impairment, which was evaluated by isotopic reference, in diabetic patients. Moreover, at normal range of the GFR, the GFR estimated by cystatin C was superior to Cockcroft Gault and MDRD formulas based on creatinine.

In a study involving only type 2 diabetic (DM2) patients, Jeon et al.⁽²³⁾ demonstrated that cystatin C levels increased with increasing of CKD stage from 1 to 3 and from normoalbuminuria to microalbuminuria and showed a positive correlation with albuminuria, indicating that cystatin C is a useful biomarker to detect early renal function decline in DM2 patients, because it reflects both a decrease in the GFR and an increase in albuminuria. It was also verified that cystatin C measurement in urine and serum is a useful biomarker for the evaluation of renal function in DM2 patients with normoalbuminuria.⁽²⁴⁾

Pucci et al.⁽²⁵⁾ analysed the renal function of 288 type 1 (DM1) and DM2 patients by the determination of cystatin C and creatinine plasma levels and the GFR estimated by Cockcroft Gault and MDRD formulas, and evaluated the efficacy of these biomarkers to detect early renal function decline, comparing to clearance of iohexol. They verified that plasma cystatin C is a better biomarker to early detection of renal function decline than plasma creatinine and the formulas based on creatinine. Similarly, Tan et al.⁽²⁶⁾ determined the clearance of iohexol in DM1 patients and compared it with plasma creatinine, GFR based on cystatin C, clearance of creatinine and GFR estimated by Cockcroft Gault formula. They observed that cystatin C correlated as well as the clearance of creatinine with the clearance of iohexol, and correlated better than plasma creatinine or the Cockcroft Gault formula.

Mussap et al.⁽²⁷⁾ compared the plasma levels of cystatin C and the GFR estimated by Cockcroft Gault formula, in reference to clearance of 51Cr-EDTA, in DM2 patients to assess which method is more efficient to evaluate the GFR of these patients. They verified that cystatin C showed a better correlation with the clearance of 51Cr-EDTA than the GFR estimated by Cockcroft Gault formula. Furthermore, cystatin C showed a better accuracy to distinguish between patients without renal dysfunction and with renal function decline and provided less false-positive and false-negative results. Shimizu et al.⁽²⁸⁾ also compared plasma creatinine and cystatin C in 174 DM2 patients and observed that cystatin C is a more sensitive and specific biomarker of the renal function decline than creatinine and may predict early prognostic stages of nephropathy.

Christensson et al.⁽²⁹⁾ conducted a study with 41 DM1 and 82 DM2 patients in order to determine whether cystatin C is more accurate than serum creatinine to detect diabetic nephropathy. They have reported that serum cystatin C has showed a better performance in comparison to serum creatinine to detect mild renal disease. However, serum creatinine was as efficient as cystatin C to detect severe

Table 2 - Studies that have assessed the use of cystatin C to detect renal function decline in diabetic patients.

Author	Population	Gold Standard	Data
Oddeze et al. (2001)	49 patients with DM1 and DM2 (mean age 57 years)	Clearance of Cr-EDTA	Cystatin C did not provide a better estimative of GFR in comparison to plasma creatinine.
Tan et al. (2002)	29 adult patients with DM1 (age > 18)	Clearance of iohexol	Cystatin C showed a better performance than plasma creatinine or Cockcroft Gault formula.
Mussap et al. (2002)	52 patients with DM2 (age from 48 to 73)	Clearance of Cr-EDTA	Cystatin C showed a better performance than Cockcroft Gault formula.
Shimizu et al. (2003)	174 adult patients with DM2 (age > 18)	Albuminuria	Cystatin C may predict early prognostic stages of nephropathy.
Christensson et al. (2004)	123 adult patients with DM1 and DM2 (age > 18)	Clearance of Cr-EDTA	Cystatin C showed a better performance than serum creatinine to detect mild renal disease
Perkins et al. (2005)	30 patients with DM2 (mean age 40 years)	Clearance of iothalamate	Serial measurements of serum cystatin C are able to detect with accuracy the early renal function decline.
MacIsaac et al. (2006)	251 patients with DM1 and DM2 (mean age 60 years)	Clearance of Tc-DTPA	GFR estimated by cystatin C showed the same predictive value as MDRD and Cockcroft-Gault formulas.
MacIsaac et al. (2007)	251 patients with DM1 and DM2 (mean age 60 years)	Clearance of Tc-DTPA	Cystatin C showed a similar accuracy than Cockcroft Gault and MDRD formulas.
Pucci et al. (2007)	288 adult patients with DM1 and DM2 (age > 18)	Clearance of iohexol	Cystatin C is better to early detection of renal function decline than plasma creatinine and Cockcroft-Gault and MDRD formulas.
Premaratne et al. (2008)	85 patients with DM1 (age from 14 to 72)	Clearance of Tc-DTPA	GFR based on cystatin C was able to predict more accurately the long term changes in GFR than Cockcroft Gault and MDRD formulas.
Li et al. (2010)	91 adult patients with DM2 (age > 18)	Clearance of Tc-DTPA	Cystatin C based GFR was less accurate to evaluate renal function than MDRD formula.
Jeon et al. (2011)	332 adult patients with DM2 (age > 18)	Albuminuria	Cystatin C is useful for the evaluation of renal function in patients with normoalbuminuria.
Jeon et al. (2013)	205 adult patients with DM2 (age > 18)	Albuminuria	Cystatin C levels increased from normoalbuminuria to microalbuminuria.
Iliadis et al. (2011)	448 patients with DM2 (mean age 65 years)	Clearance of Cr-EDTA	GFR based on cystatin C was similar to serum creatinine and CKD-EPI formula based on creatinine.
Krolewski et al. (2012)	766 patients with DM1 and DM2 in CKD stages 1-3 (mean age 38 years)	Not used	GFR based on cystatin C may improve the risk stratification of ESRD determined by CKD-EPI and MDRD formulas.

CKD = chronic kidney disease. GFR = glomerular filtration rate. DM1 = type 1 diabetes mellitus. DM2 = type 2 diabetes mellitus. ESRD = end stage renal disease.

renal disease. In a study involving 251 diabetic patients, MacIsaac et al.⁽³⁰⁾ compared the predictive performance of the GFR based on cystatin C with the methods based on creatinine. They reported that the GFR estimated by cystatin C showed the same predictive value as the MDRD and the Cockcroft-Gault formulas. However, they have shown that the adjustment of cystatin C according to clinical and biochemical parameters would improve the predictive value of the GFR based on cystatin C.

Aiming to evaluate the stages of renal disease in diabetes mellitus, Krolewski et al.⁽³¹⁾ classified DM1 and DM2 patients in stages 1-3 of CKD, according to the GFR estimated by the CKD-EPI and the MDRD formulas based on creatinine, and by the Stevens formula based on cystatin C. They followed the patients during 10 years to verify whether the prediction of end stage renal disease based on the staging of CKD established by the formulas based on

creatinine could be improved by the formula based on cystatin C. Patients classified in a more severe stage of CKD evaluated by the formula based on cystatin C in comparison to the formulas based on creatinine showed a significantly higher risk to develop end stage renal disease, while those classified in a less severe stage of CKD evaluated by the formula based on cystatin C compared to the formulas based on creatinine showed a significantly lower risk. Therefore, the formula based on cystatin C may improve the risk stratification of end stage renal disease determined by the formulas based on creatinine in DM1 and DM2 patients.

Premaratne et al.⁽³²⁾ conducted a study with 85 DM1 patients, who were followed by 10 years, comparing the methods based on creatinine and cystatin C with the clearance of ^{99m}Tc-DTPA. They verified that the GFR estimated by cystatin C was more accurate than the GFR estimated by Cockcroft Gault and MDRD formulas based on

creatinine to detect renal function decline. Cystatin C was able to predict more accurately the long term changes in GFR when compared to serial determination of GFR calculated by the clearance of 99mTc-DTPA, improving the early identification of patients that show an increased risk to develop kidney failure. Similarly, Perkins et al.⁽³³⁾ assessed the renal function decline in DM2 patients with normal or increased GFR to verify whether cystatin C is able to detect early renal function decline in diabetes mellitus. They have shown that serial measurements of serum cystatin C are able to detect with accuracy the early renal function decline in these patients.

Despite several studies have demonstrated the superiority of cystatin C compared to other renal biomarkers, Oddo et al.⁽³⁴⁾ verified that cystatin C did not provide a better estimative of the GFR in comparison to plasma creatinine in 49 patients with diabetes mellitus and renal impairment. Similarly, Li et al.⁽³⁵⁾ observed that the formulas based on cystatin C provided results less accurate than the MDRD formula based on creatinine to estimate the GFR of 166 patients with CKD and 91 patients with DM2. Iliadis et al.⁽³⁶⁾ also compared the accuracy of the GFR estimated by formulas based on cystatin C and creatinine in 448 DM2 patients, using the clearance of Cr-EDTA as reference and they verified that the GFR based on cystatin C did not provide a better evaluation of the GFR than the GFR based on creatinine.

CYSTATIN C AND RENAL TRANSPLANTATION

Cystatin C has been shown to be a more sensitive biomarker to detect early renal dysfunction, which is beneficial to kidney transplant patients, in which small changes of the GFR can impair the post-transplant course.⁽⁷⁾ Some studies have evaluated the use of cystatin C to monitor renal function in kidney transplant patients and

they are summarized in Table 3. Malheiro et al.⁽³⁷⁾ compared the predictive performance of the GFR estimated by the MDRD and the Cockcroft Gault formulas based on creatinine with the GFR estimated by the Le Bricon and Stevens formulas based on cystatin C, using as reference the clearance of creatinine, in 173 kidney transplant patients. They observed that the GFR based on cystatin C showed a better efficacy to monitor the graft function than the GFR based on creatinine. In another similar study, Jung et al.⁽³⁸⁾ analysed 72 kidney transplant patients to compare the clinical efficacy of serum cystatin C and creatinine, in reference to the clearance of creatinine. They reported that cystatin C is a more sensitive biomarker of the reduced GFR ($< 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$) than serum creatinine.

Krishnamurthy et al.⁽³⁹⁾ compared the efficacy of the GFR estimated by Le Bricon formula based on cystatin C and the GFR estimated by the MDRD formula based on creatinine in 30 patients that have received kidney transplant, using as reference the clearance of Tc-DTPA. They observed that the GFR based on cystatin C showed a better correlation with the clearance of Tc-DTPA than the MDRD formula. White et al.⁽⁴⁰⁾ estimated the GFR using four formulas based on cystatin C (Filler, Le Bricon, Larsson and Hoek) and seven formulas based on creatinine, in 117 kidney transplant patients, and compared them with the clearance of Tc-DTPA. They observed that the formulas based on cystatin C were more accurate to predict renal function decline in these patients.

Le Bricon et al.⁽⁴¹⁾ compared plasma cystatin C with the clearance of creatinine and plasma creatinine, three months after the kidney transplant in 25 patients, and verified that creatinine overestimated the GFR, while cystatin C reflected better the GFR and correlated strongly with the clearance of Cr-EDTA. On the other hand, in a study involving 29 kidney transplant patients, Risch et al.⁽⁴²⁾ verified that the GFR estimated by Larsson formula based on cystatin C was

Table 3 - Studies that have evaluated the use of cystatin C to monitor renal function in kidney transplanted patients.

Author	Population	Gold Standard	Data
Le Bricon et al. (2000)	25 adult patients 3 months after kidney transplantation (age > 18)	Clearance of Cr-EDTA	Creatinine overestimated GFR, while cystatin C reflected better the GFR.
White et al. (2005)	117 adult patients 5 months after kidney transplantation (age > 18)	Clearance of Tc-DTPA	Cystatin C-based formulas were more accurate to predict renal function decline than creatinine-based formulas.
Risch et al. (2005)	29 adult patients 6 months after kidney transplantation (age > 18)	Clearance of iothalamate	GFR based on cystatin C was similar to MDRD formula to monitor the graft function.
Krishnamurthy et al. (2011)	30 adult patients 6 months after kidney transplantation (age > 18)	Clearance of Tc-DTPA	GFR based on cystatin C showed a better performance than MDRD formula.
Malheiro et al. (2012)	173 adult patients at least one year after kidney transplantation (age > 18)	Clearance of creatinine	GFR based on cystatin C showed a better performance to monitor the graft function than GFR based on creatinine.
Jung et al. (2012)	72 adult patients which were followed up after kidney transplantation (age > 18)	Clearance of creatinine	Cystatin C is a more sensible biomarker of reduced GFR than serum creatinine.

GFR = glomerular filtration rate

similar to the GFR estimated by MDRD formula based on creatinine to monitor the renal function of these patients.

CYSTATIN C AND CARDIOVASCULAR RISK

In the last decade, cystatin C has been associated with the risk of cardiovascular disease in elderly population, diabetic patients, individuals with atherosclerosis and patients with CKD, which possibly reflects a very early stage of chronic kidney dysfunction in these individuals.⁽⁴³⁻⁴⁶⁾ Despite cystatin C is not an acute phase protein, it has been shown a significant association between cystatin C and CRP, which is an important biomarker of subclinical chronic inflammation associated with atherosclerosis and CKD.⁽⁴⁷⁾ Some studies have assessed the use of cystatin C to predict the risk of cardiovascular disease and they are summarized in Table 4.

Vigil et al.⁽⁴⁴⁾ followed 180 patients with CKD diagnosed by the GFR based on creatinine during 6 years. The patients were clustered in tercis according to cystatin C and creatinine values in the beginning of the study. It was analysed whether cystatin C could identify the patients with an increased risk of renal disease progression, death or cardiovascular events. They observed that, unlike creatinine, basal serum cystatin C was a predictor of mortality and of the development of cardiovascular events, suggesting that cystatin C is a useful biomarker to evaluate cardiovascular morbidity and mortality in patients with CKD.

Schottker et al.⁽⁴⁵⁾ evaluated the risk of cardiovascular disease in diabetic patients with CKD, which was defined by the GFR estimated by formulas based on creatinine

and cystatin C. They verified that only the definition of CKD based on cystatin C consisted on an independent predictor of the risk of cardiovascular events in diabetic patients, suggesting that the GFR based on cystatin C may show a better clinical utility to predict the cardiovascular risk than the GFR based on creatinine. Shlipak et al.⁽⁴⁶⁾ performed a study with 4.637 elderly people in order to compare plasma levels of creatinine and cystatin C as predictors of cardiovascular events and mortality. They showed that the highest levels of cystatin C were directly associated with a higher risk of mortality and that cystatin C was a stronger predictor of cardiovascular events than creatinine and the GFR estimated by creatinine.

In another study, Ix et al.⁽⁴⁷⁾ investigated the association between cystatin C with mortality, cardiovascular outcomes and congestive heart failure among 990 individuals with coronary artery disease. They observed that cystatin C serum levels were associated with mortality, cardiovascular outcomes and congestive heart failure. Moreover, high levels of cystatin C were able to predict the increase of the risk of these adverse clinical outcomes, even in individuals without microalbuminuria or reduced GFR. Jernberg et al.⁽⁴⁸⁾ also demonstrated that cystatin C improves substantially the risk stratification of the patients with suspected or confirmed non-ST elevation acute coronary syndrome. In other study, Ichimoto et al.⁽⁴⁹⁾ reported a prognostic value of cystatin C in patients with myocardial infarction with elevation of ST segment that underwent percutaneous coronary intervention. These authors observed a higher frequency of cardiovascular events among patients with higher plasma levels of cystatin C.

Table 4 - Studies that have assessed the use of cystatin C to predict the risk of cardiovascular disease

Author	Population	Data
Jernberg et al. (2004)	126 adult patients with symptoms suggestive of acute coronary syndrome (age > 18)	Cystatin C improves substantially the risk stratification of patients with suspected or confirmed non-ST elevation acute coronary syndrome.
Shlipak et al. (2005)	4,637 elderly individuals (age 65 or older)	Cystatin C was a stronger predictor of cardiovascular events and death than creatinine or GFR estimated by creatinine.
Luc et al. (2006)	9,758 male individuals aged 50 to 59 years without coronary heart disease	Cystatin C was independently associated with the occurrence of the first ischemic coronary event.
Ix et al. (2007)	990 adult patients with coronary heart disease (age > 18)	Cystatin C was associated with mortality, cardiovascular outcomes and congestive heart failure.
Ichimoto et al. (2009)	71 adult patients who underwent percutaneous coronary intervention for myocardial infarction with ST segment elevation (age > 18)	Cystatin C was associated with a higher frequency of cardiovascular events and rehospitalizations after myocardial infarction with elevation of ST segment.
Cepeda et al. (2010)	359 individuals aged over 49 years	Individuals that have cardiovascular risk factors, such diabetes mellitus, CKD and hypertension, showed increased levels of cystatin C.
Schottker et al. (2012)	1,153 patients with DM1 and DM2 (mean age 64 years)	The definition of CKD based on cystatin C, but not the one based on creatinine, consisted on an independent predictor of the risk of cardiovascular events in diabetic patients.
Vigil et al. (2014)	180 adult patients with CKD (age > 18)	Cystatin C, but not serum creatinine, was a predictor of mortality in general and cardiovascular mortality in patients with CKD.

CKD = chronic kidney disease. GFR = glomerular filtration rate. DM1 = type 1 diabetes mellitus. DM2 = type 2 diabetes mellitus

Cepeda et al.⁽⁵⁰⁾ have determined the prevalence of higher cystatin C plasma levels in general population, including 415 individuals with more than 49 years old, and its relation with risk factors for cardiovascular disease. They found a high prevalence of individuals with increased levels of cystatin C among those that have cardiovascular risk factors, such as diabetes mellitus, CKD and hypertension. They have also observed a correlation between cystatin C levels and biomarkers of cardiovascular risk, such as RPC, homocysteine and fibrinogen. Luc et al.⁽⁵¹⁾ investigated the association between cystatin C plasma levels and the incidence of coronary arterial disease, in a longitudinal study that has involved 9758 healthy men aging between 50 and 59 years old, who were followed during 5 years. They observed that after the adjustment for traditional cardiovascular risk factors (age, diabetes mellitus, tabagism, hypertension, body index mass, triglycerides, cholesterol LDL and HDL), cystatin C was significantly associated with the occurrence of the first ischemic coronary event.

CONCLUSION

There is still no ideal biomarker to evaluate renal function and cystatin C has been demonstrated to be a very promising one. The studies about the use of cystatin C show divergent results. However, most of them demonstrate that the cystatin C is equal or superior to the other available biomarkers in different groups of patients, such as patients with diabetes mellitus, CKD and kidney transplant. In these patients, cystatin C seems to be especially useful to detect early renal function decline. Moreover, cystatin C has been demonstrated to be an interesting biomarker of cardiovascular risk.

The laboratorial assessment of cystatin C is very expensive and still needs for standardization, and for this reason, it is not widely performed. New studies that confirm the superiority of cystatin C in comparison to methods based on creatinine, or that demonstrate the advantages of the association between these biomarkers to evaluate the GFR of different groups of patients, are still necessary for routinely use of cystatin C in the clinic. The future use of the cystatin C may contribute to improve the early diagnosis of CKD, allowing an early treatment and the prevention of the progression of the CKD and the development of cardiovascular complications.

Acknowledgments

The authors thank FAPEMIG, CAPES and CNPq/Brazil.

Resumo

A avaliação precisa da progressão do declínio da função renal é muito importante, já que o estabelecimento precoce de terapias renoprotetoras pode prevenir ou retardar o desenvolvimento da doença renal terminal. Até o momento, não existe um biomarcador ideal para avaliar a taxa de filtração glomerular, e a cistatina C tem demonstrado ser muito promissora. Nesta revisão, nós reunimos vários estudos que avaliaram o uso da cistatina C para avaliar a taxa de filtração glomerular em pacientes com doença renal crônica, diabetes mellitus e sob hemodiálise, e também o uso da cistatina C para prever o risco de eventos cardiovasculares. Apesar de ter sido demonstrado por vários autores que a cistatina C é igual ou superior aos outros biomarcadores disponíveis, algumas limitações ainda precisam ser superadas para que a cistatina C possa ser utilizada na clínica para melhorar o diagnóstico precoce da doença renal crônica.

Palavras-chave

Doenças cardiovasculares; Cistatina C; Nefropatias diabéticas; Transplante de rim; Insuficiência renal crônica

REFERENCES

1. Bastos MG, Bregman R, Kirsztajn GM. Chronic kidney diseases: common and harmful, but also preventable and treatable. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56:248-53.
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013; 3:1-150.
3. Cirillo M. Evaluation of glomerular filtration rate and of albuminuria/proteinuria. *J Nephrol.* 2010;23:125-32.
4. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976;16:31-41.
5. Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ, GROUP MS. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine [Abstract]. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:A0828.
6. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150:604-12.
7. Massey D. Commentary: clinical diagnostic use of cystatin C. *J Clin Lab Anal.* 2004;18:55-60.
8. Clausen J. Protein in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Biol Med.* 1961;107:170-2.
9. Butler EA, Flynn FV. The occurrence of part-gamma protein in urine: a new protein abnormality. *J Clin Pathol.* 1961;14:172-8.
10. Barret AJ, Davies ME, Grubb A. The place of human gamma trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;120:631-6.
11. Murussi M, Murussi N, Campagnolo N, Silveiro AP. Early detection of diabetic nephropathy. *Arq Bras Endrocrilnol Metab.* 2008; 53:442-51.
12. Filler G, Bokenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martínez-Brú C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR-history, indications, and future research. *Clin Biochem.* 2005;38:1-8.
13. Macissac RJ, Premaratne E, Jerums G. Estimating glomerular filtration rate in diabetes using serum cystatin C. *Clin Biochem Rev.* 2011;32: 61-7.
14. Nitta K, Hayashi T, Uchida K, et al. Serum cystatin C concentration as a marker of glomerular filtration rate in patients with various renal diseases. *Intern Med.* 2002;41:931-5.
15. Hojs R, Bevc S, Ekart R, Gorenjak M, Puklavec L. Serum cystatin C as an endogenous marker of renal function in patients with mild to moderate impairment of kidney function. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:1855-62.
16. Kazama JJ, Kutsuwada K, Ataka K, Maruyama H, Gejyo F. Serum cystatin C reliably detects renal dysfunction in patients with various renal diseases. *Nephron.* 2002;91:13-20.

17. Villa P, Jiménez M, Soriano MC, Manzanares J, Casasnovas P. Serum cystatin C concentrations as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *Crit Care*. 2005;9:139-43.
18. Peralta CA, Katz R, Sarnak MJ, et al. Cystatin C identifies chronic kidney disease patients at higher risk for complications. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:147-55.
19. Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA*. 2011;305:1545-52.
20. Rule AD, Bailey KR, Lieske JC, Peyser PA, Turner ST. Estimating the glomerular filtration rate from serum creatinine is better than from cystatin C for evaluating risk factors associated with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83:1169-76.
21. Hari P, Ramakrishnan L, Gupta R, Kumar R, Bagga A. Cystatin C-based glomerular filtration rate estimating equations in early chronic kidney disease. *Indian Pediatr*. 2014;51:273-7.
22. MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Thomas MC, et al. The accuracy of cystatin C and commonly used creatinine based methods for detecting moderate and mild chronic kidney disease in diabetes. *Diabet Med*. 2007;24:443-8.
23. Jeon YL, Kim MH, Lee WI, Kang SY. Cystatin C as an early marker of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Clin Lab*. 2013;59:1221-9.
24. Jeon YK, Kim MR, Huh JE, et al. Cystatin C as an early biomarker of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*. 2011;26:258-63.
25. Pucci L, Triscorna S, Lucchesi D, et al. Cystatin C and estimates of renal function: searching a better measure of kidney function in diabetic patients. *Clin Chem*. 2007;53:480-8.
26. Tan GD, Lewis AV, James TJ, Altmann P, Taylor RP, Levy JC. Clinical usefulness of cystatin C for the estimation of glomerular filtration rate in type 1 diabetes: reproducibility and accuracy compared with standard measures and iohexol clearance. *Diabetes Care*. 2002;25:2004-9.
27. Mussap M, Dalla Vestra M, Fioretto P, et al. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney Int*. 2002;61:1453-61.
28. Shimizu A, Horikoshi S, Rinno H, Kobata M, Saito K, Tomino A. Serum cystatin C may predict the early prognostic stages of patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal*. 2003;17:164-7.
29. Christensson AG, Grubb AO, Nilsson JA, Norrgren K, Sterner G, Sundkvist G. Serum cystatin C advantageous compared with serum creatinine in the detection of mild but not severe diabetic nephropathy. *J Intern Med*. 2004;256:510-8.
30. MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Thomas MC, et al. Estimating glomerular filtration rate in diabetes: a comparison of cystatin C and creatinine-based methods. *Diabetologia*. 2006;49:1686-9.
31. Krolewski AS, Warram JH, Forsblom C, et al. Serum concentration of cystatin C and risk of end-stage renal disease in diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35:2311-6.
32. Premaratne E, MacIsaac RJ, Finch S, Panagiotopoulos S, Ekinci E, Jerums G. Serial measurements of cystatin C are more accurate than creatinine-based methods in detecting declining renal function in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2008;31:971-3.
33. Perkins BA, Nelson RG, Ostrander BE, et al. Detection of renal function patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:1404-12.
34. Oddoze C, Morange S, Portugal H, Berland Y, Dussol B. Cystatin C is not more sensitive than creatinine for detecting early renal impairment in patients with diabetes. *Am J Kidney Dis*. 2001;38:310-6.
35. Li HX, Xu GB, Wang XJ, Zhang XC, Yang JM. Diagnostic accuracy of various glomerular filtration rates estimating equations in patients with chronic kidney disease and diabetes. *Chin Med J*. 2010;123:745-51.
36. Iliadis F, Didangelos T, Ntemka A, et al. Glomerular filtration rate estimation in patients with type 2 diabetes: creatinine-or cystatin C based equations? *Diabetologia*. 2011;54:2987-94.
37. Malheiro J, Fonseca I, Martins LS, et al. A comparison between serum creatinine and cystatin C based equations for estimation of graft function. *Transplant Proc*. 2012;44:2352-6.
38. Jung YJ, Lee HR, Kwon OJ. Comparison of serum cystatin C and creatinine as a marker for early detection of decreasing glomerular filtration rate in renal transplants. *J Korean Surg Soc*. 2012;83:69-74.
39. Krishnamurthy N, Arumugasamy K, Anand U, Anand CV, Aruna V, Venu G. Serum cystatin C levels in renal transplant recipients. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26:120-4.
40. White C, Akbari A, Hussain N, Dinh L, Lepage N, Knoll GA. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: a comparison between serum creatinine and cystatin C-based methods. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3763-70.
41. Le Bricon T, Thervet E, Froissart M, et al. Plasma cystatin C is superior to 24 h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation. *Clin Chem*. 2000;46:1206-7.
42. Risch L, Huber AR. Assessing glomerular filtration rate in renal transplant recipients by estimates derived from serum measurements of creatinine and cystatin C. *Clin Chim Acta*. 2005;356:204-11.
43. Vigil A, Condés E, Vigil L, et al. Cystatin C as a predictor of mortality and cardiovascular events in a population with chronic kidney disease. *Int J Nephrol*. 2014;2014:127943.
44. Schöttker B, Herder C, Müller H, Brenner H, Rothenbacher D. Clinical utility of creatinine and cystatin C based definition of renal function for risk prediction of primary cardiovascular events in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35:879-86.
45. Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, et al. Cystatin C and the risk of death and cardiovascular among elderly persons. *N Engl J Med*. 2005;352:2049-60.
46. Ix JH, Shlipak MG, Chertow GM, Whooley MA. Association of cystatin C with mortality, cardiovascular events, and incident heart failure among persons with coronary heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Circulation*. 2007;115:173-9.
47. Bökenkamp A, Herget-Rosenthal S, Bökenkamp R. Cystatin C, kidney function and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol*. 2006;21(9):1223-30.
48. Jernberg T, Lindahl B, James S, Larsson A, Hansson LO, Wallentin L. Cystatin C: a novel predictor of outcome in suspected or confirmed non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*. 2004;110(16):2342-8.
49. Ichimoto E, Jo K, Kobayashi Y, Inoue T, Nakamura Y, Kuroda N, et al. Prognostic significance of cystatin C in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circ J*. 2009;73(9):1669-73.
50. Cepeda J, Tranche-Iparraguirre S, Marín-Iranzo R, et al. Cystatin C and cardiovascular risk in the general population. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(4):415-22. [Article in Spanish].
51. Luc G, Bard JM, Lesueur C, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, et al. Plasma cystatin C and development of coronary heart disease: The PRIME Study. *Atherosclerosis*. 2006;185(2):375-80.

Correspondência

Caroline Pereira Domingueti

*Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400 – Chanadour
35501-296 – Divinópolis - MG, Brasil*

Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina

Mechanisms of resistance of Candida albicans to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin

Ana Júlia Hoffmann Vieira¹
Jairo Ivo dos Santos²

Resumo

Candida albicans é a espécie mais comum do gênero *Candida* a causar infecções invasivas humanas. Essas infecções estão associadas a alta morbidade e alta mortalidade nos pacientes acometidos. Uma das razões pode ser devido à resistência da levedura aos antifúngicos como fluconazol, anfotericina B e caspofungina, que são utilizados na sua terapêutica. A resistência de *Candida albicans* ocorre por diversos mecanismos como, por exemplo, mutação e recombinação mitóticas, com formação de componentes-alvo dos antifúngicos com menor afinidade de ligação a ele, por superexpressão de bombas de efluxo e formação de biofilmes.

Palavras-chave

Farmacoresistência fúngica; *Candida albicans*; Antifúngicos

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* constitui o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas no ser humano. Este gênero compõe-se de cerca de 150-200 espécies, muitas das quais podem habitar o trato gastrointestinal, sistema urogenital, pele, e mucosa do trato respiratório de seres humanos.⁽¹⁾ Elas se tornam patogênicas em pacientes com o sistema imunológico comprometido e, nestas circunstâncias, podem causar doença em praticamente todos os órgãos e tecidos, resultando em infecção superficial, invasiva e sistêmica.⁽¹⁾ Portanto, estão emergindo como agentes de infecções principalmente em neonatos, imunocomprometidos, idosos, diabéticos, pós-operados, uso prolongado de antibióticos, pacientes internados, uso de corticoides, transplantados, uso de catéteres, nutrição parenteral, gravidez e uso de anti-concepcionais.^(1,2)

As espécies de leveduras do gênero *Candida* mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, sendo que a *C. albicans* permanece como a espécie mais comum nas infecções humanas.^(1,2)

A *C. albicans* constitui-se de uma levedura diploide com dois pares de oito cromossomos. Multiplica-se por brotamento e, em determinadas situações, pode produzir tubo germinativo e então crescer como pseudo-hifa ou hifa verdadeira. A identificação definitiva é geralmente realizada por provas bioquímicas de assimilação de açúcares, utilizando-se kits comerciais como API 20C AUX (BioMérieux), ID 32C (BioMérieux), Candifast (International Microbio) ou pelo sistema automatizado Vitek system (BioMérieux) ou Vitek 2 (BioMérieux).^(1,2)

As manifestações clínicas na candidíase apresentam grande diversidade de quadros, como candidíase cutâneo-mucosa e candidíase invasiva ou sistêmica. A candidíase cutâneo-mucosa consiste em manifestações superficiais, apresentando as seguintes formas: candidíase intertriginosa, onicomicose, candidíase oral, vulvovaginite, balanopostite e candidíase cutâneo-mucosa crônica. Já a candidíase invasiva ou sistêmica caracteriza-se por apresentar infecções profundas ou invasivas, podendo localizar-se em um órgão ou disseminar-se via sanguínea (candidemia). Apresentam-se como quadros de sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, renal, ocular, do sistema nervoso central, ou disseminada, que é uma forma clínica de difícil tratamento.⁽¹⁾

¹Graduanda. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis - SC, Brasil.

²Professor. Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis - SC, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis - SC, Brasil.

Conflitos de interesse: Não há conflitos de interesse.

Artigo recebido em 14/08/2015

Artigo aprovado em 04/02/2016

DOI: 10.21877/2448-3877.201600407

As infecções invasivas estão associadas a internações prolongadas, com elevada taxa de mortalidade e aumento no custo hospitalar.^(1,3) Nesses casos, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica.^(1,2)

Antifúngicos utilizados na terapêutica da candidíase invasiva

Dentre os antifúngicos utilizados na terapêutica de candidíases invasivas destacam-se triazólicos, como fluconazol, derivados poliênicos, como anfotericina B, e, do grupo das equinocandinas, a caspofungina.^(1,2)

A anfotericina B é indicada para formas graves de doença invasiva, pertence ao grupo dos poliênicos. São grandes moléculas que atuam na membrana celular fúngica, onde possui grande afeição pelo ergosterol, justificando sua especificidade. Também interferem com a permeabilidade e com as funções de transporte pela sua capacidade de formar grandes poros na membrana causando distúrbios graves no equilíbrio iônico, com perda de K⁺ extracelular,⁽⁴⁾ além de utilizar múltiplas vias de sinalização intracelular para indução da morte da levedura.⁽⁵⁾

Azólicos constituem um grupo de agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade, baseados nos núcleos imidazol ou triazol.⁽⁶⁾ Eles atuam inibindo a enzima fúngica lanosina-14 α -desmetilase, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, afetando diretamente a fluidez da membrana e nas enzimas ligadas a ela.^(4,5) No caso de infecção invasiva, um dos mais utilizados é o fluconazol.⁽⁶⁾ É um antifúngico triazólico que alcança grandes concentrações no líquido cefalorraquidiano, podendo ser a primeira opção nos casos de meningite fúngica, alcançando também boas concentrações no humor vítreo, saliva, pele, unhas e tecido vaginal.⁽⁴⁾

A caspofungina pertence ao grupo das equinocandinas e é administrada intravenosamente. Ele atua contra o crescimento de fungos através da inibição da β -1,3-D-glucanosintase.⁽⁶⁾ Este polímero é necessário para manter estável a estrutura das paredes celulares fúngicas, sendo que, na sua ausência, as células fúngicas perdem a integridade e ocorre a sua lise.⁽⁶⁾ O amplo espectro de atividade fungicida contra as espécies de *Candida*, baixos efeitos colaterais e perfil de interação favorável faz da caspofungina terapia de primeira linha para as diversas manifestações clínicas da candidíase.⁽⁷⁾

Mecanismos de resistência de *C. albicans* a antifúngicos

Uma vez identificado o patógeno causador da infecção, a falha na terapia antifúngica pode ocorrer por diver-

sos fatores, como resistência *in vitro* (intrínseca ou desenvolvida ao longo da terapia) ou resistência clínica.⁽⁸⁾

A resistência clínica ocorre quando o fungo é aparentemente susceptível ao antifúngico *in vitro*, porém não *in vivo*, devido à impossibilidade do antifúngico agir no seu alvo. Pode ser resultado de terapia em pacientes muito imunodeprimidos, neutropênicos, infecção em tecidos pouco vascularizados ou abscessos fechados, falta de aderência do paciente ao tratamento e formação de biofilmes em próteses e catéteres.

Várias espécies de leveduras do gênero *Candida* têm a habilidade de produzir biofilme, inclusive *C. albicans*.^(8,9)

A resistência microbiológica, por sua vez, envolve mecanismos moleculares e pode ser intrínseca ou adquirida.⁽⁸⁾ A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de microrganismo e confere a ele a resistência inata antes da exposição deste ao antifúngico. Isso ocorre, por exemplo, com a espécie de *C. krusei*, que possui resistência intrínseca ao fluconazol.⁽⁸⁾ Já a resistência adquirida ocorre em microrganismos que desenvolveram mutações após a exposição ao antifúngico e posteriormente houve a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes.⁽⁸⁾

Fatores de transcrição mutantes contribuem com a formação de resistência microbiológica aos antifúngicos. A resistência que ocorre em *C. albicans* inclui uma variação que tem como fundo a descendência clonal. A falta de recombinação sexual leva à aquisição de resistência a drogas através da plasticidade do genoma e aumento de taxas de mutação e de recombinação mitóticas.⁽¹⁰⁾ Entretanto, a resistência mediada por bombas de efluxo é uma das mais comuns.⁽¹⁰⁾ Na Tabela 1 estão descritos os principais mecanismos de resistência de *C. albicans* para os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina.

As bombas de efluxo são compostas por proteínas, que estão divididas em dois grupos com base na sua estrutura e tipo de energia que utilizam para o transporte de várias moléculas. O primeiro grupo inclui transportadores que utilizam a degradação de ATP como fonte de energia, a esse grupo de proteínas dá-se o nome de família ABC (casete de ligação de ATP). Já o segundo grupo consiste de transportadores cuja energia é obtida a partir de um gradiente de concentração de prótons presentes em membranas biológicas. Esta categoria é constituída por proteínas MFS (*Major Facilitator Superfamily*).^(8,11) Observa-se que mutações em genes que interferem na regulação das bombas de efluxo podem levar à superexpressão destas, fato que ocorre em certos casos de resistência, onde a concentração de antifúngico no microrganismo e sua ação são alterados pela retirada de droga.⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Na literatura tem sido relatada ocorrência relativamente baixa de casos de resistência à anfotericina B, pois mutações que levam a esse tipo de resistência trazem

Tabela 1 - Mecanismos de resistência de *C. albicans* para anfotericina B, fluconazol e caspofungina

Mecanismos de Resistência
Anfotericina B: <ul style="list-style-type: none"> - Mutação do gene <i>ERG3</i>.⁽¹⁴⁾ - Alteração na composição da membrana como o aumento de esfingolipídeos.⁽¹⁸⁾
Fluconazol: <ul style="list-style-type: none"> - Mutação no gene <i>ERG11</i>.^(24,25) - Superexpressão do gene <i>ERG11</i>.^(14,26) - Mutação no gene <i>ERG3</i>.^(27,28) - Ação do gene <i>RTA2</i> na regulação positiva da calcineurina.⁽¹⁹⁾ - Ação da enzima calcineurina na sinalização de eventos em resposta à ação do antifúngico.⁽²⁰⁻²²⁾ - Ação de enzimas antioxidantes fúngicas ao estresse oxidativo induzido por fluconazol.⁽¹⁸⁾ - Ação da proteína do choque térmico <i>Hsp90</i>.⁽²³⁾ - Ação de histona desacetilases na expressão de genes.⁽²⁹⁾
Caspofungina: <ul style="list-style-type: none"> - Mutação no gene <i>FKS1</i> que codifica β-1,3-D-glucano-sintase.^(14,30)
Resistência a Múltiplos Antifúngicos: <ul style="list-style-type: none"> - Biofilme.⁽⁹⁾ - Bombas de Efluxo*.⁽¹¹⁻¹⁴⁾

*Exceto para caspofungina.⁽¹¹⁾

consequências à sobrevivência da levedura, diminuindo drasticamente sua tolerância a estresses externos bem como aumentando a ocorrência de defeitos na filamentação e invasão tecidual.⁽¹⁵⁾ Os mecanismos envolvidos em aumento de resistência à anfotericina B resultam de alterações na composição da membrana plasmática fúngica, alterações quantitativas de esfingolipídeos na membrana com diminuição da formação de ergosterol e funcionamento incorreto de bombas de efluxo, mutação do gene *ERG3*, que leva à formação de esteróis com menor afinidade de ligação da anfotericina B⁽¹⁴⁾ e superexpressão de bombas de efluxo.⁽¹⁶⁾

Esfingolipídeos podem modular a resistência à anfotericina B.⁽¹⁷⁾ Eles são necessários para vários processos celulares, incluindo a manutenção da integridade da membrana plasmática e bom funcionamento de certas proteínas da membrana. Alterações na composição da membrana, como o aumento de esfingolipídeos, podem afetar positivamente o funcionamento de bombas de efluxo.⁽¹⁷⁾ A quantidade de esfingolipídeos presentes na membrana é balanceada com a de ergosterol, sendo que, se há uma alteração quantitativa nos esfingolipídeos também haverá no ergosterol, e, conseqüentemente, na oferta de sítio de ligação de anfotericina B.⁽¹⁷⁾ Além disso, a diminuição da produção de ergosterol causada pelo tratamento anterior com azólicos pode levar secundariamente a um aumento de resistência a anfotericina B devido à menor oferta de sítio de ligação e possível superexpressão de bombas de efluxo.⁽¹⁷⁾ Por fim, outro mecanismo de resistência reportado é o da redução da sensibilidade ao antifúngico em resposta adaptativa ao estresse oxidativo induzido pela ação de anfotericina B.⁽¹⁸⁾

Jia et al., em 2009,⁽¹⁹⁾ reportaram que o gene *RTA2* está envolvido no surgimento de resistência aos azólicos em *C. albicans* por meio da regulação positiva da calcineurina.⁽¹⁹⁾ A calcineurina é uma fosfatase ativada por Ca^{2+} e calmodulina, que está presente em células eucariontes e atua na sinalização da célula fúngica em resposta a estímulos externos.⁽¹⁹⁾ A *RTA2* está envolvida na redução de sensibilidade *in vitro* de *C. albicans* ao fluconazol, bloqueando sua capacidade de danificar a membrana através da regulação da calcineurina.⁽²⁰⁾ Quando há mutação na calcineurina, esta se torna inviável na redução da sensibilidade de fluconazol e outros azólicos, tornando assim a calcineurina essencial para o desenvolvimento de resistência.^(21,22)

A proteína do choque térmico *Hsp90* também é um regulador da resposta ao estresse, ela está envolvida de produção de biofilme.⁽²³⁾ O estresse oxidativo induzido pela ação de fluconazol pode ser reparado por resposta adaptativa, contribuindo para a redução da sensibilidade ao antifúngico.⁽¹⁸⁾

Mutações no gene *ERG11* estão associadas com resistência aos azólicos, pois afetam a expressão do gene que pode mudar a afinidade de lanosterol-14- α -demethylase por drogas azólicas,^(24,25) bem como alterações quantitativas destas proteínas.^(14,26) Por outro lado, mutações no gene *ERG3* também aumentam a resistência de *C. albicans* ao fluconazol.^(27,28)

Li et al.⁽²⁹⁾ mostraram a importância do papel da família de histona desacetilases (HDACs) no desenvolvimento de resistência aos azólicos em *C. albicans*. A desacetilação de histona pode levar à expressão de genes relacionados aos estágios iniciais de adaptação ao estresse azólico, tais como genes associados às proteínas transportadoras nas bombas de efluxo.⁽²⁹⁾ Histonas desacetilases são uma família de enzimas importantes que atuam no núcleo para desacetilar histonas em lisinas, fatores de transcrição, proteínas de transdução de sinal e outras proteínas celulares.⁽²⁹⁾

A caspofungina não sofre os efeitos da bomba de efluxo presentes em *C. albicans* já que não atinge concentrações apreciáveis no ambiente intracelular da levedura.⁽¹¹⁾ Contudo, há relatos de diminuição da susceptibilidade de *C. albicans* à caspofungina relacionada à mutação no gene *FKS1* que codifica a enzima β -1,3-D-glucano-sintase.⁽¹⁴⁾ Múltiplas mutações em *FKS1* têm um maior risco de falha terapêutica, e as várias mutações *FKS1 SH* diferem em elevações nas concentrações inibitórias mínimas do antifúngico.⁽³⁰⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o aumento do uso de drogas antifúngicas, o número de relatos de resistência aos medicamentos antifúngicos também aumentou, o que evidencia ainda mais a

necessidade de se compreenderem os mecanismos celulares moleculares envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antifúngicos.

Não foram desenvolvidas até o momento estratégias definitivas para se evitar e combater o aparecimento de resistência a antifúngicos. Entretanto, pode ser possível desenvolver procedimentos análogos àqueles que são utilizados para os antibacterianos como, por exemplo, uso adequado nas dosagens de antifúngicos, escolha de um antifúngico mais adequado a um determinado fungo, aderência do paciente ao tratamento, aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico das infecções fúngicas e melhoria no monitoramento da susceptibilidade ou resistência dos isolados fúngicos, que deve ser considerada a fim de melhor detectar o surgimento de cepas resistentes ou não.

Abstract

Candida albicans is the most frequent species of the genus *Candida* to cause invasive infections. These infections are associated with high morbidity and mortality in the infected patients. One reason may be due to resistance to antifungal agents used in the therapeutics of the infections such as fluconazole, amphotericin B e Caspofungin. Resistance occurrence in *Candida albicans* is reported to occur by several mechanisms such as mutation and mitotic recombination, with the formation of the antifungal target components with lower binding affinity to it, overexpression of efflux pumps and biofilm formation.

Keywords

Fungal drug resistance; *Candida albicans*; Antifungal agents

REFERÊNCIAS

- Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie, EJ, Mcginnis, MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 2009.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1):133-63.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010;51(5):561-70.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Gardner P. In: *Fármacos Antifúngicos*. Farmacologia. Elsevier, 7ª ed. 2011.
- Chudzik B, Koselski M, Czurylo A, Trebacz K, Gagos M. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. *Eur Biophys J*. 2015;44(1-2):77-90.
- Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11(6):272-9.
- Thompson GR, Wiederhold NP, Vallor AC, Villareal NC, Lewis JS, Patterson TF. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10): 3783-5.
- Arthington-Skaggs BA, Rex JH. Resistance to Antifungal Agents. In: Fong IW, Drlica K. *Antimicrobial resistance and implications for the 21st century*. Springer. 2008.
- El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;4(1):14-21.
- Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *ELife*. 2015;4(1):e00662.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(2):291-321.
- Lo HJ, Tseng KY, Kao YY, Tsao MY, Lo HL, Yang YL. Cph1p negatively regulates MDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(6):617-21.
- Zhang JY, Liu JH, Liu FD, Xia YH, Wang J, Liu X, et al. Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. *Mycoses*. 2014;57(10): 584-91.
- Jensen RH, Astvad KM, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF, et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother*. Publicado online: maio de 2015.
- Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol*. 2013;11(10):e100169.
- Ren B, Dai HQ, Pei G, Tong YJ, Zhuo Y, Yang N, et al. ABC transporters coupled with the elevated ergosterol contents contribute to the azole resistance and amphotericin B susceptibility. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(6):2609-16.
- Sharma S, Alfatah M, Bari VK, Rawal Y, Paul S, Ganesan K. Sphingolipid Biosynthetic Pathway Genes FEN1 and SUR4 Modulate Amphotericin B Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4):2409-14.
- Linares CE, Giacomelli SR, Altenhofen D, Alves SH, Morsch VM, Schetinger MR. Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(6):752-8.
- Jia XM, Wang Y, Jia Y, Gao PH, Xu YG, Wang L, et al. RTA2 is involved in calcineurin-mediated azole resistance and sphingoid long-chain base release in *Candida albicans*. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(1):122-34.
- Jia Y, Tang RJ, Wang L, Zhang X, Wang Y, Jia XM, et al. Calcium-Activated-Calcineurin Reduces the In Vitro and In Vivo Sensitivity of Fluconazole to *Candida albicans* via Rta2p. *PLoS One*. 2012; 7(10):e48369.
- Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*. 2003;48(4):959-76.
- Hameed S, Dhamgaye S, Singh A, Goswami SK, Prasad R. Calcineurin signaling and membrane lipid homeostasis regulates iron mediated multidrug resistance mechanisms in *Candida albicans*. *PLoS One*. 2011;6(4):e18684.
- Becherelli M, Tao J, Ryder NS. Involvement of heat shock proteins in *Candida albicans* biofilm formation. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2013;23(6):396-400.
- Carvalho VO, Okay TS, Melhem MSC, Szeszc WM, Del Negro GM. The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(3):209-12.
- Golabek K, Strzelczyk JK, Owczarek A, Cuber P, Słemp-Migiel A, Wiczowski A. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(2): 247-51.
- Song JL, Harry JB, Eastman RT, Oliver BG, White TC. The *Candida albicans* lanosterol 14- α -demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(4): 1136-44.

27. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AG, et al. Identification and characterization of four azole-resistant erg3 mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4527-33.
28. Vale-Silva LA, Coste AT, Ischer F, Parker JE, Kelly SL, Pinto E, et al. Azole resistance by loss of function of the sterol $\Delta^{5,6}$ -desaturase gene (ERG3) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):1960-8.
29. Li X, Cai Q, Mei H, Zhou X, Shen Y, Li D, et al. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(7):1993-2003.
30. Lackner M, Tscherner M, Schaller M, Kuchler K, Mair C, Sartori B, et al. Positions and Numbers of FKS Mutations in *Candida albicans* Selectively Influence In Vitro and In Vivo Susceptibilities to Echinocandin Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3626-35.

Correspondência

Jairo Ivo dos Santos

*Departamento de Análises Clínicas
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário, Trindade
88040-970 - Florianópolis - SC, Brasil*

Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenemases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica

Use of phenotypic tests for the research of carbapenemases in enterobacteria: a tool for clinical orientation

Jaime Antonio Abrantes¹

Joseli Maria da Rocha Nogueira²

Resumo

O aumento da resistência antimicrobiana é considerado, segundo a OMS, como um dos principais problemas da atualidade, sendo observado o aumento alarmante, nos últimos anos, da circulação de cepas com perfil de multirresistência, especialmente aos antimicrobianos de última geração, incluindo Ceftriaxona e Cefepime (cefalosporina de 3ª e 4ª geração) e Carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem) utilizados como prática no tratamento de diversas infecções. No entanto, esta prática vem favorecendo a seleção de microrganismos resistentes a estes fármacos, através de diversos mecanismos, incluindo a aquisição de β -lactamases de espectro estendido ou genes de resistência localizados em elementos móveis, que, conseqüentemente, resultam em falhas terapêuticas no tratamento empírico de infecções invasivas. A combinação entre estes fatores favorece a seleção de microrganismos com perfil MDR (*Multidrug Resistance*), facilitando a implantação e disseminação destes microrganismos em diferentes ambientes, tanto comunitários quanto nosocomiais, que podem resultar em infecções graves de difícil controle e tratamento clínico limitado.

Palavras-chave

Carbapenemase; KPC; NDM; Metalobetalactamases

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grande desafio no tratamento de infecções causadas por determinados microrganismos, pois muitas vezes as opções de fármacos são mínimas.^(1,2) As enterobactérias podem apresentar muitos mecanismos de resistência que variam desde deficiência de porinas até a produção de enzimas capazes de inativar a ação de drogas antimicrobianas, como exemplo as beta-lactamases. Atualmente são descritas aproximadamente 35 enzimas beta-lactamases distintas, das quais algumas, como as carbapenemases, têm apresentado maior relevância, tendo em vista sua distribuição clonal e o impacto que vem sendo observado pela falha no tratamento de infecções por estes microrganismos.⁽³⁾

As carbapenemases são enzimas que atribuem às bactérias resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos. A emergência das bactérias produtoras de carbapenemase

gera um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. As infecções por enterobactérias que contêm este tipo de enzima aumentam a taxa de mortalidade dos pacientes acometidos, pela dificuldade no tratamento, já que existem poucas alternativas eficazes na eliminação e controle destas infecções.⁽⁴⁾

Existem vários tipos de carbapenemases que são transmitidos de um organismo a outro através de mecanismos de trocas genéticas que acontecem no ambiente, incluindo a transferência de elementos genéticos móveis. A globalização certamente contribui para a disseminação de microrganismos que carregam características de resistência, pois podem ser disseminados através da migração de pessoas entre países, que acabam por transportar de um hemisfério a outro microrganismos portadores destas enzimas. Apesar da influência dos hábitos alimentares, importação de animais de produção e plantas ornamentais terem influência na disseminação destes microrganismos,

¹Mestre. Instituto Nacional de Cardiologia - MS – Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

²Doutorado. Chefe do Laboratório de Microbiologia - ENSP - Fiocruz – Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Instituição: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - ENSP/Fiocruz – Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Artigo recebido em 09/08/2017

Artigo aprovado em 04/09/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700607

a presença de cada um dos tipos de carbapenemases em microrganismos responsáveis por infecções e colonizações pelo mundo ainda é distribuída de forma que cada região ou continente tenha um tipo prevalente.⁽³⁾ Nesse cenário torna-se imprescindível conhecer as metodologias aplicadas ao diagnóstico, permitindo a interpretação correta e rápida e o reconhecimento dos mecanismos de resistência envolvidos, assim como a prática de prevenção para evitar a disseminação destes microrganismos e restringir o uso de antimicrobianos, utilizando-os de maneira adequada.⁽⁵⁾

MATERIAL E MÉTODOS

Este artigo de revisão compõe-se de pesquisa bibliográfica, que fundamentou sua base teórica por meio de livros, *guidelines* utilizados por profissionais da área, como o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), que é o órgão internacional americano responsável pelas recomendações e padronização das etapas para a realização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos e estabelece os pontos de corte para a interpretação dos resultados, e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), que é o comitê europeu e apresenta alguns padrões não contemplados pelo comitê americano. Foram utilizados trabalhos científicos com dados recentes obtidos através da ferramenta de busca PubMed, utilizando as palavras-chave carbapenemases, β -lactamases, infecções bacterianas e multirresistência como descritores, para caracterizar as carbapenemases e seu diagnóstico laboratorial de acordo com o cenário mundial no período de 2010 a 2014.

CARBAPENEMASES

A produção de enzimas beta-lactamases tem sido relatada como um importante mecanismo bacteriano de resistência a antibióticos beta-lactâmicos, já que, hidrolisando o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, o antimicrobiano perde a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana.⁽⁶⁾

Determinados microrganismos, como as enterobactérias, podem apresentar como mecanismo de resistência a produção de beta-lactamase do tipo denominado "carbapenemase" quando há a capacidade enzimática do microrganismo de hidrolisar um antimicrobiano beta-lactâmico da classe dos carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos, reduzindo sua ação bactericida. Sendo assim, uma carbapenemase é um tipo específico de beta-lactamase.⁽⁷⁾ Foram descritos inúmeros tipos de beta-lactamases, com base em diversos critérios de classificação, porém existem duas classificações que são mais difundidas e utilizadas pela comunidade científica: a classificação de Ambler e a de Bush-Jacoby-Medeiros.^(8,9)

A classificação de Ambler foi baseada na sequência de aminoácidos, agrupando em classes de acordo com a estrutura molecular das beta-lactamases. Neste estudo foram propostas quatro classes distintas: A, B, C e D.⁽⁸⁾ Outra classificação, sugerida por Bush em 1989, foi baseada na correlação entre o substrato e as propriedades inibitórias da enzima.⁽¹⁰⁾ Anos depois, esta classificação foi atualizada com a introdução de características estruturais junto aos critérios anteriores, dividindo-se em quatro grupos: 1, 2, 3, 4. Embora sejam quatro grupos, o grupo 2 se subdivide em oito outros grupos e o grupo 3 em mais outros três.⁽⁹⁾ Para o estudo das carbapenemases consideramos as duas classificações, pois se complementam.

Entre as enterobactérias produtoras de carbapenemases, a *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* estão entre as mais relatadas em relação à presença deste mecanismo.⁽³⁾ Enterobactérias do gênero *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia* e *Proteus* são reportadas, porém com menos frequência e apresentam resistência aos antimicrobianos como Ceftriaxona e Cefepime (cefalosporina de 3ª e 4ª geração) e Carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem).^(11,12)

Classificação das carbapenemases

Na Classe A de Ambler estão alocadas as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que são inibidas pelo ácido clavulânico. Conferem resistência a várias cefalosporinas de amplo espectro e estão no grupo 2 de Bush-Jacoby-Medeiros. Já as carbapenemases deste grupo, pertencentes ao subgrupo 2f, são serino-carbapenemases, pois têm uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo, e contêm os tipos KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), NMC (Não Metalo carbapenemase), IMI (*Imipenem hydrolyzing* carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* enzyme) e GES (*Guiana extended spectrum*).^(8,9) Os vários tipos de carbapenemases de classe A começaram a ser notificados a partir de 1982 (SME), 1984 (IMI), 1990 (NMC), 1996 (KPC) e 2000 (GES).⁽¹³⁾ As GES, carbapenemases da classe A, têm sua capacidade hidrolítica aumentada dependendo do seu subtipo GES-1/2/3/4/5.^(14,15)

Já na Classe B estão as Metalobetalactamases (MBLs), que, além de resistentes aos beta-lactâmicos, são resistentes também aos inibidores de beta-lactamases, porém, são inibidas pelo ácido etilendiamino-tetracético (EDTA). Nesta classe de carbapenemase podemos encontrar as Metalobetalactamases dos subtipos SPM (São Paulo Metalobetalactamase), GIM (*German Imipenemase*), VIM (Verona Imipenemase), IMP (Imipenemase), AIM (*Australian Imipenemase*) e NDM (*New Deli Metalobetalactamases*).^(13,16) Essas últimas, relatadas inicialmente em 2006, na Índia, são carbapenemases de classe B, em que

ainda estão sendo detectadas novas variantes.⁽¹⁷⁾ A NDM-1, foi a primeira a ser descrita, e, assim como as outras MBLs, é zinco dependente.⁽¹⁶⁾ Até bem pouco tempo atrás, o subtipo NDM vinha sendo identificado somente em pacientes que tiveram alguma relação com a região geográfica da Índia e Paquistão, porém, na atualidade, já foram isolados na América do Sul de pacientes não contactantes com esses países.^(5,18,19)

Na Classe C, também classificada como grupo funcional 1, estão as cefalosporinas cromossomiais ou AmpC (Adenosina monofosfato cíclico), que por si só não conferem resistência aos carbapenêmicos.⁽⁹⁾ Entretanto, quando associadas à deficiência de porinas, podem promover redução da sensibilidade e até a resistência a esses antimicrobianos.⁽⁵⁾ É possível a mediação plasmidial de AmpC, inclusive em enterobactérias.⁽²⁰⁾

E, por último, na Classe D encontramos as Oxacilinas, que pertencem ao subgrupo funcional 2d. Elas hidrolisam as oxacilinas, oximinocefalosporinas e carbapenêmicos.⁽⁹⁾ Assim como as carbapenemases da classe A, as de classe D apresentam serino-enzimas.⁽¹⁴⁾ Em enterobactérias, as carbapenemases de classe D mais conhecidas são do subtipo OXA-48, o qual, apesar de não ser prevalente no Brasil, já está difundido em outros países.^(5,21) As Oxacilinas podem estar associadas a outros mecanismos de beta-lactamases, como CTX-M.⁽²²⁾ Além do OXA-48 existem muitos outros subtipos, como OXA-23, OXA-146, OXA-40, OXA-58, OXA-24 e OXA-40, geralmente encontrados em bactérias não fermentadoras.⁽²³⁾ As diferenças entre elas são estruturais e acabam refletindo em níveis maiores ou menores de resistência.⁽²⁴⁾

Diagnóstico laboratorial

É importante que se verifique a concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos em cepas não sensíveis a estes antimicrobianos, como também das polimixinas e tigeciclina para indicar a melhor terapêutica com base na dose mais precisa de antimicrobiano, pois pelo método de Kirby-Bauer (disco-difusão) temos apenas o critério interpretativo de resistente, intermediário e sensível.⁽⁵⁾

Em enterobactérias produtoras de carbapenemases, a presença da enzima é suficiente para hidrolisar os carbapenêmicos e reduzir a sensibilidade desta classe no TSA, sendo o ertapenem o primeiro carbapenêmico a apresentar resistência, pois é o marcador mais sensível para este mecanismo de resistência.⁽²⁵⁾ É recomendado, pela Anvisa,⁽⁵⁾ que em enterobactérias sejam testados os três carbapenêmicos disponíveis em nosso país: o imipenem, o meropenem e o ertapenem, pois se o resultado do teste indicar perfil intermediário ou resistente para qualquer um destes antimicrobianos, é sugestivo que o mesmo seja mediado pela produção de enzima carbapenemase.

As cepas caracterizadas como metalobetalactamases apresentam resistência a 90% das drogas utilizadas como escolha no tratamento empírico das infecções. O mapa genético mediado por plasmídeo de resistência em cepas caracterizadas como KPC apresenta resistência múltipla não só para betalactâmicos, mas também tal resistência está associada com outras classe de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas.⁽²⁶⁾

No entanto, a não sensibilidade aos carbapenêmicos não é regra para a presença de carbapenemases, pois a presença de beta-lactamases do tipo ESBL e AmpC associadas ou não à deficiência de porinas pode causar CIMs elevadas destes antimicrobianos.^(5,22)

Testes fenotípicos

Os testes fenotípicos são, ainda hoje, utilizados pela maioria dos hospitais e laboratórios em todo o mundo por serem métodos de baixo custo e de simples realização, permitindo a prática de estratégias de rotina para a busca de carbapenemases.⁽¹²⁾ Aqui no Brasil, alguns destes testes são padronizados pelo CLSI⁽²⁷⁾ e recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)⁽⁵⁾ como técnica de triagem diagnóstica, ressaltando que o diagnóstico final do mecanismo de resistência só pode ser obtido através de testes moleculares.

Tais testes são necessários tendo em vista que algumas vezes a avaliação molecular pode detectar a presença de genes de resistência, mas o mesmo não é expressado fenotipicamente.⁽¹²⁾ As amostras suspeitas de carbapenemases através da resistência aos carbapenêmicos e/ou testes fenotípicos positivos devem ser enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do estado para confirmação e análise molecular.⁽⁵⁾

Os testes de potencialização ou inibição da sensibilidade são realizados observando-se a diferença entre os halos produzidos em Müeller Hinton com os discos de carbapenêmicos puros (meropenem, ertapenem e imipenem) em comparação aos discos dos mesmos carbapenêmicos impregnados com alguma substância inibidora ou potencializadora.⁽¹⁾ A maioria dos testes fenotípicos, como a inibição com bloqueadores impregnados em disco, não é eficaz na triagem de carbapenemases de classe D.⁽¹²⁾

No Brasil, esta triagem é separada entre enterobactérias pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) e as não pertencentes a esse grupo. Esta divisão se deve à falsa positividade do teste para a detecção de KPC neste grupo.⁽⁵⁾ Portanto, a realização do teste fenotípico para Metalobetalactamases pode ser indicada para ambos os grupos, especialmente para os microrganismos que apresentam fenótipo de resis-

tência a carbapenêmicos, os quais podem estar associados à resistência a outras classes de antimicrobianos.

Discos de carbapenêmicos, meropenem e imipenem puros e impregnados com ácido fenilborônico (AFB) são utilizados para a detecção fenotípica de carbapenemases de classe A, principalmente do subtipo KPC.^(1,28,29) Um teste positivo é encontrado quando há diferença de ≥ 5 mm entre os discos não impregnados em relação aos mesmos discos com ácido fenilborônico. Nesse teste, o ácido fenilborônico realiza o bloqueio enzimático deste tipo de carbapenemase.⁽⁵⁾

De maneira semelhante ao teste de inibição com AFB, a inibição feita com EDTA junto aos carbapenêmicos resulta em um aumento de 5 mm ou mais em relação aos mesmos antimicrobianos puros, caso o teste seja positivo. A substância potencializadora, o EDTA, não sofre influência de outras beta-lactamases. Em um teste positivo, observamos o bloqueio enzimático das Metalobetalactamases, funcionando como um quelante de zinco.^(5,30)

Para a triagem de outros mecanismos que possam conferir resistência bacteriana a carbapenêmicos e que não sejam uma carbapenemase, como produção de ESBL e AmpC, é utilizada a cloxacilina, que inibe as transpeptidases e carbopeptidases, impedindo a síntese da parede celular bacteriana e é resistente ao efeito da penicilinase. Discos de carbapenêmicos impregnados com cloxacilina e outros somente com os carbapenêmicos são testados. O teste positivo se caracteriza pela potencialização da resistência, ou seja, o diâmetro do halo será menor com a cloxacilina, com diferença de 5 mm ou mais em relação ao carbapenêmico puro. Além disso, o teste com AFB também se encontra positivo no caso de AmpC plasmidial.^(5,12)

CONCLUSÃO

A identificação de mecanismos de resistência, além do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, é muito importante para nortear o tratamento clínico, pois sua detecção minimiza a possibilidade de falhas terapêuticas.

Os métodos fenotípicos aqui descritos, apesar de não serem a metodologia mais moderna e nem definitiva, como as análises moleculares para diagnóstico final das carbapenemases, podem contribuir de forma muito positiva e econômica no âmbito laboratorial, orientando assim a antibioticoterapia adequada e auxiliando indiscutivelmente na luta contra a resistência bacteriana.

Abstract

Increase in antimicrobial resistance is considered, according to the WHO, to be one of the main problems in present time, with an alarming increase in recent years in the circulation of strains with a multiresistant profile especially to the latest generation antimicrobials, including Ceftriaxone and Cefepime (cephalosporin of 3rd and 4th generation) and Carbapenems (Imipenem, Meropenem and Ertapenem) used as a

practice in the treatment of several infections. However, this practice has favored the selection of microorganisms resistant to these drugs, through several mechanisms, including the acquisition of extended-spectrum β -lactamases or resistance genes located in mobile elements, which consequently results in therapeutic failures in the treatment of Invasive infections. The combination of these factors favors the selection of MDR (Multidrug Resistance) microorganisms, facilitating the implantation and dissemination of these microorganisms in different environments, both communitarian and nosocomial, that can result in severe infections of difficult control and limited clinical treatment.

Keywords

Carbapenemase; KPC; NDM; Metallo-beta-lactamase

REFERÊNCIAS

1. Garbati MA, Al Godhair AI. The growing resistance of *Klebsiella pneumoniae*; the need to expand our antibiogram: case report and review of the literature. *Afr J Infect Dis*. 2013;7(1):8-10.
2. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist*. 2012;5:133-41.
3. Sheng WH, Badal RE, Hsueh PR. SMART Program. Distribution of Extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases, and carbapenemases among Enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: results of the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):2981-8.
4. Correa L, Martino MD, Siqueira I, Pasternak J, Gales AC, Silva CV, et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *BMC Infect Dis*. 2013;13:80.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota técnica nº 01/2013 - Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2013.
6. Williams JD. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;12 Suppl 1:S3-7.
7. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2001;32(7):1085-9.
8. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-31.
9. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.
10. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b⁹. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(3):264-70.
11. Amjad A, Mirza IA, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J Microbiol*. 2011;3(4):189-93.
12. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1295-302.
13. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-58, table of contents. Review.
14. Smith CA, Frase H, Toth M, Kumarasiri M, Wiafe K, Munoz J, et al. Structural basis for progression toward the carbapenemase activity in the GES family of β -lactamases. *J Am Chem Soc*. 2012;134(48):19512-5.
15. Poirer L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(9):2598-603.

16. Charan J, Mulla S, Ryavanki S, Kantharia N. New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern. *Pan Afr Med J*. 2012;11:22.
17. Cuzon G, Bonnin RA, Nordmann P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *PLoS One*. 2013;8(4):e61322.
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alerta Nº. 01/2011. Detecção de Metalobetalactamases do tipo NDM em dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* na Guatemala. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011.
19. PAHO/OMS. Alerta epidemiológica: transmissão de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud. Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS). 2012.
20. Meyer G, Picoli SU. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae*, de hospital de emergência de Porto Alegre. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(1):25-31.
21. Azimi L, Nordmann P, Lari AR, Bonnin RA. First report of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Iran. *GMS Hyg Infect Control*. 2014;9(1):Doc07.
22. van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis*. 2014;14:27.
23. Chu YW, Tung VW, Cheung TK, Chu MY, Cheng N, Lai C, et al. Carbapenemases in enterobacteria, Hong Kong, China, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):130-2.
24. Kaitany KC, Klinger NV, June CM, Ramey ME, Bonomo RA, Powers RA, et al. Structures of the class D Carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):4848-55.
25. Tsai YK, Liou CH, Fung CP, Lin JC, Siu LK. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. *PLoS One*. 2013; 8(11):e79640.
26. Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Multidrug Resistance Plasmid pKP048, Carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(9):3967-69.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, Pennsylvania. 2014.
28. Vali P, Shahcheraghi F, Seyfipour M, Zamani MA, Allahyar MR, Feizabadi MM. Phenotypic and Genetic Characterization of Carbapenemase and ESBLs Producing Gram-negative Bacteria (GNB) Isolated from Patients with Cystic Fibrosis (CF) in Tehran Hospitals. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(1):26-30.
29. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6): 1631-9.
30. Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Koumaki V, Xidopoulos G, Chatzipantazi V, et al. Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *J Clin Microbiol*. 2013;51(10):3176-82.

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira

R. Leopoldo Bulhões, 1480

Antiga escola politécnica, sala 21a - Manguinhos
21041-210 - Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Estudo *in vitro* do efeito do ácido ascórbico sobre os parâmetros de ureia e creatinina

In vitro effect of ascorbic acid on urea and creatinine parameters

Francisco Hermano Rufino de Moura¹

Joana Varlla de Lacerda Alexandre²

Rogério de Aquino Saraiva³

Helenicy Nogueira Holanda Veras⁴

Resumo

Objetivo: O presente trabalho teve como objetivo principal analisar as possíveis modificações *in vitro* do ácido ascórbico nos parâmetros bioquímicos de ureia e creatinina plasmática em amostras de plasma sanguíneo de voluntários saudáveis após a presença de altas concentrações de ácido L-ascórbico. **Métodos:** Concentrações crescentes de ácido ascórbico (5, 10 ou 40 mg/dL) foram adicionadas ao *pool* de soro humano e os analitos foram determinados até 1 hora após a adição. O método utilizado nas dosagens de ureia foi o da urease pelo método UV e o de creatinina plasmática foi o enzimático por reação de ponto final, ambas por método colorimétrico. **Resultados:** Foi verificado que, ao se adicionar a vitamina C nas concentrações de 5, 10 e 40 mg/dL aos *pools* controle, somente nas concentrações de 10 e 40 mg/dL houve mudanças significativas, sendo que, na concentração de 5 mg/dL, tanto nos parâmetros de ureia quanto no de creatinina, não houve relevante alteração. **Conclusão:** Conclui-se que a vitamina C, quando presente nas amostras biológicas de soro na concentração mínima de 10mg/dL, é responsável por promover interações com os constituintes dos testes nos parâmetros de ureia e creatinina plasmática. No presente trabalho, o tema abordado traz de fato uma relevante posição em nível de informação para que os analistas clínicos se policiem mais nas análises e liberação dos laudos laboratoriais.

Palavras-chave

Ácido ascórbico; Ureia; Creatinina

INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico participa diretamente das reações de redução no interior do organismo humano. A absorção da vitamina C é realizada nas porções distais do intestino delgado, que são o íleo e o jejuno. Existe um limiar de absorção do ácido ascórbico apresentado pelo intestino, que é de aproximadamente 1.200 mg/dia,⁽¹⁾ bem como outras funções muito importantes para o funcionamento biológico ideal do organismo, que são: atuação na síntese de colágeno, epinefrina, corticosteroides, ácido biliar e, ainda, acelera a absorção de ferro e inativa radicais livres.⁽²⁾

A interferência de diversas substâncias nas análises clínicas vem admitindo um importante papel na rotina laboratorial interferindo em ensaios e modificando o diagnóstico de diversos parâmetros laboratoriais, como o de glicemia, lipidograma, ácido úrico, ureia e creatinina. A vi-

tamina C apresenta um elevado potencial óxido-redutor, podendo interagir em algumas das fases das reações químicas com alguns elementos dos reagentes utilizados para a determinação dos mais diversos parâmetros bioquímicos.^(3,4)

Existem dois tipos de interferências que podem ocorrer no momento da análise, que são classificadas como: interferência *in vitro*, assim descrita como interferência que ocorre fora de um sistema vivo e interferência *in vivo*, descrita como interferência que ocorre no interior do próprio sistema vivo. Pode acontecer ainda ambos os mecanismos simultaneamente.⁽⁵⁾

As determinações dos parâmetros laboratoriais bioquímicos de ureia e creatinina têm importante papel na avaliação da função renal. Muitos avanços na área da medicina laboratorial foram operados em relação às ferramentas utilizadas desde a primeira dosagem de

¹Biomédico – Centro Universitário Leão Sampaio – Juazeiro do Norte - CE, Brasil.

²Discente do Curso de Biomedicina – Centro Universitário Leão Sampaio – Juazeiro do Norte - CE, Brasil.

³Doutor em Bioquímica Toxicológica – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife - PE, Brasil.

⁴Mestre em Bioprospeção Molecular – Centro Universitário Leão Sampaio – Juazeiro do Norte - CE, Brasil.

Instituição: Centro Universitário Leão Sampaio – UNILEÃO – Juazeiro do Norte - CE, Brasil.

Artigo recebido em 15/11/2016

Artigo aprovado em 02/10/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700548

creatinina feita por Jaffé em 1886.⁽⁶⁾ Com a degradação de proteínas pelo organismo, o principal metabólito gerado é a ureia. Cerca de 90% dessa ureia é excretada pelos rins, sendo o excedente liberado através do trato gastrointestinal e pela pele.⁽⁷⁾

A creatinina é um metabólito originado da degradação da creatina encontrada principalmente nos músculos esqueléticos. A partir do uso da creatina pelos músculos, o que acontece é uma transformação da creatina em creatinina. Toda a creatinina produzida pelo organismo é eliminada pelos rins. Uma vez que a creatinina é filtrada e o excesso não é eliminado, o organismo trata de reabsorver para posterior excreção. É por esse motivo que a dosagem de creatinina torna-se um importante parâmetro laboratorial bioquímico na avaliação da função renal e é de suma importância que essa dosagem venha associada com a dosagem de ureia.⁽⁸⁾

MATERIAL E MÉTODOS

Delimitação do estudo e local de execução dos testes

Tratou-se de um estudo experimental, realizado no Laboratório de Bioquímica do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, localizado na cidade de Juazeiro do Norte - CE.

Obtenção da vitamina e amostras biológicas

A vitamina C (ácido ascórbico) foi fornecida pela farmácia de manipulação Magistral, localizada na cidade de Juazeiro do Norte-CE. As amostras biológicas (soro) foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Clínica Escola do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio. Para execução dos testes foi utilizado soro de pacientes com valores de referência normais para os analitos (ureia e creatinina) a fim de preparar um *pool* de soro normal (500 µL de cada soro), totalizando 2 mL cada *pool*. Os critérios de rejeição para amostras de soro foram: presença de lipemia, hemólise e volume inferior a 500 µL.

Execução dos testes enzimáticos

Inicialmente foram preparados os *pools* utilizando-se 500 µL do soro de cada paciente, sendo empregadas quatro amostras em cada *pool*, obtendo-se um volume final de 2 mL e, ao final da produção dos *pools*, foram utilizadas amostras de soro de 12 pacientes. Em seguida foram adicionados a cada *pool* de soro concentrações crescentes da vitamina C obtendo-se uma concentração final de 5, 10 e 40 mg/dL.⁽⁹⁾ As determinações dos analitos bioquímicos foram feitas na primeira hora após a adição da vitamina, em triplicata, pelo método enzimático colorimétrico relativo a cada enzima e seguindo as instruções do fabricante (Labtest®).

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em média ± desvio padrão (DP) e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguindo-se do teste de Tukey, utilizando-se o programa GraphPad Prism 3.0. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de $p < 0,05$.

Aspectos éticos da pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Leão Sampaio com número de parecer 1.529.730 em total obediência ao disposto na Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. As informações dos pacientes foram mantidas em sigilo para preservação da integridade dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 01 e 02 mostram o grau de interferência do ácido ascórbico nos parâmetros bioquímicos de ureia e creatinina plasmática.

Tabela 01 - Ureia sérica (mg/dL ± desvio padrão) determinadas após 1 hora da adição da vitamina C nos *pools* de soro

	5 mg/dL	10 mg/dL	40 mg/dL
Controle	23,1±0,3 ^a	21,6±0,5 ^a	24,3±0,7 ^a
Ureia	24,3±2,2 ^a	33,6±2,3 ^b	65,5±1,9 ^c

Controle: Soro sem adição da vitamina C. Médias dos tratamentos (1 hora após a adição da vitamina C) seguidas de mesma letra, na linha e coluna, não diferem significativamente entre si ($n = 3$, $p < 0,05$ - Teste de Tukey). Médias dos tratamentos seguidas de letras diferentes, na linha e na coluna, diferem significativamente quando comparados entre si e seus respectivos controles ($n = 3$, $p < 0,05$ - Teste de Tukey). Os resultados são expressos como média da concentração do analito ± desvio padrão (mg/dL)

Tabela 02 - Creatinina sérica (mg/dL ± desvio padrão) determinadas após 1 hora da adição da vitamina C nos *pools* de soro

	5 mg/dL	10 mg/dL	40 mg/dL
Controle	0,45±0,02 ^a	0,39±0,02 ^a	0,49±0,02 ^a
Creatinina	0,51±0,03 ^a	1,17±0,03 ^b	6,4±0,16 ^c

Controle: Soro sem adição da vitamina C. Médias dos tratamentos (1 hora após a adição da vitamina C) seguidas de mesma letra, na linha e coluna, não diferem significativamente entre si ($n = 3$, $p < 0,05$ - Teste de Tukey). Médias dos tratamentos seguidas de letras diferentes, na linha e na coluna, diferem significativamente quando comparados entre si e seus respectivos controles ($n = 3$, $p < 0,05$ - Teste de Tukey). Os resultados são expressos como média da concentração do analito ± desvio padrão (mg/dL)

Na análise dos testes foi verificado que, ao se adicionar a vitamina C nos *pools* de soro nas três distintas concentrações, uma hora após a adição, na avaliação da ureia notou-se uma considerável alteração nas concentrações de 10 mg/dL, onde o controle apresentava um valor de 21,6 mg/dL, e após a adição da vitamina C passou para 33,6 mg/dL, expressando um aumento percentual de 55,5%, e, na concentração de 40 mg/dL, onde o controle apresen-

tava valor de 24,3 mg/dL, após a adição da vitamina C passou para 65,5 mg/dL, expressando um aumento percentual de 169,5%.

Na avaliação da creatinina plasmática também foram confirmadas alterações significativas nas concentrações de 10 mg/dL, onde o controle apresentava um valor de 0,39 mg/dL, e, após a adição do ácido ascórbico passou para 1,17 mg/dL, expressando um percentual de aumento de 200%; e, na concentração de 40 mg/dL, onde o controle apresentava valor de 0,49 mg/dL, após a adição da vitamina C passou para 6,4 mg/dL, expressando um percentual de aumento de 1.206%. Tanto nos parâmetros de ureia quanto nos de creatinina plasmática, nos testes realizados com a adição de 5 mg/dL de vitamina C não foram observadas alterações significativas.

A determinação da ureia em amostras biológicas de soro tem papel relevante na avaliação da função renal assim como a determinação de creatinina. A quantificação do metabólito pelo método da urease UV segue o seguinte princípio: a ureia é hidrolisada pela enzima urease onde são produzidos amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com 2 cetoglutarato e NADH numa reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase, ocorrendo oxidação de NADH a NAD. A conseguinte diminuição da absorvância é diretamente proporcional à concentração de ureia presente na amostra.⁽¹⁰⁾ Na determinação da creatinina, baseada na reação de Jaffé, segue-se o seguinte princípio: a creatinina participa de uma reação com o picrato alcalino, formando um complexo de coloração avermelhada que tem o grau de absorvância quantificado fotometricamente e é diretamente proporcional à quantidade de creatinina presente na amostra.⁽¹¹⁾

Existem diversas substâncias que provocam interferências tanto no parâmetro *in vivo* como *in vitro* e uma delas são os fármacos. Vale ressaltar que a vitamina C é considerada por muitos autores como um medicamento. Vários medicamentos podem promover alterações clínico-laboratoriais, como é o caso da anfotericina B, que é um fármaco utilizado no tratamento de pacientes com infecções fúngicas progressivas potencialmente graves. Esse medicamento é responsável por causar interferência *in vivo* nos parâmetros de creatinina plasmática e ureia, aumentando seus índices, sendo que o mecanismo de ação responsável pela alteração é a nefrotoxicidade.

Outro medicamento que causa uma tanto interferência analítica (*in vitro*) quanto interferência fisiológica (*in vivo*) de falso aumento dos índices da ureia e da creatinina plasmática é o aciclovir. Esse fármaco é utilizado no tratamento de infecções agudas causadas por vírus da família *herpesviridae*, sendo a insuficiência renal reversível pelo mecanismo de ação relacionado com a interferência *in vivo*, e na interferência *in vitro* o mecanismo de ação ainda não foi ainda esclarecido.⁽¹²⁾

O ácido ascórbico apresenta uma elevada atividade redutora e é provável que essa redução nos compostos orgânicos possa ser o esclarecimento para as devidas alterações observadas nos testes. Quando presente em amostras biológicas de soro, o ácido ascórbico é capaz de interagir com alguns elementos dos reagentes utilizados para a determinação dos parâmetros de ureia e creatinina plasmática, assim como em outros parâmetros bioquímicos, como: glicemia plasmática e ácido úrico. Portanto, essa interferência analítica pode promover uma liberação errônea de laudos laboratoriais pelos analistas clínicos responsáveis.⁽³⁾

De acordo com Martinello e Silva,⁽⁹⁾ em suas análises *in vitro*, o que ocorre é que a atividade redutora da vitamina C promove uma suposta interação com os elementos do teste, porém, não está bem esclarecido sobre qual enzima sofre a devida interação no momento exato das reações. É importante ressaltar que, no trabalho dos autores citados anteriormente, foi utilizada a vitamina C na forma de comprimidos efervescentes (nas análises *in vivo*) e em gotas (nas análises *in vitro*), e no presente estudo utilizou-se o ácido ascórbico devidamente purificado. Os autores Martinello e Silva⁽⁹⁾ não avaliaram os parâmetros de ureia e creatinina, e sim ácido úrico, bilirrubina, colesterol total, glicose e triglicerídeos. O que há de semelhante no trabalho dos autores anteriormente citados e o presente trabalho é que a atividade redutora do ácido ascórbico tenha sido o fator principal na interação com as enzimas dos testes, fazendo assim com que ocorra uma diminuição ou aumento nos parâmetros bioquímicos avaliados.

Segundo Antenor et al.,⁽¹³⁾ as interferências *in vitro* causadas pelo ácido ascórbico foram significativas quando foi utilizada a concentração de 10 mg/dL tanto na avaliação da ureia quanto na determinação da creatinina, porém os autores não avaliaram em concentrações superiores à de 10 mg/dL. No entanto, nesse estudo, as metodologias utilizadas para a determinação da ureia foram a quantificada por Berthelot e pela urease UV, e na determinação da creatinina plasmática foram o método cinético e creatinina enzimática. As metodologias utilizadas no presente trabalho para a determinação da ureia e creatinina foram respectivamente: Urease pelo método UV e Creatina enzimática baseada na reação de Jaffé.

Os resultados dos testes do presente estudo mostraram que, aumentando a concentração da vitamina C na amostra de soro, foi notável o aumento também da interferência *in vitro* tanto nos parâmetros de ureia quanto de creatinina plasmática. De acordo com o procedimento experimental utilizado no presente trabalho, a quantidade mínima de ácido ascórbico suficiente no soro capaz de causar de fato interferência *in vitro* significativa foi a concentração de 10 mg/dL.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos nesse estudo pode-se sugerir que a vitamina C, quando presente nas amostras biológicas de soro nas concentrações citadas anteriormente (mínima de 10 mg/dL), é responsável por promover interações com os constituintes dos testes nos parâmetros de ureia e creatinina plasmática, porém os mecanismos responsáveis pela devida alteração não foram ainda esclarecidos.

O uso indiscriminado do ácido ascórbico pela população, induzida pelo fato de não ser considerado um medicamento e também levando-se em conta que, para os leigos, o uso abusivo da substância não acarreta efeitos colaterais, está fazendo com que os profissionais responsáveis pela área fiquem atentos principalmente na fase pré-analítica. No presente trabalho, o tema abordado traz de fato uma relevante posição em nível de informação para os analistas clínicos prepararem seus pacientes direto ou indiretamente para coleta nas devidas condições a fim da emissão de laudos laboratoriais fidedignos.

Abstract

Objective: *In line with this, the present work aimed to analyze the possible in vitro modifications of serum urea and creatinine biochemical parameters in blood serum samples from healthy volunteers after the presence of high L-ascorbic acid concentrations (5, 10 or 40 mg/dL).* **Methods:** *Ascorbic acid was added in vitro to the human serum and the biochemical analytes were assayed up to 1 hour after addition. Serum urea levels were determined by urease activity (UV and colorimetric assay) and serum creatinine levels were analyzed by enzymatic creatinine concentration using colorimetric assay and endpoint reaction.* **Results:** *Pool serum with vitamin C at 10 and 40 mg/dL significantly increase the values of determination of urea and creatinine when compared to pool serum control. Together, it is possible to affirm that vitamin C at concentrations equal or up to 10 mg/dL could promote chemical interactions with components from urea or creatinine detection colorimetric assays, leading to false-positive results.* **Conclusion:** *In addition, this study provides important information for clinical analysts to be more careful when performing exam procedures and in releasing reports from patients who have ingested high concentrations of vitamin C.*

Keywords

Ascorbic acid; Urea; Creatinine

5. Badrick T, Campbell B. Effects of intravenous infusion of ascorbate on clinical chemistry tests. *Clin Chem.* 1992;38(10):2160.
6. Jaffe MZ. Methods determining creatinine. *Physiol Chem.* 1886;10:39-40.
7. Levey AS, Stevens LA, Hostetter T. Automatic reporting of estimated glomerular filtration rate: just Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43(5):329-37.
8. Vasiliades J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex. *Clin Chem.* 1976;22:1664-71.
9. Martinello F, Silva EL. Interferência do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos: estudos in vivo e in vitro. *J Bras Patol Med Lab.* 2003;39(4):323-34.
10. Labtest. Procedimento operacional padrão para a determinação da ureia em amostras de sangue e urina útil na avaliação da função renal. Minas Gerais; 2012.
11. Labtest. Procedimento operacional padrão para a determinação da creatinina em soro, plasma e urina por reação de ponto final. Minas Gerais; 2013.
12. Moura JAP. Interferência de medicamentos em exames laboratoriais. João Pessoa. Monografia [Graduação em Farmácia] - Universidade Federal da Paraíba; 2014.
13. Antenor HP, Pedrazzi AHP, Rodrigues ER, Filho AZ. Ação Redutora da Vitamina C em Bioquímica Clínica. *RBAC.* 1998;30(1):5-6.

Correspondência

Helenicy Nogueira Holanda Veras
Avenida Leão Sampaio km 3 – Bairro Lagoa Seca
63040-005 – Juazeiro do Norte - CE, Brasil

REFERÊNCIAS

1. Guillard JC, Lequeu B. As vitaminas do nutriente ao medicamento. São Paulo: Santos; 1995. p. 375.
2. Dhariwal RK, Hartzell WO, Levine M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *Am J Clin Nutr.* Bethesda. 1991;54(4):712-6.
3. Menne IV, Grey PC, Kotze JP, Sommers DK, Brown JMM, Spies JH. Ascorbic acid and blood lipid and uric acid levels of students. *S Afr Med J.* 1975;49(54):2225-8.
4. Miller SM. Vitamins. In: Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP. *Clinical chemistry: principles, procedures, correlations.* 3rd. ed. Filadelfia: Lippincott; 1996. p. 603-7.

Avaliação epidemiológica, hematológica e imunofenotípica de pacientes adultos portadores de leucemia aguda diagnosticados no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, Brasil

Epidemiological, hematological and immunophenotypic evaluation of adult patients with acute leukemia diagnosed at the Regional Hospital of Mato Grosso do Sul, Brazil

Cristina da Silva Righes¹

Dayane Vanessa Oliveira Garcia²

Paula Cristina Silva³

Eliane Borges de Almeida⁴

Jessica Carina de Pellegrin⁵

Resumo

Objetivo: Determinar o perfil dos pacientes portadores de leucemia aguda diagnosticados no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul. **Métodos:** Estudo descritivo e retrospectivo baseado nos dados obtidos nos prontuários de 2011 a 2015 de pacientes adultos com diagnóstico de leucemia aguda. **Resultados:** Dos 68 pacientes diagnosticados com LA, 19,1% eram Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e 80,9% Leucemia Mieloide Aguda (LMA), sendo 58,8% do sexo masculino e 41,2% do feminino. A faixa etária mais prevalente foi entre 40 a 59 anos e foram a óbito 64,7%. A mediana de leucócitos foi 31.845/mm³, hemoglobina 8,38 g/dL, plaquetas 29.500/μL e 60,3% apresentaram mais de 70% de blastos no sangue periférico. A frequência de fenótipo aberrante (FA) foi de 20,6% e, em pacientes com LMA, a presença do FA interferiu na sobrevida. **Conclusão:** A maioria dos dados obtidos corrobora com a literatura e contribui no aprimoramento dos métodos diagnósticos utilizados no HRMS, nas orientações quanto ao manejo dos pacientes e no seguimento terapêutico, melhorando a promoção do atendimento e, conseqüentemente, o aumento da sobrevida desses pacientes.

Palavras-chave

Leucemia; Diagnóstico; Epidemiologia

INTRODUÇÃO

Na atualidade, as neoplasias são uma das principais causas de morte, segundo a Organização Mundial da Saúde.^(1,2) A estimativa mundial, em 2012, foi de 14 milhões de novos casos; já no Brasil, as estimativas para o ano 2016/2017 são de aproximadamente 596 mil novos casos de câncer.⁽³⁾

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2012 foram estimados 352 mil novos casos de leucemia no mundo, correspondendo a 2,5% de todos os tipos de câncer. Em 2016, no Brasil, a estimativa era de 10.070 casos da doença, sendo 5.540 em homens e 4.530 em mulheres. Em Mato Grosso do Sul, a previsão do órgão é de 110 casos/100 mil habitantes, e, destes, 60 casos/

100 mil habitantes estão localizados em Campo Grande, capital do estado.⁽³⁾

As leucemias correspondem a proliferações neoplásicas de células hematopoiéticas que levam à formação de células anormais, as quais não exercem suas funções corretamente.⁽⁴⁾ Essa proliferação pode se concentrar na medula óssea ou extravasar para o sangue periférico.⁽⁵⁾

Até a década de 1970, a classificação das leucemias se baseava em linfóides, não linfóides e monocíticas. Seis anos mais tarde foi lançada a classificação FAB (French-American-British) baseada na morfologia dos blastos e nas reações enzimático-citoquímicas. Por volta dos anos 90 apareceu a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualizada em 2008, que segmentou as doenças em categorias e as definiu de acordo com a

¹Mestra. Farmacêutica Bioquímica no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul – Campo Grande - MS, Brasil.

²Especialista. Farmacêutica Bioquímica no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul – Campo Grande - MS, Brasil.

³Especialista. Farmacêutica Bioquímica na empresa M.S. Diagnóstica

⁴Doutora. Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul – Campo Grande - MS, Brasil.

⁵Especialista. Residente do Programa de Residência Multiprofissional Integrada em Saúde Hospitalar – Área de Análises Clínicas.

Instituição: Universidade Anhanguera – Uniderp – Campo Grande - MS, Brasil.

Artigo recebido em 28/02/2017

Artigo aprovado em 20/07/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700569

morfologia, imunofenótipo, aspectos genéticos-moleculares e síndromes clínicas.⁽⁶⁾

As leucemias agudas (LA), mieloide ou linfoide, caracterizam-se pela presença de células primitivas, denominadas blastos, e pela rápida proliferação celular, que, dentro de poucos meses, pode ser fatal se não tratada com agilidade.⁽⁵⁾

A suspeita da doença inicia-se pelos sinais clínicos e posteriormente pelos exames laboratoriais, em especial o hemograma e o mielograma.⁽⁷⁾ No geral, as principais alterações hematológicas são anemia, trombocitopenia e os valores de leucócitos, que podem estar baixos, normais ou muito elevados.⁽⁸⁾ Técnicas mais específicas, principalmente a imunofenotipagem e citogenética, confirmam o diagnóstico de acordo com a linhagem celular e estágio de maturação e, por fim, definem o melhor tratamento a seguir.⁽⁹⁾

O presente estudo teve como objetivo analisar os aspectos epidemiológicos, hematológicos e imunofenotípicos de pacientes adultos portadores de leucemia aguda diagnosticados no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS) no período de 2011 a 2015 e, assim, correlacionar com a evolução dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo e transversal com base em dados secundários coletados de prontuários físicos e eletrônicos, no período de 2011 a 2015, dos pacientes atendidos e diagnosticados com leucemia aguda no setor de onco-hematologia adulto do HRMS.

Como critério de exclusão não foram considerados os pacientes diagnosticados com tumores sólidos ou outro tipo de doença onco-hematológica, como os linfomas, pacientes menores de 18 anos e prontuários com os dados incompletos.

As variáveis epidemiológicas analisadas foram: sexo, idade, procedência, região e *status* vital. Os parâmetros laboratoriais analisados na admissão foram: concentração de hemoglobina, contagem global de leucócitos, contagem de plaquetas, porcentagem (%) de blastos no sangue periférico, linhagem das células leucêmicas e presença de fenótipo aberrante.

As amostras foram obtidas através da coleta por punção venosa em torno de 2 mL a 4 mL de sangue total em tubos com EDTA. Os parâmetros do hemograma (concentração de hemoglobina, contagem global de leucócitos e contagem de plaquetas) foram obtidos pelos analisadores hematológicos automatizados Cell Dyn Ruby, ABX Pentra XL 80 e Sysmex XN-3000TM; já a porcentagem de blastos foi definida através da leitura dos esfregaços sanguíneos, por microscopia eletrônica, pelos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas do HRMS. A imunofenotipagem

foi realizada por citometria de fluxo em amostras de medula óssea ou sangue periférico, utilizando painéis de três cores (FITC, PE e PerCP), compostos pelos seguintes anticorpos monoclonais: CD45, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD64, CD11b, CD117, CD41a, CD42b, CD61, CD14, CD15, CD56, Glicoforina A, MPO (mieloperoxidase), CD7, CD1a, CD3, CD4, CD8, CD10, CD19, CD79a, IgM, IgG e TdT. Para aquisição e análise das células marcadas utilizou-se o programa CellQuestPro no citômetro de fluxo BD FACScaliburTM.

Os dados coletados foram compilados em planilha eletrônica Microsoft Excel® 2010 e apresentados de forma descritiva, em média \pm erro padrão da média, variação e mediana, frequência absoluta (n) e relativa (%), representados em gráficos e tabelas. A análise de sobrevivência dos pacientes portadores de LMA em relação ao fenótipo aberrante (FA) foi representada pela Curva de Kaplan-Meier, no modelo de análise de sobrevivência. A associação entre as variáveis foi calculada pelo teste Qui-quadrado, com nível de significância de 5%, por meio do *software* estatístico SigmaStat for Windows versão 3.5.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhanguera - Uniderp, sob o parecer nº 1.832.015, de acordo com as resoluções e normativas do Ministério da Saúde.⁽¹⁰⁾

RESULTADOS

Foram coletados 79 prontuários, sendo 11 destes excluídos por não se enquadrarem na pesquisa. Portanto, 68 indivíduos diagnosticados com LA fizeram parte do estudo, com 19,1% (13) de Leucemia Linfoide Aguda (LLA) e 80,9% (55) de Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Em relação ao sexo, 58,8% (40) são masculinos e 41,2% (28) femininos. A idade dos pacientes variou de 19 a 88 anos, com idade média de $47,8 \pm 20,12$ anos (média \pm erro padrão), 35,3% (24) com idade de 19-39, 39,7% (27) de 40-59 anos e 25% (17) com idade superior a 60 anos. Quanto à procedência 52,9% (36) eram da capital e 47,1% (32) oriundos de cidades interioranas. Conforme relatado pelos pacientes, 80,9% (55) residiam em área urbana e apenas 19,1% (13) habitavam na área rural.

Em relação ao desfecho clínico, 64,7% (44) evoluíram para o óbito e 35,3% (24) dos pacientes mantiveram-se em tratamento. Não houve associação entre o desfecho clínico e as variáveis demográficas analisadas nestes prontuários ($p > 0,05$). Os valores referentes a estes dados estão detalhados na Tabela 1.

Quanto às características hematológicas, ao diagnóstico, houve variação no número de leucócitos de 670 a $354.400/\text{mm}^3$, com mediana de $31.845/\text{mm}^3$; em 30,9% (21) dos indivíduos prevaleceram valores entre 20.000 e $50.000/\text{mm}^3$. Os valores de hemoglobina variaram de $2,8$ a

15,8 g/dL, com mediana de 8,38 g/dL, apresentando maior prevalência entre 6,1 a 10 g/dL em 61,8% (42) dos casos. A porcentagem de blastos no sangue periférico estava acima de 70% em 60,3% (41) pacientes e as plaquetas variaram de 1.000 a 189.000/ μ L com mediana de 29.500/ μ L, sendo valores menores ou iguais a 20.000/ μ L mais prevalentes (36,8%). As frequências dessas variáveis estão detalhadas na Tabela 2.

Foi identificada uma associação significativa ($p=0,0002$) entre os valores de leucócitos e o desfecho

clínico dos pacientes. Sendo que no grupo $>50.000/\text{mm}^3$ e $\leq 100.000/\text{mm}^3$ e no grupo $> 100.000/\text{mm}^3$ obteve-se relação significativa ($p<0,05$) com o fato dos pacientes evoluírem para o óbito e valores de leucócitos $\leq 5.000/\text{mm}^3$ de se manterem em tratamento ($p< 0,05$) (Tabela 2).

Observando a Tabela 2, verifica-se que não houve associação entre o desfecho de óbito ou manutenção de tratamento e os valores de hemoglobina ($p=0,71$), blastos ($p=0,29$) e plaquetas ($p=0,89$).

Tabela 1 - Caracterização demográfica de 68 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda entre 2011 e 2015 no HRMS. Campo Grande, 2016

Variável	Frequência						Valor de P
	Total		Óbitos (n=44)		Tratamento (n=24)		
	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	
Sexo							
Masculino	58,8	40	63,6	28	50	12	0,40
Feminino	41,2	28	34,6	16	50	12	
Faixa etária							
19 a 39 anos	35,3	24	29,5	13	45,8	11	0,17
40 a 59 anos	39,7	27	38,7	17	41,7	10	
≥ 60 anos	25,0	17	31,8	14	12,5	03	
Origem							
Capital	52,9	36	52,3	23	54,2	13	0,88
Interior do estado	47,1	32	47,7	21	45,8	11	
Região							
Urbana	80,9	55	84,1	37	75	18	0,55
Rural	19,1	13	15,9	07	25	06	

Dados expressos em números absolutos e porcentagem (%).
Valor $p>0,05$ determinado pelo teste do Qui-Quadrado

Tabela 2 - Descrição das análises laboratoriais de sangue periférico e suas relações quanto ao desfecho clínico registrados em prontuários de 68 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda, entre 2011 e 2015, no HRMS. Campo Grande, 2016

Variável	Frequência		Óbitos		Tratamento		Valor de P
	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	
Leucócitos/mm^3							
≤ 5.000	23,5	16	11,4	05	45,8	11	0,0002
> 5.000 e ≤ 10.000	5,9	04	0,0	00	16,7	04	
> 10.000 e ≤ 20.000	5,9	04	4,5	02	8,3	02	
> 20.000 e ≤ 50.000	30,9	21	36,4	16	20,8	05	
>50.000 e ≤ 100.000	16,2	11	22,7	10	4,2	01	
> 100.000	17,6	12	25	11	4,2	01	
Hemoglobina (g/dL)							
$\leq 6,0$	14,7	10	15,9	07	12,5	03	0,17
6,1 a 10,0	61,8	42	63,6	28	58,3	14	
$> 10,0$	23,5	16	20,5	09	19,2	07	
Blastos (%)							
< 30	16,2	11	11,4	05	25,0	06	0,29
$\geq 30 \leq 70$	23,5	16	22,7	10	25,0	06	
> 70	60,3	41	65,9	29	50,0	12	
Plaquetas/μL							
≤ 20.000	36,8	25	36,4	16	37,5	09	0,89
> 20.000 e ≤ 50.000	32,3	22	29,5	13	37,5	09	
> 50.000 e ≤ 100.000	25,0	17	27,3	12	20,8	05	
>100.000 e ≥ 150.000	4,4	03	4,5	02	4,2	01	
> 150.000	1,5	01	2,5	01	0,0	00	

Dados expressos em números absolutos e porcentagem (%).
Valor $p>0,05$ determinado pelo teste do Qui-Quadrado

Foram identificados fenótipos aberrantes em 20,6% dos casos (14); dentre estes, as expressões imunofenóticas encontradas nos pacientes com LLA foram CD13 (14,3%) e CD 13+33 (50%), e os antígenos CD7 (28,6%) e CD7+19 (7,1%) nos casos de LMA. A presença de fenótipos aberrantes não apresentou relação significativa com o desfecho clínico dos indivíduos ($p=0,13$) (Figura 1).

Porém, ao se analisar o grupo LMA com FA, a sobrevida global dos portadores desta condição foi significativamente reduzida ($p=0,01$) em comparação aos não portadores (Gráfico 2). No grupo LLA, esta relação pode ser observada devido aos poucos casos detectados. Foi utilizada para essa análise a Curva de Kaplan-Meier, no modelo de análise de sobrevivência.

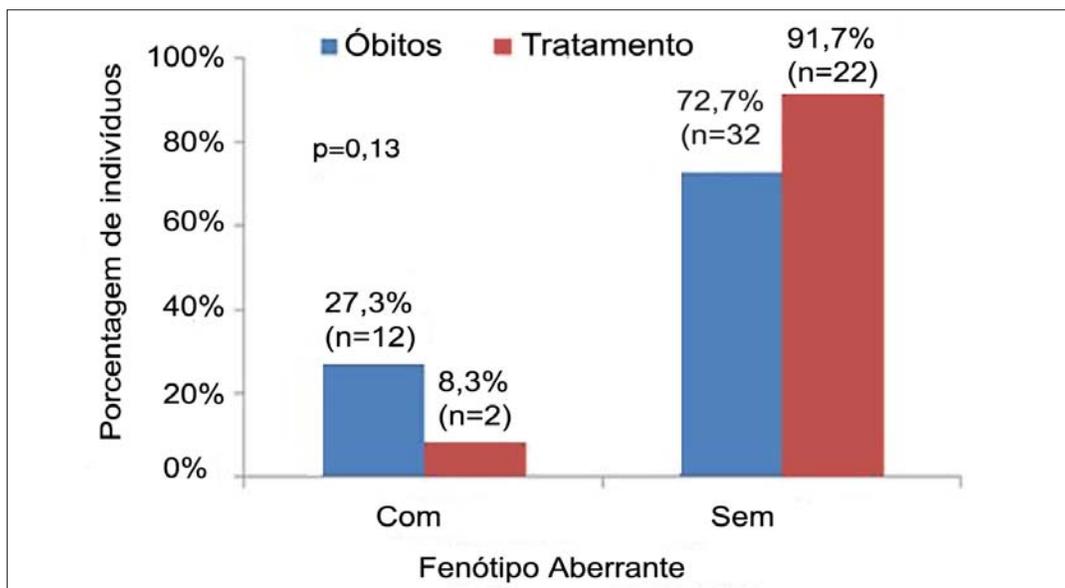


Figura 1. Gráfico representando o número percentual de indivíduos com ou sem presença de fenótipo aberrante de acordo com o desfecho clínico de manutenção do tratamento ou óbito. $p=0,13$; Teste Qui-quadrado.

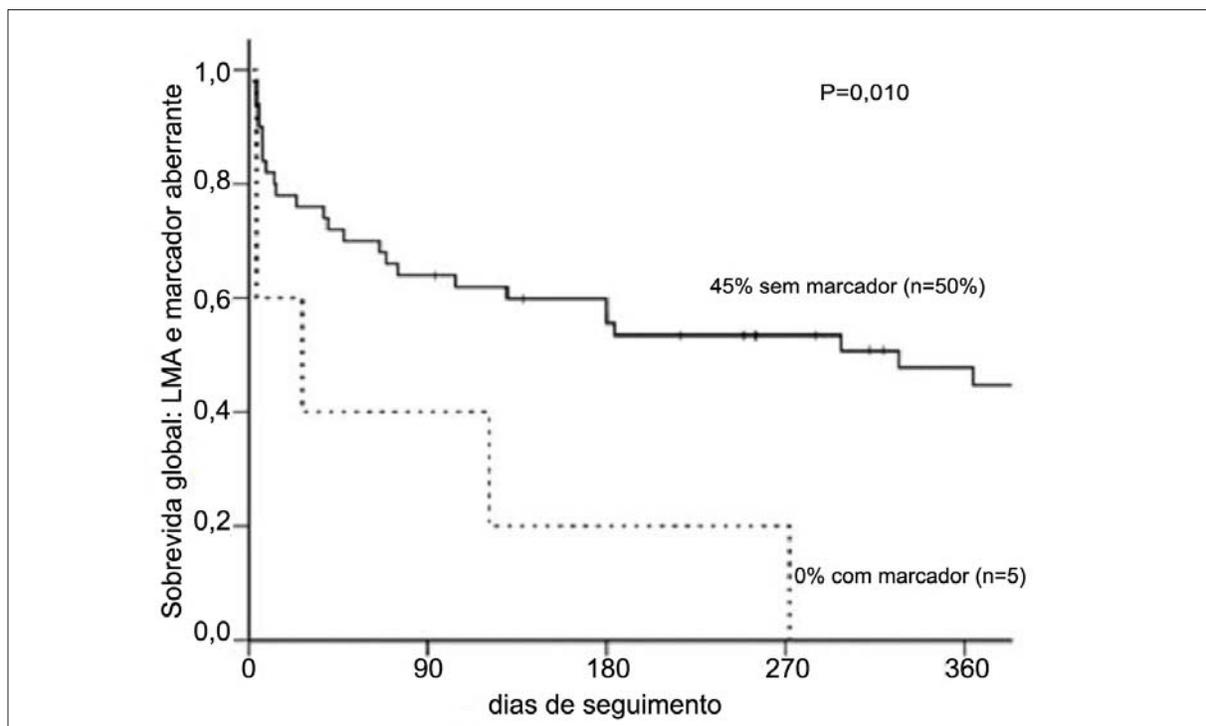


Figura 2. Gráfico representando a sobrevida do grupo LMA em relação ao fenótipo aberrante. $P=0,010$; Curva de Kaplan-Meier.

DISCUSSÃO

A linhagem leucêmica prevalente nesse estudo foi a LMA, fato já esperado, uma vez que o mesmo foi realizado em uma população adulta, corroborando com a literatura.^(11,12) Assim como em outros estudos,^(13,14) o predomínio foi do sexo masculino, tanto na LMA quanto na LLA.

Alguns autores afirmam que a LMA ocorre com maior frequência entre indivíduos com idade superior a 60 anos;^(15,16) sendo assim, os idosos possuem um prognóstico desfavorável que, associado às comorbidades, não responde positivamente ao tratamento.⁽¹⁷⁾ Ao contrário dos achados descritos, nesse estudo, assim como no estudo de Rodrigues,⁽¹²⁾ houve maior número de casos de LMA entre os indivíduos com idade inferior a 60 anos. Tal perfil chama a atenção, uma vez que acomete indivíduos em uma fase economicamente ativa, com menos de 60 anos.

O Mato Grosso do Sul tem como base econômica a atividade agropecuária, sendo um dos maiores produtores agrícolas do país e apresenta um consumo de agrotóxicos significativo.^(18,19) Logo, deve-se levar em conta a exposição e a contaminação causadas pelos agrotóxicos tanto dos indivíduos que residem na zona rural quanto dos que vivem em áreas próximas. Moradores das áreas urbanas podem se expor ao risco de forma indireta, por exemplo, no consumo de alimentos contaminados por esses agrotóxicos.⁽²⁰⁾

Fortes evidências apontam que os agrotóxicos contêm substâncias potencialmente carcinogênicas, aumentando os riscos de desenvolverem neoplasias como Linfoma Não Hodgkin citado por Costa et al.^(21, 22) Essa relação se torna relevante ao nosso estudo devido à elevada exposição da população estudada, apesar de a minoria dos pacientes com LA residir em zona rural (19,1%).

Cumprir destacar que os casos de LMA encontrados nesse estudo foram semelhantes aos descritos por Rodrigues et al.⁽¹²⁾

Não houve diferença significativa entre moradores do interior do estado e os residentes em Campo Grande. É importante atentar-se para o fato de que parte dos pacientes do interior, ao se cadastrarem para atendimento no HRMS, informam endereços de hospedagem na capital ao invés da residência de origem. Logo, acredita-se que os dados estejam subestimados.

No presente estudo houve uma relação significativa ($p < 0,05$) entre os pacientes que apresentaram leucopenia ao diagnóstico (leucócitos $\leq 5.000/\text{mm}^3$) e permanecem em tratamento no HRMS. O estudo de Arellano et al.⁽²³⁾ encontrou uma relação entre leucopenia e sobrevida na LMA promielocítica e na LLA, porém, a justificativa para essa relação ainda não é esclarecida. Uma hipótese seria que a boa resposta dos pacientes leucopênicos ao

tratamento pode estar relacionada à expressão diminuída de moléculas de adesão, receptores de quimiocina na superfície das células blásticas e a baixa produção de proteínas envolvidas na proliferação e diferenciação celular (FLT3).⁽²³⁾

Em contrapartida, pacientes com valores de leucócitos entre $50.000/\text{mm}^3$ e $100.000/\text{mm}^3$ e $> 100.000/\text{mm}^3$ apresentaram relação significativa ($p < 0,05$) com óbito. O valor de leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$, que estava presente em 17,6% neste estudo, é um fator desfavorável ao prognóstico e tem relação com menores taxas de remissão completa e menor sobrevida, tanto na LLA, quanto na LMA.^(23,24) Esta relação entre o valor de leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$ e sobrevida também foi encontrada em crianças, segundo descrito por Viana et al.,⁽²⁵⁾ que relataram sobrevida de 48% em pacientes com menos de 100.000 leucócitos/ mm^3 ($p = 0,0001$) e de 23% em pacientes com leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$. Essa elevada quantidade de células está relacionada também a complicações pulmonares e do sistema nervoso central.⁽²⁶⁾

As dosagens de hemoglobina, apesar de não apresentarem relação significativa com o desfecho clínico, demonstraram valores próximos aos obtidos em outros estudos,^(15,27) como Cui et al.,⁽¹⁵⁾ que obteve uma mediana de hemoglobina de 8,9 g/dL. A trombocitopenia (≤ 20.000) esteve presente, com maior frequência, nos pacientes estudados neste artigo, mas, apesar de sua capacidade de causar hemorragias e, conseqüentemente, elevar a mortalidade,⁽²⁸⁾ essa variável não obteve relação com o óbito. Os estudos de Alves⁽²⁷⁾ e de Vasconcelos⁽²⁹⁾ demonstraram frequências inferiores de pacientes com trombocitopenia quando comparado ao encontrado nesse estudo.

A expressão de fenótipos aberrantes nesta análise foi inferior ao reportado por Momani et al.,⁽³⁰⁾ que obtiveram 26% de casos com a presença desse fenótipo. Os marcadores antigênicos mais frequentes também foram relatados por Momani et al.,⁽³⁰⁾ que encontraram maior expressão de CD7 em LMA (43%), o que corrobora com este estudo, e 47% de CD13 nos casos de LLA.

A literatura mostra uma variedade de padrões fenotípicos aberrantes em LA, que incluem a expressão de antígenos de linhagem diferente, ausência ou expressão aumentada de um antígeno, coexpressão de antígenos presentes em diferentes estágios da maturação e a presença de fenótipos nunca descritos em medula óssea.⁽³¹⁾

Atualmente, a identificação de fenótipos aberrantes em LA é de grande valor para a detecção de Doença Residual Mínima (DRM) e monitorização do paciente durante tratamento.^(31,32) Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado que alguns imunofenótipos aberrantes poderiam estar associados a alterações moleculares específicas e ao prognóstico.^(30,33)

Não foi objetivo inicial desse estudo avaliar a remissão dos pacientes, mas, relacionando com o desfecho clínico, essa variável não apresentou valores significativos. No entanto, os pacientes portadores de LMA com presença de FA acabaram morrendo mais precocemente, consequentemente, tendo uma menor sobrevida. Isso corrobora com o estudo, que relata a presença de FA como um indicador de mau prognóstico na LMA.⁽³³⁾

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, tanto epidemiológicos quanto laboratoriais, forneceram conhecimentos iniciais a respeito do perfil dos pacientes que buscam atendimento no serviço de hematologia do HRMS. Esses dados podem contribuir no aprimoramento dos métodos diagnósticos utilizados no HRMS, nas orientações quanto ao manejo dos pacientes e no seguimento terapêutico, melhorando a promoção do atendimento e, consequentemente, o aumento da sobrevida desses pacientes.

Abstract

Objective: To determine the profile of patients with acute leukemia diagnosed at the Hospital Regional de Mato Grosso do Sul. **Methods:** Descriptive and retrospective study based on data obtained from medical records from 2011 to 2015 adult patients diagnosed with acute leukemia. **Results:** Of the 68 patients diagnosed with LA, 19.1% were acute lymphocytic leukemia (ALL) and 80.9% of acute myeloid leukemia (AML), being 58.8% of male and 41.2% female. The age group most prevalent was between 40 to 59 years and died 64.7%. The median of leukocytes was 31,845/mm³, the hemoglobin level was 8.38 g/dL, the platelets 29,500/ μ L and 60.3% had more than 70% of blasts in the peripheral blood. The frequency of aberrant phenotype (AP) was 20.6%, and in patients with AML, the presence of AP interfered in survival. **Conclusion:** The majority of data obtained corroborates with the literature and contributes to the improvement of the diagnostic methods used in HRMS, guidelines on patient management and therapeutic follow-up, improving the promotion of care and, consequently, increasing the survival of these patients.

Keywords

Leukemia; Diagnosis; Epidemiology

REFERÊNCIAS

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011;61(2):69-90.
- Barbosa SFDC, Costa CAD, Ferreira LDSC, Almeida DDS, Azevedo TCDB, Lemos JARD, Sousa MSD. Aspectos epidemiológicos dos casos de leucemia e linfomas em jovens e adultos atendidos em hospital de referência para câncer em Belém, Estado do Pará, Amazônia, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde.* 2015;6(3):43-50.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015.
- Cipolat S, Pereira BB, Ferreira FV. Fisioterapia em pacientes com leucemia: revisão sistemática. *Rev. Bras. Cancerol.* 2011;2(57): 229-36.
- Silva GC, Pilger DA, Castro SM, Wagner SC. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *J Bras Patol MedLab.* 2006;42(2):77-84.
- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de hematologia. In: Chauffaille MLLF, Yamamoto M. A classificação das leucemias agudas: citologia, citotóxica e imunofenotipagem. São Paulo: Atheneu; 2013. p. 433-45.
- Pezzini TJ, Castro FS. Alterações hematológicas na leucemia linfóide aguda (LLA). *Estudos.* 2014;41(4):767-7.
- Dantas GKS, Silva LTA, Passos XS, Carneiro CC. Diagnóstico diferencial da leucemia linfóide aguda em pacientes infanto-juvenis. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde.* 2015;13(2):3-18.
- Rodrigues R, Lopata V, Wiedmer G, Kaviski R. Leucemia mieloide aguda: características laboratoriais. *Visão Acadêmica.* 2015;16(2):70-83.
- Ministério da Saúde (Brasil). Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, que trata de pesquisas e testes em seres humanos. *Diário Oficial da União* 13 jun 2013; seção 1.
- Fuentes M, Rojas P, Ernst D, Ocqueteau M, Bertin P, Sarmiento M, Ramírez P. Results of acute myeloid leukemia treatment. Analysis of 63 patients between 2010-2014. *Rev Med Chil.* 2015;143(10):1269-76. [Article in Spanish].
- Rodrigues SS. Análise retrospectiva das características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de leucemias agudas tratados no serviço de hematologia do hospital universitário da universidade federal de Santa Catarina entre 2006 e 2010. Florianópolis. Monografia [Especialista em Residência Integrada Multiprofissional em Saúde na Área de Atenção em Alta Complexidade em Saúde, Farmácia - Análises Clínicas] - Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.
- Carvalho QGS, Pedrosa WA, Sebastião QP. Leucemia mieloide aguda versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no Hospital de Hematologia de Recife. *Rev Esc Enferm USP.* 2011;45(6):1446-51.
- Andrade, KNS. Expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 na avaliação prognóstica de pacientes com leucemia linfóide aguda no estado do Maranhão. Maranhão. Dissertação [Mestrado em Saúde Materno-Infantil] - Universidade Federal do Maranhão; 2012.
- Cui W, Zhang D, Cunningham MT, Tilzer L. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: Changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(6):636-49.
- Yébenes-Ramírez M, Serrano J, Martínez-Losada C, Sánchez-García J. Clinical and biological prognostic factors in relapsed acute myeloid leukemia patients. *Med Clin (Barc).* 2016;147(5):185-91. [Article in Spanish].
- Ganzel C, Rowe JM. Prognostic factors in adult acute leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011;25(6):1163-87.
- Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Econômico (SEMADE). Diagnóstico Socioeconômico de Mato Grosso do Sul - 2015. [acesso em 30 jun 2017]. Disponível em: http://www.semade.ms.gov.br/wp-content/uploads/sites/20/2015/03/Diagnostico_Socioeconomico_de_MS_20151.pdf.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.
- Silva THC, Neto JDCG. O "Direito" dos Agrotóxicos e a Soberania Alimentar: Entre Saúde, Economia e Escolhas Políticas. *Prim@Facie.* 2017;16(31):01-31.
- Costa VIDB, Mello MSDC, Friedrich K. Exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos e o linfoma não Hodgkin. *Saúde em Debate.* 2017;41(112):49-62.

22. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos. Ministério da Saúde; 2015. [acesso em 30 jun 2017]. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf.
23. Arellano M, Mizrachi L, Pan L, Tighiouart M, Souza L, Guo X, Z, et al. Prognostic significance of leucopenia at the time of diagnosis in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(5):427-32.
24. Porcu P, Cripe LD, Ng EW, Bhatia S, Danielson CM, Orazi A, et al. Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leuk Lymphoma*. 2000;39:1-18.
25. Viana MB, Cunha KC, Ramos G, Murao M. Leucemia mieloide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. *J Pediatr*. 2003;79(6):489-96.
26. Carneiro FM, Silva LCP, Cruz RA. Manifestações gerais das leucemias agudas na infância. Aspectos básicos para o conhecimento do cirurgião-dentista. *Arq Bras Odont*. 2007;3(2):129-45.
27. Alves GVA. Caracterização hematológica e imunofenotípica em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. Natal. Tese [Doutorado em Biotecnologia da Saúde] - Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2012.
28. Arbuthnot C, Wilde JT. Haemostatic problems in acute promyelocytic leukaemia. *Blood Rev*. 2006;20(6):289-97.
29. Vasconcelos RC. Avaliação dos marcadores celulares por citometria de fluxo nos portadores de leucemia mieloide aguda atendidos no Hemocentro do Rio Grande do Norte- HEMONORTE. Natal. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] - Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2010.
30. Momani A, Abbasi N, Alsokhni H, Habahbeh L. Aberrant Antigen Expression in Patients with Acute Leukemias; Experience of King Hussein Medical Center in Jordan. *JRMS*. 2016;23(2):59-67.
31. Novoa V, Núñez NA, Carballo OG, Lessa CF. Imunofenotipos aberrantes en leucemias agudas en una población hospitalaria de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*. 2013;73(1):9-16.
32. Emerenciano M, Bossa Y, Zanrosso CW, Alencar DM, Campos MM, Dobbin J, Oliveira MSP. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. *Rev Bras Cancerologia*. 2004; 50(3):183-9.
33. Jahedi M, Shamsasenjan K, Sanaat Z, Aliparasti M, Almasi S, Mohamadian M, et al. Aberrant phenotype in Iranian patients with acute myeloid leukemia. *Adv Pharm Bull*. 2014;4(1):43-7.

Correspondência

Jessica Carina de Pellegrin
Universidade Anhanguera – Uniderp
Rua Ceará, 333 – Bairro Miguel Couto
79003-010 – Campo Grande - MS, Brasil

Análise da proteinúria após exercício físico intenso

Analysis of proteinuria after intense physical exercise

Olimpio Pereira de Melo Neto¹

Amaylton Salles de Carvalho²

Letícia de Souza Nicolau³

Anastácia Cecília Costa³

Gleicy Pereira da Silva Dias³

Resumo

Objetivo: O exercício físico intenso e prolongado referente a uma atividade física não planejada ou mal estruturada pode originar complicações e comprometer os seus benefícios. Nesta perspectiva, foi analisada a proteinúria e creatinúria em praticantes de treinamento de força após a prática de exercício físico de baixa e alta intensidade. **Métodos:** O presente trabalho trata de um estudo descritivo de campo, de corte transversal e caráter experimental, e para isso foi analisada a proteinúria e a creatinúria em amostras de urina coletadas antes e após a realização de exercício físico de baixa e alta intensidade. Os exercícios de intensidades distintas foram realizados em dias diferentes com intervalo de 72 horas no mínimo. **Resultados:** Foi encontrado aumento significativo da proteinúria após o exercício físico de baixa e de alta intensidade, tendo maior perda de proteínas após o exercício físico de alta intensidade. A creatinúria também apresentou aumento após o exercício físico. **Conclusão:** A realização de exercício físico intenso promoveu o aumento da proteinúria e creatinúria em praticantes de treinamento de força. A proteinúria foi maior quanto mais intenso foram os exercícios físicos. Considerando as limitações da pesquisa, devido ao pequeno número de voluntários, mais estudos com indivíduos praticantes de treinamento de força são necessários para consolidar os achados referentes ao exercício físico e alterações urinárias nesta modalidade.

Palavras-chave

Proteinúria; Educação física e treinamento; Creatinina

INTRODUÇÃO

Exercício físico é considerado toda e qualquer atividade corporal planejada, estruturada e repetitiva que influencia no condicionamento físico.⁽¹⁾ O exercício físico requer uma adaptação metabólica, que depende do tipo da intensidade e também da duração,⁽²⁾ e após sua realização alguns órgãos como os rins, coração e o baço podem sofrer alterações.⁽³⁾

Após o exercício físico intenso, as alterações renais mais frequentemente encontradas na amostra de urina são os glóbulos vermelhos isomórficos, os cilindros e a proteinúria.⁽²⁾

A excreção urinária de proteínas em indivíduos saudáveis vai variar com a intensidade, duração e com o tipo de exercício.⁽⁴⁾ Durante o exercício físico pode ocorrer uma proteinúria funcional decorrente de alterações nas pressões hidrostáticas no glomérulo, que promovem um acréscimo na força de filtração, ocasionando um aumento na permeabi-

lidade da membrana glomerular, deixando passar para o filtrado uma variável quantidade de proteínas séricas.⁽⁵⁾ Outras causas da elevação de proteínas na urina são: lesão, luxação ou ruptura muscular ocorrida durante a prática esportiva, já que, no local da lesão, podem ser liberadas proteínas constituintes do tecido local lesado.⁽⁶⁾

Diante deste contexto, mostrou-se importante avaliar proteinúria e creatinúria após a prática de exercício físico em indivíduos do sexo masculino praticantes de treinamento de força, pois, inicialmente, essa perda de proteínas na urina não está associada com a doença renal, mas posteriormente pode vir a causar danos a níveis renais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos no estudo nove atletas do sexo masculino com idade acima de 18 anos, que praticam regularmente musculação no mínimo há dois meses, além de terem sido considerados aptos ao exame de saúde indicado

¹Mestre. Professor. Universidade Federal de Ouro Preto – Ouro Preto - MG, Brasil.

²Mestre. Fundação Universidade de Itaúna – Itaúna - MG, Brasil.

³Bacharela. Faculdade Presidente Antônio Carlos de Bom Despacho – FACEB – Bom Despacho - MG, Brasil.

Instituição: Faculdade Presidente Antônio Carlos de Bom Despacho – FACEB – Bom Despacho - MG, Brasil.

Artigo recebido em 30/01/2017

Artigo aprovado em 19/07/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700564

pelas duas academias de Nova Serrana - MG. Não fizeram parte da amostra indivíduos que tinham contraindicação médica para a prática dos exercícios propostos, hipertensos, diabéticos, problemas de saúde e/ou em uso de medicamentos que podiam alterar as funções renais. Os participantes do estudo foram instruídos a não realizar qualquer tipo de esforço físico nas horas que antecedessem a realização do estudo.

Os indivíduos que consentiram em participar do estudo responderam um questionário com dados pessoais como nome, se faz uso de medicamentos, uso de suplementos e tempo de treinamento. Cinco dos indivíduos relataram fazer uso de algum suplemento alimentar, três relataram fazer uma dieta rica em proteína e apenas um indivíduo relatou não fazer uso de nenhum suplemento e/ou dieta rica em proteína. Posteriormente, para obter os dados sobre a proteinúria e creatinúria, os voluntários realizaram exercícios físicos em três dias distintos, respeitando o intervalo de 72 horas entre cada programação. No primeiro dia foram submetidos ao teste de repetição máxima para encontrar o valor máximo de peso que o indivíduo suportasse levantar. No segundo dia, o voluntário realizou exercício de baixa intensidade (BI), correspondendo a carga de 60% do peso da repetição máxima determinada anteriormente. No terceiro dia foi submetido aos mesmos exercícios, porém com carga de 90% do peso da repetição máxima, sendo este o exercício de alta intensidade (AI). O programa de treino foi realizado com os seguintes exercícios: leg press horizontal; supino reto; pulley costas; desenvolvimento sentado; agachamento hack/livre; voador peitoral; remada baixa; remada alta. Cada exercício foi realizado com três séries de 12 repetições com o descanso entre as séries de um minuto e trinta segundos.

Para análise laboratorial foram coletadas duas amostras de urina de cada voluntário nos dias do exercício de BI e nos dias de AI, sendo uma amostra de urina coletada antes e a outra após o exercício. A urina foi coletada em frasco apropriado e armazenada em caixa térmica a 8°C,⁽⁷⁾ sendo realizado o teste químico nas amostras de urina não centrifugadas por meio da fita reagente (Uriquest Plus - Labtest Diagnóstica®) para detecção semiquantitativa de proteínas, glicose, nitrito, leucócitos, bilirrubina, pH, densidade, cetonas, sangue e urobilinogênio. A proteinúria foi dosada em duplicata pelo método colorimétrico vermelho de pirogalol e com o reagente Sensiprot (Labtest Diagnóstica®), tendo como valor de referência 1 mg/dL a 15 mg/dL. A creatinúria foi dosada em duplicata pelo método colorimétrico picrato alcalino - Jaffé e com o reagente Creatinina (Labtest Diagnóstica®), tendo como valor de referência 39 mg/dL a 259 mg/dL, seguindo o padrão de qualidade requerido para análises de amostras biológicas. Todos os procedimentos analíticos e valores de referências foram estabelecidos a partir da bula do reagente usado.

Os dados obtidos foram organizados em planilhas do programa Microsoft Excel 2010, a análise de consistência foi realizada para determinar erros de digitação e informação, que depois de conferidos foram corrigidos. Foi empregada uma estatística descritiva para analisar os dados coletados e o teste t de Student para amostras pareadas para comparar a proteinúria e creatinúria antes e após os exercícios.

Todas as informações obtidas foram de total sigilo, preservando-se a identidade dos voluntários e divulgando apenas as de interesse da pesquisa. O projeto foi submetido à Plataforma Brasil, tendo sido aprovado pelo comitê de ética sob CAAE: 37719114.0.0000.5125, nº de comprovante 095947/2014.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou alterações urinárias em uma amostra composta por indivíduos praticantes de treinamento de força, que fizeram dois tipos de exercício físico, sendo um de baixa intensidade e o outro de alta intensidade em dias distintos.

A proteinúria, avaliada pelo método quantitativo, antes da realização do exercício de BI, variou de 1,4 mg/dL a 11,2 mg/dL (Tabela 1), não ultrapassando os valores de referência que são de 1,0 mg/dL a 15,0 mg/dL.⁽⁸⁾ Após realização do exercício de BI foi encontrada proteinúria com valor acima do limite superior da normalidade em 33,3% (3) dos voluntários, sendo que estes valores variaram de 17,6 mg/dL a 26,4 mg/dL (Tabela 1). Comparando-se a proteinúria antes e após o exercício de BI, foi verificado aumento significativo ($p=0,006$) dos valores em todas as amostras analisadas.

Já a proteinúria antes do exercício de AI variou de 3,5 mg/dL a 71,1 mg/dL e 22,2% (2) dos voluntários ultrapassaram o valor de referência (Tabela 1). Após o exercício de AI, a proteinúria variou de 5,2 mg/dL a 78,1 mg/dL e 66,6% (6) dos voluntários ultrapassaram o valor de referência (Tabela 1). Comparando-se a proteinúria antes e após o exercício de AI foi verificado que, em todas as amostras analisadas, houve um aumento significativo da proteinúria ($p = 0,029$).

Avaliando-se os valores de proteinúria antes do exercício de BI e a proteinúria antes do exercício de AI, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,150$) entre os grupos; assim, pode-se afirmar que não houve diferença entre os grupos controles para proteinúria. Quando avaliadas as proteinúrias após os exercícios BI e AI foi encontrado um aumento significativo ($p = 0,011$) dos valores no exercício de AI, refletindo maior perda de proteínas após o exercício de AI.

Ponce e Cruz⁽⁹⁾ encontraram aumento substancial da proteinúria após exercício físico (antes do exercício

Tabela 1 - Concentração da proteinúria no treino de baixa intensidade e alta intensidade.

Voluntários	Treino de BI		Treino de AI	
	Antes do treino (mg/dL)	Após o treino (mg/dL)	Antes do treino (mg/dL)	Após o treino (mg/dL)
01	6,6	8,4	11,9	14,4
02	9,1	12,3	12,3	17,6
03	11,2	17,6	13,0	38,7
04	10,2	26,4	13,3	78,1
05	5,9	8,1	10,2	11,9
06	9,8	12,6	15,4	60,5
07	8,4	20,7	71,1	76,0
08	1,4	4,9	3,5	5,2
09	5,2	12,6	10,9	76,0
	p* = 0,006		p* = 0,029	

13,6 mg/dL \pm 8,9 e após o exercício 79,5 mg/dL \pm 64,7), mesmo após um curto período de esforço (40' a 55'), sendo encontrado aumento significativo da proteinúria no final da corrida, concordando assim com o presente estudo. Reforçando o que foi encontrado, Badilla⁽¹⁰⁾ relata que a forma mais comum de proteinúria é a funcional e que geralmente surge em exame isolado, desaparecendo nos exames subsequentes, podendo estar correlacionada com a febre e o exercício físico. E, mais ainda, Gusmão, Galvão e Possante⁽²⁾ afirmam que a causa primária das alterações na proteinúria no exercício físico intenso é a vasoconstrição da circulação renal promovendo a passagem de proteínas e glóbulos vermelhos através da membrana basal glomerular.

No entanto, a suplementação alimentar quando feita sem orientação adequada pode gerar uma sobrecarga renal, ocasionando efeitos negativos no metabolismo hepático e renal.⁽¹¹⁾ Daniel e Neiva⁽¹²⁾ descrevem que o balanço nitrogenado de indivíduos em uso de algum suplemento proteico é significativamente superior ao de indivíduos que não consomem nenhum tipo de suplemento à base de proteína. No presente estudo não foi evidenciada proteinúria acima do limite de referência antes do exercício de BI (Tabela 1), porém, antes do exercício de AI, 22,2% (2) dos voluntários excederam o limite de referência (Tabela 1), sendo um deles com uma discreta elevação da concentração, com o valor de 15,4 mg/dL e o outro com uma elevada concentração, com valor de 71,1 mg/dL. Este aumento encontrado antes do exercício pode estar relacionado com o uso de suplementos e/ou dieta rica em proteínas, pois 55,5% (5) desses voluntários relataram fazer uso de suplemento à base de proteína e 33,3% (3) relataram fazer dieta rica em proteína (Quadro 1). Não houve um acompanhamento pré-analítico dos hábitos alimentares dos voluntários e do uso de suplementos, indicando que o uso dos suplementos foi diferente entre os voluntários que relataram o consumo, tendo como hipótese o uso exagerado por alguns desses indivíduos na véspera da realização do exercício de AI. Po-

Quadro 1 - Suplementação usada pelos voluntários

Voluntário	Suplementação
01	Proteína, Maltodextrina, Vasodilatador, Creatina e Albumina.
02	Não faz uso de nenhum suplemento.
03	Albumina, Creatina, BCAA, Maltodextrina.
04	Vasodilatador, Proteína e Energético.
05	Dieta rica em proteína.
06	Whey Protein, BCAA, ZMA, Creatina, F Destroyer, Ômega 3.
07	Dieta rica em proteína.
08	Barra proteína e Gel energético.
09	Dieta rica em proteína.

rém, mesmo atentando aos erros pré-analíticos, é notório o aumento da creatinúria com o aumento da intensidade do exercício físico.

A creatinúria avaliada pelo método quantitativo antes do exercício de BI variou de 68,2 mg/dL a 658,4 mg/dL e 33,3% (3) dos voluntários ultrapassaram o valor de referência, que é de 39 a 259 mg/dL (Tabela 2). Após o exercício de BI, a creatinúria variou de 71,8 mg/dL a 742,5 mg/dL e 44,4% (4) dos voluntários apresentaram resultados maiores que o valor de referência (Tabela 2). Também foi verificado aumento dos valores em todas as amostras analisadas, sendo este aumento significativo ($p=0,004$).

Já a creatinúria antes do exercício de AI variou de 73,8 mg/dL a 671,4 mg/dL e 66,6% (6) dos voluntários ultrapassaram o valor de referência (Tabela 2); após o exercício de AI, a creatinúria variou de 95,5 mg/dL a 1.388,8 mg/dL e os mesmos 66,6% (6) dos voluntários apresentaram valores acima da referência, embora este aumento não tenha sido significativo ($p = 0,135$).

A creatinina excretada diariamente é proporcional à massa muscular, exceto em caso de exercício físico, que pode aumentar a sua excreção, difundindo do músculo para o plasma, de onde é removida por filtração glomerular

Tabela 2 - Concentração da creatinúria no treino de baixa intensidade e de alta intensidade.

Voluntários	Treino de BI		Treino de AI	
	Antes do treino (mg/dL)	Após o treino (mg/dL)	Antes do treino (mg/dL)	Após o treino (mg/dL)
01	109,4	134,4	265,7	266,7
02	261,9	273,5	294,5	376,9
03	658,4	742,5	671,4	782,0
04	314,6	415,7	584,2	1388,8
05	134,4	198,3	179,2	248,3
06	146,5	186,6	346,3	497,5
07	237,0	324,8	304,7	313,1
08	68,2	71,8	73,8	95,5
09	94,5	111,8	124,3	143,2
	p* = 0,004		p* = 0,135	

e, em caso de concentrações excessivas, o organismo também realiza a excreção pelos túbulos renais.⁽¹³⁾

Comparando a creatinúria antes do exercício de BI e AI verificou-se um aumento significativo ($p = 0,020$), já os valores encontrados após o exercício de BI e AI não foram significativos ($p = 0,115$); portanto, considerando a amostra antes do exercício físico como controle, pode-se afirmar que houve um viés na análise da creatinúria. Não houve um acompanhamento pré-analítico dos hábitos alimentares dos voluntários e do uso de suplementos, indicando que os hábitos alimentares foram diferentes durante o período da pesquisa, já que cada exercício físico foi realizado em dias distintos. Porém, mesmo atentando aos erros pré-analíticos, é notório o aumento da creatinúria com o aumento da intensidade do exercício físico.

O aumento da creatinúria pode estar associado com a desidratação durante o exercício, pois, quando há um déficit hídrico no corpo, o rim gera uma urina mais concentrada por continuar a excretar solutos.⁽¹³⁾ Nas amostras analisadas, a densidade variou entre 1.021 a 1.026 no exercício de BI, já no exercício de AI variou de 1.023 a 1.028. Portanto, as amostras analisadas não tiveram diferenças significativas da densidade, levando a entender que não foi um aumento da concentração da urina e sim um aumento da excreção da creatinina na urina. A perda hídrica renal (transpiração e evaporação) pode alterar a relação entre soluto e solvente na urina, excretando uma amostra mais concentrada;⁽⁶⁾ os exames químicos de todas as amostras dos exercícios de BI e AI não apresentaram indícios deste tipo de alteração.

A suplementação feita à base de creatina, creatinina e aminoácidos pode ocasionar o aumento da concentração de creatinúria.⁽¹⁴⁾ Em relação aos voluntários, três relataram fazer uso de suplementos a base de creatina e aminoácidos (Quadro 1) e os mesmos apresentaram creatinúria acima do valor de referência (Tabela 2). Segundo Resende, Bizzotto e Rocha,⁽¹⁴⁾ o uso desses suplementos podem

gerar uma sobrecarga renal ao ser excretado. Esta informação é condizente com o evidenciado pelo presente estudo, pois 33% (3) dos voluntários que realizaram exercício de BI e 66% (6) dos voluntários que realizaram exercício de AI já estavam com os níveis de creatinúria acima do valor de referência antes da realização do exercício físico. O trabalho realizado por Carvalho, Molina e Fontana⁽¹⁵⁾ apresenta que a suplementação pode aumentar os níveis de creatinina, ocasionando um falso indicador de disfunção renal. No entanto, Souza Júnior et al.⁽¹⁶⁾ citam que a ingestão em pequenas doses (1 g ou menos) de creatina tem pouco efeito na concentração circulante de creatina, enquanto doses maiores (5 g) podem resultar em um aumento de aproximadamente 15 vezes em relação às concentrações iniciais. Contudo, há relatos controversos: Oliveira⁽¹⁷⁾ explica que a ingestão de suplementos tais como a creatina e proteína não promovem sobrecarga renal tanto em indivíduos que realizam exercícios físicos quanto em indivíduos sedentários. O aumento da massa muscular é outro fator que pode estar relacionado com elevação da concentração da creatinúria, e, apesar de não ter sido medida, pode ter influenciado nos níveis de creatinúria obtidos antes do exercício físico.

Em todas as amostras, a cor permaneceu amarelo citrino, não mostrando alterações significativas antes e após os exercícios de BI e AI. A leucocitúria e glicosúria indicaram níveis normais antes e após os exercícios de BI e AI, o pH prevaleceu ácido nas nove amostras coletadas antes e após o exercício de BI. Após o exercício de AI, oito amostras apresentaram pH ácido e uma amostra apresentou pH neutro; antes do exercício de AI, as amostras analisadas apresentaram pH ácido.

As cetonas normalmente não estão presentes na urina. A detecção de cetona pode ocorrer durante o *stress* fisiológico, jejum, gravidez e o exercício físico em demasia.⁽¹⁸⁾ A cetona é produto do metabolismo incompleto de ácidos graxos e sua presença na urina está relacionada

com condições metabólicas, nas quais ácidos graxos, ao invés de carboidratos, são usados como fonte de energia.⁽¹⁹⁾ Nas amostras analisadas, apenas 11,1% (1) dos voluntários apresentou cetonas após o exercício de BI, que pode estar relacionada ao estado de jejum, presença de dietas alimentares pobre em carboidrato, ou o exercício físico realizado. Nos outros voluntários, o organismo não utilizou ácidos graxos no lugar de carboidrato como fonte de energia, não tendo a positivação de cetonas na fita reagente.

Analisando-se os resultados da fita reagente não foram detectados proteinúria antes do exercício de BI; já nos resultados após o exercício de BI, 22,2% (2) dos voluntários apresentaram positivação da proteinúria na fita. Na análise das amostras antes do exercício de AI, 22,2% (2) dos voluntários já apresentavam proteinúria na fita e nas amostras após o exercício de AI houve positivação da proteinúria em 66,6% (6) dos voluntários. O aumento encontrado no exame quantitativo da proteinúria antes e após os exercícios de BI e AI condizem com a positivação da proteinúria no exame químico das amostras antes e após os exercícios de BI e AI dos mesmos indivíduos.

No trabalho realizado por Lopes e Kirsztajn,⁽²⁰⁾ que analisou alterações urinárias através de fita reagente e comprometimento renal em ultramaratonista ao longo de uma prova de 75 km, foi observado que, nos momentos de esforço físico máximo, houve, em 20% (4) dos corredores, a positivação da hematúria e proteinúria. Nas amostras analisadas no presente trabalho também foram detectados proteinúria após a realização dos exercícios de BI e AI, porém não foi encontrado sangue antes e nem após os exercícios de AI e BI na fita reagente. Vale salientar que a fita reagente consegue detectar a presença de hematúria acima de cinco hemácias intactas por microlitro. Portanto, observou-se que os exercícios realizados pelos voluntários não foram tão extenuantes a ponto de obter hematúria.

Os valores encontrados na relação proteinúria/creatinúria nas coletas realizadas antes e após o exercício de BI foram inferiores a 0,2 mg/mg em todos os voluntários (Tabela 3), valor habitualmente considerado como normal.⁽²¹⁾ Comparando a relação proteinúria/creatinúria antes e após o exercício de BI foi verificado aumento significativo ($p = 0,022$). Já antes do exercício de AI houve uma discreta alteração em 11,1% (1) dos voluntários, com valor de 0,23 mg/mg, ultrapassando o valor de referência (Tabela 3). Após o exercício de AI, 22,2% (2) dos voluntários apresentaram valor superior ao normal, sendo 0,24 mg/mg em uma amostra e 0,53 mg/mg em outra amostra (Tabela 3), mas comparando a relação proteinúria/creatinúria antes e após o exercício de AI, não foi encontrada variação significativa dos valores ($p = 0,196$). Avaliando-se os valores da relação proteinúria/creatinúria antes do exercício de BI e antes do exercício de AI, não foram encontrados valores significativamente diferentes ($p = 0,282$). Comparando-se os valores da relação proteinúria/creatinúria após o exercício de BI e após o exercício de AI, também não foram encontrados valores significativamente diferentes ($p = 0,164$).

Ponce e Cruz,⁽⁹⁾ ao comparar a relação proteinúria/creatinúria após uma corrida, verificaram que 15% (3) dos indivíduos apresentaram a relação proteinúria/creatinúria acima do normal, chegando a encontrar em um deles o valor de 2,05 mg/mg, e que todos apresentavam valores normais antes da corrida, concordando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Por permitir uma maior praticidade e uma precocidade no diagnóstico da lesão glomerular, a relação proteinúria/creatinúria se mostra um ótimo método, podendo ser utilizado na substituição dos demais testes de avaliação da função glomerular.⁽²²⁾ Assim, os valores encontrados acima de 0,2 mg/mg mostram que a excreção estimada de 24 horas está acima do valor ideal, o que, a longo prazo, pode impactar de forma negativa no funcionamento renal.

Tabela 3 - Relação proteinúria/creatinúria no treino de baixa intensidade e alta intensidade.

Voluntários	Treino de BI		Treino de AI	
	Antes do treino (mg/dL)	Após o treino (mg/dL)	Antes do treino (mg/dL)	Após o treino (mg/dL)
01	0,06	0,06	0,04	0,05
02	0,03	0,04	0,04	0,04
03	0,01	0,02	0,01	0,04
04	0,03	0,06	0,02	0,05
05	0,04	0,04	0,05	0,04
06	0,06	0,06	0,04	0,12
07	0,03	0,06	0,23	0,24
08	0,02	0,06	0,04	0,05
09	0,05	0,11	0,08	0,53
	$p^* = 0,022$		$p^* = 0,196$	

Esse método foi útil para avaliar a função renal dos voluntários, por ser um exame que pode ser feito a qualquer horário do dia, facilitou na abordagem dos voluntários e contribuiu com a realização do estudo, pois não foi exigido o horário para participação dos voluntários.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos possibilitaram observar alterações urinárias nos voluntários, indicando que o exercício físico interfere na proteinúria, determinada pela positividade no teste pela fita reagente e na dosagem pelo método quantitativo, sendo a proteinúria maior após realizar exercício físico e aumenta com o aumento da intensidade do exercício físico. Visto que não houve um acompanhamento pré-analítico dos voluntários, hábitos alimentares diferentes ocorreram durante o período da pesquisa, além de terem feito consumo de suplementos que contêm creatina, o que proporcionou um viés na análise da creatinúria. Porém, foi encontrado aumento da creatinúria com a realização do exercício físico.

Inicialmente, essa perda de proteínas na urina não está associada com a doença renal, mas posteriormente pode vir a causar danos a níveis renais, pois, quanto maior for a proteinúria, mais rápido será o declínio da função renal.⁽²³⁾

A prática de exercício físico é muito importante, mas tem que ser monitorada e adaptada a cada indivíduo. O exercício deverá ter um programa personalizado e ser orientado por profissionais especializados. Se estas regras não forem adotadas os malefícios decorrentes do exercício físico poderão sobrepor-se aos seus benefícios.

Considerando as limitações da pesquisa, devido ao pequeno número de voluntários, mais estudos com indivíduos praticantes de treinamento de força são necessários para consolidar os achados referentes ao exercício físico e alterações urinárias nesta modalidade.

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas e não houve conflito de interesses entre os autores.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os voluntários da pesquisa que deram fundamental contribuição para o sucesso desse estudo.

Às academias envolvidas no estudo, que abriram as portas e nos receberam com muita gentileza e que, sem dúvida, contribuíram muito para que esta pesquisa fosse concluída.

E, por fim, nossos sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Abstract

Objective: Intense and extensive physical exercise regarding unplanned or poorly structured physical activity can lead to complications and spoil its benefits. In this perspective, proteinuria and creatinuria have been analyzed in practitioners of strength training after physical exercise of low and high intensity. **Methods:** This paper is a descriptive field study, cross-sectional and experimental character. Thus, proteinuria and creatinuria were analyzed in urine samples collected before and after physical exercise of low and high intensity. The exercises of different intensities were performed on different days with an interval of at least 72 hours. **Results:** A significant increase of proteinuria happened after low and high intensity physical exercise, with higher protein loss after high intensity physical exercise. Creatinuria also increased after physical activity. **Conclusion:** The performance of intense physical exercise promoted the increase of proteinuria and creatinuria in practitioners of strength training. Proteinuria was higher the more intense the physical exercises were. Considering the limitations of the research, due to the small number of volunteers, an extensive study involving strength training practitioners is required to consolidate the findings related to physical exercise and urinary changes in this modality.

Keywords

Proteinuria; Physical Education and Training; Creatinine

REFERÊNCIAS

- Cardoso, M. Presença de dor em praticante de exercício físico em academias nas diferentes modalidades. Monografia (Pós-graduação especialização em Fisioterapia Traumatológica e esportiva) Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2011. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/handle/1/956>. Acesso em: 23 de maio de 2014.
- Gusmão L, Galvão J, Possante M. A resposta do rim ao esforço físico. Rev. Port. Nefro Hipert. 2003;17(1):73-80.
- Lana AC, Paulino CA, Gonçalves ID. Influência dos exercícios físicos de baixa intensidade e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. Rev. Bras. Med. Esporte. 2006;12(5):248-54.
- Apriete DCB. Efeito agudo do exercício físico aeróbico na atividade nervosa simpática periférica de pacientes portadores de doença renal crônica - estágio III. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5148/tde-10062010-133527/en.php>. Acesso em 23 de junho de 2014.
- Siqueira L de O, Bortoluzzi J, Zanin F, Savi S, Deliberal AP, Canal PC. Análise da suplementação de carboidratos e solução isotônica sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos de jogadores profissionais de futebol em condições reais de treinamento. Rev. Bras. Cienc. Esporte. 2012;34(4):999-1016.
- Siqueira L de O, et al. Análise de parâmetros bioquímicos séricos e urinários em atletas de meia maratona. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 2009 out;53(7):844-52. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000700008>. Acesso em 14 de abril de 2014.
- Ribeiro KCB, Levenhagem BRS, Lima EN, Pereira CV, Lopes de HM, Amaral JOC. Armazenamento da urina, sob refrigeração, preserva a amostra nas análises químicas, celularidade e bacteriúria no EAS. J. Bras. Patol. Med. Lab. [online]. 2013;49(6):415-22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S167624442013000600006>. Acesso em: 26 de maio de 2014.
- Sisenando HA, et al. Microalbuminúria e clearance de creatinina: importância do diagnóstico precoce na prevenção da disfunção renal em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Rev. Elet. Far. 2011;8(1):14-21. Disponível em: <http://revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/13807>. Acesso em 05 de novembro de 2014.

9. Ponce P, Cruz J. Alterações urinárias induzidas pelo esforço físico. *Rev. Acta med.Port.* 1988;3:209-11. Disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/3561/2832>. Acesso em 20 mar. 2014.
10. Badilla BC. Proteinúria. *Rev. Med. Cos. Cent. Costa Rica.* 2012;69(603):351-55.
11. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr. Campinas.* 2004;17(4):397-409.
12. Daniel MF, Neiva CM. Avaliação da ingestão proteica e do balanço nitrogenado em universitários praticantes de musculação. *Rev. Mack. Edu. Fis. Esp.* 2009;8(1):21-39. Disponível em: <http://editora.revistas.mackenzie.br/index.php/remef/article/viewFile/1630/1194>. Acesso em 28 de outubro de 2014.
13. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1997.
14. Rezende HR, Bizzoto WS, Rocha BAM da. Comparação de creatinina e exames dos elementos anormais de sedimentoscopia (EAS) em pessoas que utilizam suplementação de creatina e fazem atividade física em academias de Trindade em comparação a pessoas que não utilizam suplementação. In: *Seminário de pesquisa, 5, Trindade: Faculdade de Goyazes.* 2013. Disponível em: <http://fug.edu.br/2010/pdf/tcc/COMPARACAODOSNIVEISDECREATININAEEXAMEDOSELEMENTOSANORMAISDESEDIMENTOSCOPIA.pdf>. Acesso em 02 de novembro de 2014.
15. Carvalho APPF, Molina GE, Fontana KE. Suplementação associada ao treinamento resistido não altera as funções renal e hepática. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 2011;17(4):237-41.
16. Souza Júnior TP, et al. Treinamento de força e suplementação de creatina: densidade de carga como estímulo otimizador nos ajustes morfológicos e funcionais. Tese (Doutorado em Educação Física) - Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas; 2005. Disponível em: www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?down=vtls000377713. Acesso em 03 de novembro de 2014.
17. Oliveira VA de, Mazini Filho ML, Pace Júnior RL, Matos DG, Rodrigues BM, Zanella AL, et al. Estudo comparativo da concentração de creatinina em indivíduos praticantes de musculação e sedentários. *Rev. Dig.* 2010;14(142). Disponível em: <http://www.efdeportes.com/efd142/concentracao-de-creatinina-em-praticantes-de-musculacao.htm>. Acesso em 01 de maio de 2014.
18. Rodrigues OM. A importância da sedimentoscopia na análise de urinas de cães (Canis familiares) com aspectos físico-químicos normais. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) - Curso de Medicina Veterinária, Escola Superior Batista do Amazonas; 2011. Disponível em: <http://net.esbam.edu.br/ojs/ojs-2.3.4/index.php/TCC/article/view/95>. Acesso em 03 de novembro de 2014.
19. Whitney E, Rolfes SR. *Nutrição 1 Entendendo os Nutrientes.* 5a. ed. São Paulo: Cengage Learning. 2008.
20. Lopes TR, Kirsztajn GM. Análise renal de ultramaratonista em prova de 75 Km. *Act Paul. Enfer.* 2009;22 (Especial-Nefrologia): 487-9.
21. Antunes VVH. Relação proteína/creatinina em amostra de urina: estudo longitudinal em pacientes com glomerulopatia primária. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas: Nefrologia) - Programa de pós-graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/8731/000587731.pdf?seq>. Acesso em: 24 de agosto de 2014.
22. Araújo PA. Avaliação da relação proteína/creatinina urinária como método de escolha para diagnóstico precoce de lesão glomerular em cães (Canis familiaris). Monografia (Especialização Latus sensus em Clínica Médica e Cirúrgica em pequenos animais) Universidade Castelo Branco; 2007. Disponível em: <http://qualittas.com.br/uploads/documentos/AvaliacaodaRelacaoProteina,CreatinaUrinaria20PatriciadeAzevedodeAraujo.PDF>. Acesso em 18 de outubro de 2014.
23. Ferrer F, Oliveira N, Lopes K, Figueiredo A, Maia P, Carreira A. Proteinúria: como valorizar o seu significado. *Rev. Port. Clin. Geral.* 2008;24(2):235-47.

Correspondência

Olimpio Pereira de Melo Neto

Rodovia BR262,

Km 480, s/n Zona Rural,

35600000 – Bom Despacho - MG, Brasil

Valores de referência dos índices plaquetários e construção de algoritmo para liberação do plaquetograma

Reference values for the platelet indices and algorithm for plateletgram evaluation

Leila Monteiro¹

Resumo

Objetivo: Determinar os valores de referência do plaquetograma no serviço de Hematologia do Laboratório Central do Hospital Universitário Oswaldo Cruz de Pernambuco, bem como criar um algoritmo para revisão de lâminas em casos de trombopenias e trombocitoses, utilizando como critérios os valores de referência dos índices plaquetários, além das mensagens e histograma emitidos pelo contador hematológico. **Métodos:** O presente estudo foi realizado a partir das informações obtidas no banco de dados do equipamento Sysmex XT 1800, contador hematológico que utiliza impedância elétrica e laser como metodologia para contagem de células. Foram selecionados 258 hemogramas de pacientes atendidos no ambulatório do Laboratório Central do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, com contagem de plaquetas entre 150 e 450 mil/mm³, a fim de se calcularem os valores de referência de todos os índices plaquetários. Os valores de referência foram calculados a partir da média de cada parâmetro, mais ou menos dois desvios padrões. O algoritmo para liberação do plaquetograma foi construído a partir dos valores de referência obtidos para cada índice, em conjunto com a interpretação das mensagens e do histograma emitidos pelo equipamento XT 1800. **Resultados:** Os valores de referência encontrados foram próximos àqueles encontrados na literatura, sendo ainda necessários outros estudos de correlação para valorizar ainda mais o uso desses índices na rotina laboratorial e nos laudos de hemograma. **Conclusão:** A determinação dos valores de referência dos índices plaquetários, bem como a construção do algoritmo para revisão de lâmina dos plaquetogramas, contribuíram para otimização da rotina laboratorial e valorização clínica do plaquetograma.

Palavras-chave

Contagem de Plaquetas; Plaquetas; Trombocitopenia; Trombocitose; Algoritmo

INTRODUÇÃO

A evolução da automação na hematologia introduziu na rotina laboratorial diversos parâmetros. Dentre essas novas ferramentas, aquelas relacionadas às plaquetas, apesar de já serem disponibilizadas pela maioria dos contadores hematológicos de última geração, ainda são pouco compreendidas e utilizadas tanto na prática médica, como laboratorial, devido à dificuldade de padronização.⁽¹⁾

Esses parâmetros compõem o chamado Plaquetograma (em analogia à denominação dada ao eritograma e leucograma) e consiste de quatro índices plaquetários, além da contagem de plaquetas.⁽²⁾ Estes índices são PCT – plaquetócrito, PDW – Amplitude de variação do tamanho das plaquetas, MPV – volume plaquetário médio e P-LCR

– percentual de plaquetas grandes (com volume maior que 12 fL).⁽²⁾

Destes, o mais conhecido e algumas vezes presente no laudo é o MPV. Este índice representa a média dos volumes de todas as plaquetas contadas e avaliadas por impedância elétrica na maioria dos contadores automatizados. Dessa forma, os contadores medem as plaquetas e ao contá-las fornecem a média do volume plaquetário, plotando os valores em um histograma.⁽²⁾ Alguns contadores ainda utilizam a metodologia ótica para a contagem de plaquetas e determinação do volume médio plaquetário.⁽³⁾

O MPV apresenta uma correlação inversa com a contagem de plaquetas e representa um importante marcador para a atividade e função plaquetárias, sendo muito importante na avaliação de diversas desordens clínicas de ori-

¹Biomédica. Universidade de Pernambuco – UPE – Recife - PE, Brasil.

Instituição: Universidade de Pernambuco – UPE – Recife - PE, Brasil.

Artigo recebido em 30/08/2016

Artigo aprovado em 26/06/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700531

gem hematológica ou não, tais como *diabetes mellitus*, infarto agudo do miocárdio, leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide aguda, entre outras doenças onco-hematológicas, bem como na avaliação da resposta medular.^(4,5)

O PCT representa o equivalente ao hematócrito para as plaquetas e corresponde ao volume total de plaquetas num determinado volume de sangue e está diretamente relacionado com a contagem de plaquetas e com seu volume.⁽⁶⁾ É fornecido pelos analisadores Sysmex (Roche Diagnóstica®) através do chamado empilhamento virtual. Em outros equipamentos, este índice é calculado a partir do MPV, pela fórmula: $PLT \times MPV$.⁽³⁾

Por outro lado, os outros dois índices, o PDW e o P-LCR, são calculados a partir do histograma de distribuição do tamanho plaquetário. A largura de distribuição até o nível de 20% é o PDW, enquanto que o percentual de plaquetas com volume maior que 12 fL será o P-LCR.⁽³⁾

Na rotina laboratorial, a automação vem contribuindo para dar maior rapidez e precisão nos resultados e a revisão de lâmina, cada vez mais restrita, fica limitada a condições em que se encontram alterações significativas nas contagens globais ou emissão de mensagens de erros, a fim de se confirmarem os resultados.⁽⁷⁾

No caso específico das plaquetas, quando a contagem global está aumentada ou diminuída, uma avaliação em lâmina deve ser realizada com o propósito de ratificar as contagens fornecidas pelos analisadores hematológicos e avaliar a morfologia plaquetária.⁽⁷⁾ Nesta situação, os índices plaquetários em questão podem nortear as decisões quanto à revisão de lâmina na rotina laboratorial.

Além disso, alguns estudos foram realizados comprovando a utilidade e a relação desses parâmetros com diversas condições clínicas. Salto encontrou média de MPV significativamente menor em pacientes com Púrpura Trombocitopênica Imune (PTI) quando comparada com outras condições hematológicas (Leucemias agudas e crônicas, linfoma Hodgkin e Não Hodgkin e Síndrome Mielodisplásica), podendo este índice ser usado como ferramenta orientadora ao diagnóstico de PTI. Neste mesmo estudo também foram observadas diferenças significativas nas médias de PCT entre estes doentes quando comparados ao grupo controle.⁽⁵⁾

Da mesma forma foram evidenciadas diferenças significativas dos valores de MPV, PDW e P-LCR em um grupo de gestantes com pré-eclâmpsia, comparadas a um grupo de gestantes normais, enquanto que não foi evidenciada diferença significativa nas contagens de plaquetas nesses grupos.⁽⁴⁾

Por outro lado, apesar desses estudos, pouco se conhece a respeito dos valores de referência desses índices, sendo talvez este o motivo por serem ainda pouco valorizados na prática laboratorial. Além disso, existem muitas vari-

áveis que interferem nos valores dos índices plaquetários, devido aos quais se torna necessário que os valores de referência sejam estabelecidos para cada serviço. Sustentam esta necessidade a variação na metodologia dos equipamentos e a dinâmica populacional de cada local.⁽⁸⁾

Diante disso, um estudo mais aprofundado desses parâmetros é de suma importância tanto para a classe médica quanto para os profissionais analistas clínicos, que podem fornecer resultados mais completos aos pacientes e médicos assistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo com 258 pacientes ambulatoriais do Hospital Universitário Oswaldo Cruz de Pernambuco (HUOC), atendidos no laboratório central deste hospital com solicitação médica para hemograma entre os meses de julho e setembro de 2013, por meio da consulta ao banco de dados do contador hematológico utilizado em nosso serviço. A consulta em banco de dados envolveu apenas os valores numéricos dos parâmetros plaquetários. Por se tratar de um estudo retrospectivo, a análise de variáveis pré-analíticas, sabidamente conhecidas por interferirem na contagem de plaquetas (tempo de garroteamento, homogeneização, dificuldades da coleta), não foi possível, pois tais informações não constam no banco de dados consultado.

Da mesma forma, a análise do esfregaço sanguíneo foi realizada em tempo oportuno durante a avaliação do hemograma para liberação do resultado, sem, no entanto, terem sido feitas anotações no banco de dados quanto aos achados.

Os pacientes foram selecionados de forma aleatória, excluindo-se aqueles do Centro de Oncologia e do setor de transplantados do hospital. Também não foram separados grupos etários, nem de sexo, tendo em vista que o valor de referência preconizado para contagem de plaquetas é único para ambos os sexos e não varia com a idade.

As amostras de hemograma foram coletadas por punção venosa em tubo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e processadas em até duas horas após a coleta, no contador hematológico Sysmex XT 1800 - Roche Diagnóstica®, que utiliza a metodologia de impedância elétrica para contagem de células. As plaquetas são contadas no mesmo canal dos eritrócitos, sendo consideradas plaquetas as células com volume inferior a 20 fL.⁽⁹⁾

Quanto aos índices plaquetários, o PCT é determinado através do número de plaquetas que passam por um orifício com volume e tempo pré-definidos, método conhecido como empilhamento virtual. O MPV é calculado como o quociente entre PCT e a contagem de plaquetas, enquanto que o PDW e P-LCR são calculados a partir do histograma de distribuição de tamanho plaquetário, sendo o primeiro obti-

do no nível de 20% de frequência do histograma, enquanto que o segundo representa o percentual de plaquetas com volume a partir de 12 fL até o limite superior.⁽³⁾

Determinação dos valores de referência dos índices plaquetários

A fim de se determinarem os valores de referência do plaquetograma, foram calculadas as médias e os desvios padrões (DP) para cada um dos parâmetros estudados, considerando apenas os pacientes que apresentaram valores de contagem de plaquetas compreendidas entre 150 a 450 mil/mm³. Os valores de referência foram considerados como média + 2 DP, considerando modelo utilizado em Salto (2012). Para estes cálculos foi utilizado o programa Excel - Microsoft.

Algoritmo para revisão de lâmina

No presente estudo, tendo como base os valores de referência encontrados para os índices plaquetários, foi proposto um algoritmo para revisão de lâminas nos casos de trombopenias e trombocitoses, em avaliação conjunta com o histograma, os alarmes e mensagens liberados pelo equipamento.

Ética

O projeto de pesquisa deste estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUOC - Hospital Universitário Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação dos valores de referência

Os valores de referência encontrados para a contagem de plaquetas e para os demais parâmetros do plaquetograma estão apresentados na Tabela 1.

No que se refere à contagem de plaquetas, observou-se que o limite inferior na população estudada é menor que o encontrado na literatura, que é de 140 (mil/mm³), enquanto que o limite superior (412 mil/mm³) se mostrou bem próximo ao limite conhecido como normal - 400 mil/mm³.

Tabela 1 - Valores de Referência do Plaquetograma na população estudada

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Valores de referência*
Cont. de plaquetas (mil/mm ³)	266,96	72,64	121,66 - 412,26
MPV (fL)	10,19	1,02	8,15 - 12,24
PCT (%)	0,27	0,07	0,13 - 0,41
PDW (fL)	11,95	2,16	7,62 - 16,27
P-LCR (%)	26,37	7,32	11,72 - 41,00

*valores de referência expressos pela média + 2 desvios padrão

Botma et al., em estudo realizado com 60 indivíduos, encontraram valores de referência para a contagem de plaquetas de 178 a 429 (mil/mm³). Em outro estudo, o grupo que apresentou contagem de plaquetas normal apresentou média de 269 (mil/mm³), com variação entre 150 a 445 (mil/mm³).⁽¹⁰⁾ Estes valores também são citados em outras publicações: 140 a 400 ou 140 a 450(mil/mm³), dependendo do método utilizado, por Oliveira⁽⁹⁾ e ainda, de 140 a 360 (mil/mm³) citado por Failace.⁽¹¹⁾

Algumas variáveis pré-analíticas podem interferir na contagem de plaquetas, tais como, dificuldades na coleta, garroteamento prolongado, falta de homogeneização adequada e a proporção de anticoagulante/sangue. Além da possibilidade de pseudotrombopenia por agregação plaquetária em EDTA e satelitismo plaquetário, condições de causa idiopática, que podem ocorrer em alguns pacientes.⁽¹¹⁾ Essas variáveis não foram controladas no presente estudo devido o mesmo ter sido feito com base na consulta do banco de dados. Sendo necessário, portanto, estudos posteriores para se confirmar a hipótese da existência desses interferentes no valor de referência para contagem de plaquetas.

Tanto o MPV quanto o PDW estão relacionados com o tamanho das plaquetas, sendo o primeiro inversamente proporcional à contagem de plaquetas. O tamanho das plaquetas sofre interferência de vários fatores, em especial do anticoagulante utilizado na coleta. O EDTA, anticoagulante de escolha para análises hematológicas, pode induzir alterações na forma e na ultraestrutura das plaquetas, que variam com o tempo e temperatura. Estudos já apontaram que MPV aumenta em decorrência do inchaço plaquetário provocado pelo EDTA, no entanto também foi observado em outros estudos que este inchaço diminui quando a análise é realizada em até duas horas após a coleta.⁽¹¹⁾

Esses parâmetros de volume plaquetário sofrem ainda interferências relacionadas às demais séries sanguíneas, tais como presença de fragmentos eritrocitários ou leucocitários, crioaglutininas, micrócitos, bem como qualquer outra causa que gere debris.⁽¹¹⁾

No presente estudo foram encontrados valores de referência semelhantes aos observados na literatura, indicando que na amostra populacional analisada os possíveis interferentes não foram suficientes para gerar erros significativos na determinação desses índices pelo contador hematológico, estando os mesmos de acordo com o esperado. Comar et al.⁽⁷⁾ relataram que os limites de referência encontrados em estudos publicados foram de 8 fL a 13 fL e 9 fL a 14 fL, respectivamente, para MPV e PDW em contadores Sysmex - Roche Diagnóstica. Da mesma forma, Botma et al.⁽¹⁰⁾ encontraram média do MPV 10,34 fL, com valores de referência entre 8,8 fL a 12,5 fL, enquanto que a média do PDW foi 12,19 fL com variação entre 9,3 fL a 16,0 fL.

O PCT representa a massa plaquetária e não sofre grandes variações com a variação da contagem de plaquetas, diminuindo apenas quando há trombopenias bastante acentuadas, situações em que o organismo não consegue compensar a massa plaquetária.⁽⁶⁾ Esta observação está de acordo com o verificado no nosso estudo, o qual apresentou baixo desvio padrão para este índice (0,07) e valores de referência semelhantes aos encontrados na literatura consultada, que apresentaram valores de 0,22 a 0,40,⁽⁹⁾ 0,13 a 0,43%,⁽¹⁰⁾ enquanto que Giovanetti, Nascimento e Paula⁽⁸⁾ encontraram médias 0,24 (DP=0,07), para mulheres e 0,28 (DP = 0,06) para homens.

O último índice, P-LCR, representa o percentual de plaquetas grandes e apresentou, em nosso estudo, uma variabilidade muito alta, com desvio padrão de 7,32, numa população com contagem de plaquetas normal. Estes valores, tanto da média (26,37), quanto do desvio padrão (7,32) são próximos aos observados por Maluf,⁽³⁾ que observou média 26,99 e desvio padrão de 6,61, com intervalos de referência de 15,8 a 41,6, semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

Construção do algoritmo para liberação do plaquetograma

O algoritmo para liberação do plaquetograma foi desenvolvido com o intuito de valorizar a análise do plaquetograma como critério para revisão de lâminas nos casos de trombopenias e trombocitoses, juntamente com a interpretação do histograma e das mensagens emitidas pelo equipamento. Além disso, com o objetivo de ser implantado na rotina do nosso serviço, utilizamos como referência os alarmes emitidos pelos dois equipamentos utilizados em nosso laboratório, XT 1800 e XE 2100, ambos da Sysmex - Roche Diagnóstica® (Tabela 2).

Associando as mensagens, os valores de referência encontrados e o histograma de distribuição plaquetário construímos o fluxograma para uso na tomada de decisões e liberação de resultados em nosso serviço (Figura 1).

Tabela 2 - Mensagens emitidas pelos equipamentos XT 1800 e XE 2100 para a série plaquetária

Mensagens	Significado
PLT Abn. Distribution	Distribuição anormal no histograma
PLT Abn. Scattergram (apenas XE 2100)	Distribuição anormal no histograma
PLT clumps	Agregação plaquetária
Trombocitopenia	Cont. plaquetas abaixo do valor referência do equipamento*
Trombocitose	Cont. plaquetas acima do valor referência do equipamento*

*cada equipamento é configurado pelo usuário. Os nossos são: trombocitopenia < 100 (x103/mm³) e trombocitose > 600 (x103/mm³).



Fluxograma para liberação do plaquetograma com ou sem revisão de lâmina

Os equipamentos utilizados no Serviço de Hematologia do laboratório Central do Hospital Universitário Oswaldo Cruz estão configurados para liberar as mensagens de trombocitopenia e trombocitose com valores abaixo de 100 (mil/mm³) e acima de 600 (mil/mm³), respectivamente. No entanto, como a linearidade dos equipamentos Sysmex para contagem de plaquetas varia de 0 a 5.000 (x103/mm³), consideramos valores alargados para revisão de lâmina, quando a contagem de plaquetas for menor que 50 (mil/mm³) ou maior que 600 (mil/mm³).

Foram utilizados esses mesmos limites como critérios para construção do algoritmo para liberação do plaquetograma, no que diz respeito à contagem de plaquetas, enquanto que para os índices utilizamos os limites encontrados no presente estudo.

Além disso, há que se considerar o significado de cada índice, pois o plaquetócrito, por exemplo, por não sofrer variações significativas, não pode ser considerado como único critério para decisão sobre revisão de lâmina. Os demais índices, por sua vez, refletem variações no tamanho das plaquetas, o que pode ser facilmente verificado e confirmado pela análise da lâmina.

Este fluxograma é de grande importância para nosso serviço, pois os índices plaquetários não são emitidos na impressão do hemograma, ficando disponíveis apenas para consulta no software do equipamento (com exceção do MPV), de tal forma que muitas vezes passam desper-

cebidos pelos analistas que desconhecem a interpretação e função desses parâmetros.

A decisão sobre a necessidade de revisão de lâmina em casos de trombopenia ou trombocitose ficará mais fácil com a análise deste fluxograma, utilizando todos os recursos fornecidos pelos equipamentos e interpretando corretamente os índices plaquetários em conjunto com o histograma, sendo dessa forma útil não apenas para nosso serviço, mas também para outros que se interessarem.

CONCLUSÕES

1. O intervalo de referência encontrado para a contagem de plaquetas mostrou que a população estudada apresenta limite inferior abaixo do que o esperado e conhecido como normal divulgado na literatura consultada. Esses resultados podem ser devido a problemas pré-analíticos, tais como garroteamento demorado, erro na proporção sangue/anticoagulante e falha na homogeneização da amostra. No entanto, tais variáveis são hipóteses que necessitam de estudos posteriores para confirmar ou não a interferência nos limites de referência da contagem de plaquetas na população estudada.

2. Os intervalos de referência dos índices MPV, PDW, PCT e P-LCR apresentaram valores semelhantes aos encontrados na literatura consultada.

3. O fluxograma desenvolvido neste trabalho será de grande importância para valorização do plaquetograma, tanto como critério para decidir sobre revisão da lâmina em casos de trombopenia e trombocitose, como também para emissão de laudos com informações mais completas que possam ajudar a classe médica a monitorar melhor a condição clínica de nossos pacientes.

Abstract

Objective: The present study aimed to determine reference values of plateletgram at Hematology Service of Central Laboratory of University Hospital Oswaldo Cruz in Pernambuco, in addition of build an algorithm for slide revision in thrombocytopenia and thrombocytosis clinical conditions. **Methods:** The present study was carried with a retrospective research in the database of the equipment Sysmex XT 1800, which uses impedance and laser technology for cells count. 258 patients from the database have been selected, all of whom had been assisted on the outpatient department of the Central Laboratory of University Hospital Oswaldo Cruz, and all presented platelet count between 150-450 thousand/mm³ according to the records. Based on the platelet count of the selected patients, the reference values for all indices described previously have been calculated, using the mean value for each parameter plus or minus two standard deviations. The algorithm for the platelet parameters results was achieved through the use of the reference values obtained for each index, in addition to the interpretation of the histogram and messages of the cell count provided by the XT 1800. **Results:** The reference values found in this study were similar to those found in the already existing literature. However, other correlation studies between these indices with the aim of increasing their value in the laboratory routine and also in medical decisions are still necessary. **Conclusion:** The determination of reference values for platelet indices, as well as the algorithm for slide revision of plateletgram contributed to optimization of

laboratory routine and improve the clinical appreciation of the platelet parameters.

Keywords

Platelet count; Blood platelets; Thrombocytopenia; Thrombocytosis; Algorithms

REFERÊNCIAS

1. Farias MG, Dal Bó S. Importância Clínica e Laboratorial do Volume Plaquetário Médio. J Bras Patol Med Lab., v 46, n. 4, p. 275-81, agosto 2010.
2. Failace R. Plaquetograma. In: _____. Hemograma: Manual de Interpretação. Porto Alegre. 4a Edição. 2003. p. 255-260.
3. Maluf CB. Intervalos de Referência dos Parâmetros de Volume Plaquetários: Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto de Minas Gerais - ELSA-MG. 2011. Dissertação (Mestrado em Patologia). Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.
4. Santos EV, Filho JM. Plaquetograma em Gestantes Normais e com Pré-eclâmpsia. RBGO. 2004;26(3):201-06.
5. Salto AB, Fontana S, Marquesoni E, Casale MF. Valoración de índices plaquetários en las trombocitopenias. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 2012;46(1):23-30.
6. Pinto C, Barros C, Costa E. Índices Plaquetários em Doentes Infectados com Vírus da Imunodeficiência Humana e com Trombocitopenia. Academia.edu. 2008. Disponível em: <http://www.academia.edu/>. Acesso em 14/11/2014.
7. Comar SR, Silva PH. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. RBAC. 41(4):257-65. 2009.
8. Giovanetti VT, Nascimento AJ, De Paula JP. Platelet Indices: laboratory and Clinical Applications. Rev Bras Hematol. Hemoter. 2011;33(2):164-5.
9. Oliveira RAG. Automação em Hematologia: Contadores Multiparamétricos. In: _____. Hemograma: Como Fazer e Interpretar. São Paulo. Edição Única. 2007. p. 125.
10. Botma J, et al. Reference Ranges for Platelet Indices using Sysmex XE2100 Blood Analyser. Medical Technology AS. V. 26, n. 2, 2012.
11. Failace R. Plaquetograma. In: _____. Hemograma: Manual de Interpretação. Porto Alegre. 5a Edição. 2007. p. 298.

Correspondência

Leila Monteiro

Rua Jerônimo Vilela 118 – Campo Grande
52040-180 – Recife - PE, Brasil

Análise das concentrações de ureia e creatinina em soro e plasma com ácido etilenodiamino tetra-acético e citrato de sódio

Analysis of the urea and creatinine concentrations in serum and plasma with ethylenediamine tetraacetic acid and sodium citrate

Daniela Marini de Andrade¹

Paula Rocha Chellin²

Juliana Brovini Leite³

José Otávio do Amaral Corrêa²

Resumo

Objetivo: Este estudo objetivou comparar os resultados das dosagens de ureia e creatinina entre amostras de soro e plasma com EDTA e citrato de sódio, como forma de determinar se esses biomarcadores sofrem interferência em suas dosagens quando analisados pelo plasma. **Métodos:** Um total de 100 amostras de pacientes admitidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo 50 pacientes atendidos em ambulatório, que não apresentavam histórico de doença renal, e 50 pacientes do setor de hemodiálise, a fim de se obterem valores dentro e fora da referência para ureia e creatinina. Todos os resultados foram comparados pelo teste de Wilcoxon pareado, com um $p < 0,05$ indicando significância estatística. **Resultados:** Observaram-se diferenças estatisticamente significativas comparando-se todos os valores de ureia coletados em tubo de soro e em plasma com EDTA ($p = 0,0016$), bem como a comparação entre as amostras coletadas em soro e em plasma com citrato de sódio ($p < 0,0001$). A mesma diferença estatisticamente significativa foi observada quando comparados todos os valores de creatinina coletada em soro e em plasma com EDTA ($p = 0,0147$) e entre os valores de soro e citrato de sódio ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Os resultados mostraram haver diferenças estatísticas significativas entre as dosagens realizadas em soro e plasma com EDTA e citrato de sódio, tanto para a ureia quanto para a creatinina. Porém, a proximidade dos valores encontrados de ureia e creatinina em amostras de soro e plasma mostrou não haver diferença clínica entre os mesmos.

Palavras-chave

Bioquímica; Plasma; Soro; Testes laboratoriais

INTRODUÇÃO

Atualmente, com a constatação do rápido aumento de sua prevalência, a Doença Renal Crônica (DRC) é considerada um problema de saúde pública, com alto impacto econômico.⁽¹⁾ Dados do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), durante a pesquisa panorâmica da saúde brasileira, demonstraram que, no ano de 2013, a doença renal crônica representava em indivíduos acima de 18 anos 1,4% dos diagnósticos médicos de doença crônica.⁽²⁾

A doença se manifesta quando os rins, órgãos vitais, têm suas funções alteradas, principalmente a filtração glomerular, removendo resíduos e excesso de água do

organismo, contribuindo assim para a homeostasia, regulando as concentrações séricas e plasmáticas através da absorção e excreção de substâncias e íons filtrados nos glomérulos.^(3,4)

Em relação ao monitoramento e prevenção da doença renal, é importante identificar, de forma precoce, os pacientes que apresentam alteração da função renal, pois as manifestações clínicas permanecem silenciosas e se confundem com sinais clínicos de diversas outras morbidades até a doença situar-se no estágio avançado, que pode levar à necessidade de diálise e/ou transplante. É com apoio nessas observações que se preconiza a utilização de testes laboratoriais clínicos para o diagnóstico e acompanhamento da doença.⁽¹⁾

¹Acadêmica. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora - MG, Brasil.

²Doutor(a). Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora - MG, Brasil.

³Mestre. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora - MG, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora - MG, Brasil.

Artigo recebido em 18/01/2017

Artigo aprovado em 02/05/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700562

As análises laboratoriais de ureia e principalmente da creatinina são consideradas testes específicos, entretanto tardios e pouco sensíveis. No entanto, ainda na atualidade são os principais biomarcadores séricos e plasmáticos utilizados para avaliação da função renal, pois podem ser dosados por exames laboratoriais clínicos de rotina, apresentam boa correlação clínico-laboratorial, são de origem endógena e livremente filtradas pelos glomérulos.^(1,5,6)

Soro e plasma são amostras rotineiramente empregadas em análises laboratoriais.⁽⁷⁾ Muitos fornecedores de reagentes relatam em suas bulas que as dosagens podem ser realizadas em soro ou plasma, porém somente são recomendadas em plasmas se todas as outras análises desses mesmos pacientes forem realizadas neste mesmo tipo de amostra.⁽⁸⁾ Portanto, para acompanhamento médico, análises de ureia e creatinina devem ser realizadas sempre em soro, ou utilizando um mesmo anticoagulante, o que exige uma padronização do laboratório, devido à falta do conhecimento da interferência de anticoagulantes nestas dosagens.

Apesar desta recomendação, de que amostras de pacientes sejam analisadas sempre com soro ou um mesmo tipo de anticoagulante, para parâmetros comparativos, uma lacuna existe no conhecimento das variações nas concentrações de ureia e creatinina analisadas no soro ou em plasmas contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou citrato de sódio para avaliação da função renal. Para elucidar este efeito, este trabalho teve como objetivo comparar os resultados das dosagens de ureia e creatinina entre amostras de soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio, como forma de determinar se esses biomarcadores podem ser influenciados por estes anticoagulantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma análise quantitativa em 100 amostras de sangue de pacientes admitidos no Hospital Universitário de Juiz de Fora - HU/UFJF, de ambos os gêneros, acima de 18 anos de idade, com e sem diagnóstico de doença renal, para avaliar se havia diferenças significativas entre as concentrações de ureia e creatinina em soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio.

Os indivíduos foram selecionados a partir da solicitação médica em que constava o pedido para dosagem de ureia e creatinina séricas e que concordaram em participar da pesquisa. Foram formados dois grupos para o estudo, sendo um grupo de pacientes com valores de ureia e creatinina alterados e outro de pacientes com valores de ureia e creatinina dentro da referência. Para selecionar esses grupos foram incluídos pacientes atendidos em ambulatório, que não apresentavam dados clínicos de

doença renal, e pacientes que realizavam hemodiálise, como forma de se obterem valores dentro e fora da normalidade. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As amostras de soro foram submetidas à centrifugação a 3.400 rpm por cinco minutos, e as amostras coletadas em EDTA e citrato de sódio foram submetidas à mesma rotação por dez minutos. Em seguida foram realizadas às análises das concentrações de ureia e creatinina, em soro e plasmas. Todas as amostras foram analisadas logo após a centrifugação.

As análises de ureia e creatinina foram realizadas pelo método enzimático UV, utilizando-se o aparelho Labmax 560 do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFJF, unidade Dom Bosco. Os valores de referência empregados para ureia e creatinina foram 10 mg/dL a 45 mg/dL e 0,50 mg/dL a 1,20 mg/dL, respectivamente.

As amostras sanguíneas foram prontamente analisadas e os resultados comparados estatisticamente. Primeiramente foi realizada uma avaliação da distribuição dos dados e observou-se que os mesmos não seguiam a distribuição normal (Teste de Kolmogorov-Smirnov). Assim, optou-se para análise estatística a utilização de testes não paramétricos, como o teste de Wilcoxon pareado. O nível de significância utilizado foi de 0,05 para todas as análises.

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora, parecer número 1.460.250.

RESULTADOS

Os resultados das análises de ureia e creatinina das amostras coletadas em soro (padrão de referência) dos 100 pacientes do estudo foram comparados com os resultados das amostras coletadas em EDTA e citrato de sódio, utilizados como anticoagulantes, para avaliar se apresentavam diferenças estatisticamente significativas. Os valores de referência empregados foram os utilizados no Hospital Universitário, sendo que, para ureia e creatinina, foram 10 mg/dL a 45 mg/dL e 0,50 mg/dL a 1,20 mg/dL, respectivamente.

Os resultados das dosagens de ureia, realizadas em soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio, estão representados na Figura 1.

A partir da avaliação do gráfico Boxplot para as amostras, pode-se observar a presença de um *outlier* (paciente 52) para os três tipos de coleta, que não foi retirado para análise estatística, uma vez que é uma situação que faz parte da rotina laboratorial. Nota-se também que os valores das medianas são muito próximos entre os tipos de coleta e os resultados abaixo da mediana apresentam menor variabilidade que os resultados acima. Em relação aos resultados das dosagens, podemos perceber que os 25%

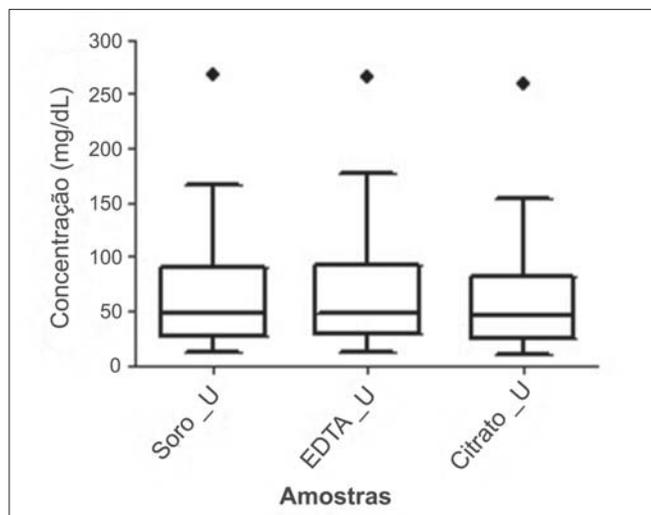


Figura 1. Apresentação dos valores referentes à dosagem de ureia em soro e plasmas de EDTA e citrato de sódio.

dos resultados, entre o primeiro quartil e a mediana, apresentam uma diferença de no máximo 21 mg/dL, já entre a mediana e o terceiro quartil podemos ter uma diferença de até 45,75 mg/dL.

Os resultados dos valores de creatinina também foram distribuídos a partir das dosagens realizadas em soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio, e estão representados na Figura 2.

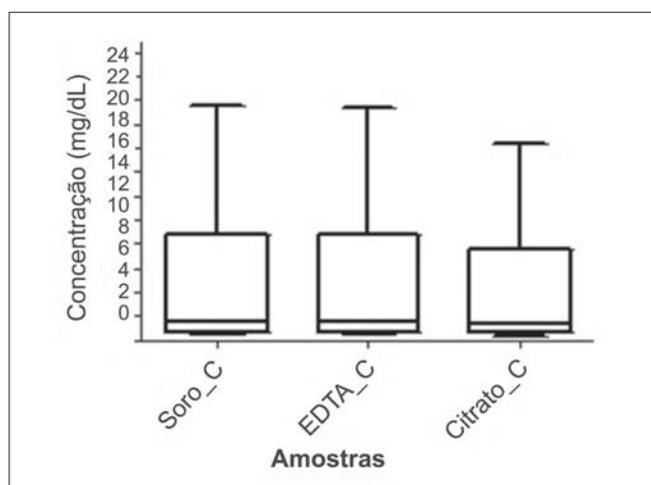


Figura 2. Apresentação de valores referentes à dosagem de creatinina em soro e plasma de EDTA e citrato de sódio.

Observa-se, a partir do Boxplot, que as medianas das dosagens de creatinina nas amostras de soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio estão próximas, e os resultados abaixo da mediana apresentam-se menor variabilidade que os resultados acima. Os resultados, entre o primeiro quartil e a mediana, apresentam uma diferença de no máximo 0,89 mg/dL, já entre a mediana e o terceiro quartil podemos ter uma diferença de até 7,22 mg/dL.

Como forma de melhor avaliar os valores mínimos e máximos e a mediana obtida nas dosagens de ureia e creatinina, foram separados em dois grupos os valores desses biomarcadores. Em um grupo foram inseridos os valores de ureia e creatinina encontrados dentro do valor de referência, e em outro grupo foram inseridos os valores de ureia e creatinina encontrados fora do padrão de normalidade. Os valores de ureia e creatinina encontrados dentro do padrão de referência estão representados, respectivamente, nas Figuras 3 e 4.

Como se observa no gráfico Boxplot da Figura 3, os valores das medianas encontradas nos três tipos de amostras estão próximos, e os resultados abaixo e acima da mediana também apresentam variabilidades semelhantes. Pode-se perceber que os 25% dos resultados, entre o primeiro quartil e a mediana, apresentam uma diferença

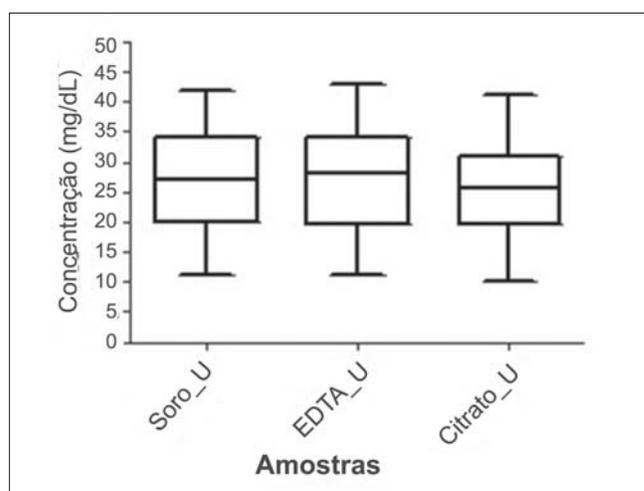


Figura 3. Apresentação dos valores referentes à dosagem de ureia, em soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio encontrados dentro do padrão de referência.

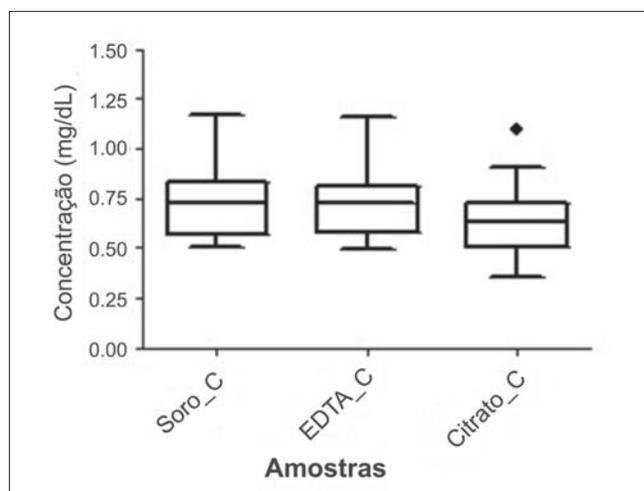


Figura 4. Apresentação dos valores referentes à dosagem de creatinina em soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio encontrados dentro do padrão de referência.

de no máximo 8,25 mg/dL, e entre a mediana e o terceiro quartil a diferença foi até 7,0 mg/dL.

Já no Boxplot da Figura 4, as medianas entre as amostras coletadas em soro e EDTA se diferenciavam minimamente da mediana das amostras coletadas em citrato de sódio. As dosagens com citrato de sódio apresentaram um resultado discrepante (paciente 20), mas que não foi retirado para análise estatística. Em relação aos resultados das dosagens, podemos perceber que os 25% dos resultados, entre o primeiro quartil e a mediana, apresentam uma diferença de no máximo 0,17 mg/dL, já entre a mediana e o terceiro quartil podemos ter uma diferença de até 0,10 mg/dL.

O outro grupo analisado, com valores de ureia e creatinina fora da normalidade, também foram representados, respectivamente, nas Figuras 5 e 6.

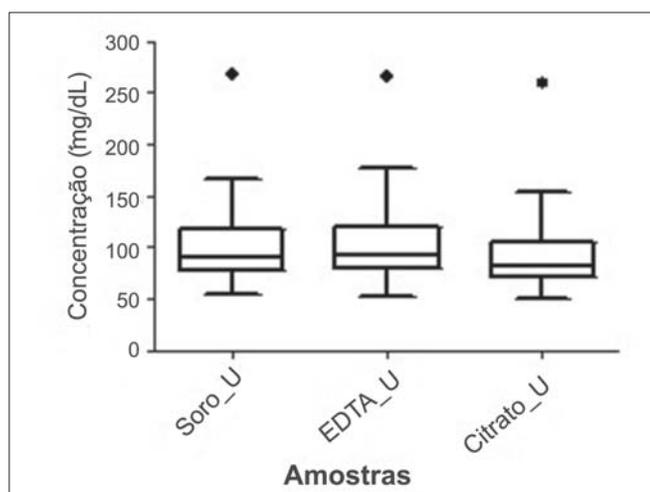


Figura 5. Apresentação dos valores referentes à dosagem de ureia em soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio encontrados fora do padrão de referência.

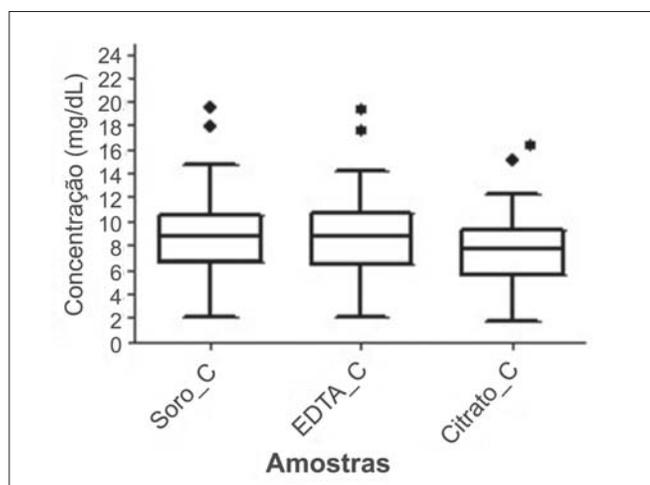


Figura 6. Apresentação dos valores referentes à dosagem de creatinina em soro e plasmas com EDTA e citrato de sódio encontrados fora do padrão de referência.

Já no Boxplot da Figura 5, as medianas entre as amostras coletadas em soro e EDTA diferenciavam-se das amostras coletadas em citrato, e os resultados abaixo da mediana apresentam menor variabilidade que os resultados acima. O paciente 52 apresentou resultado discrepante nas amostras coletadas em soro, EDTA e citrato de sódio. Em relação aos resultados das dosagens, podemos perceber que os 25% dos resultados, entre o primeiro quartil e a mediana, apresentam uma diferença de no máximo 12,75 mg/dL, já entre a mediana e o terceiro quartil podemos ter uma diferença de até 27,8 mg/d.

No Boxplot da Figura 6, as medianas entre as três amostras coletadas em soro e EDTA diferenciavam-se das amostras coletadas em citrato de sódio, e os resultados abaixo e acima da mediana apresentam variabilidade semelhante. Os pacientes 73 e 82 apresentaram valores discrepantes nas três amostras analisadas. Em relação aos resultados das dosagens, podemos perceber que os 25% dos resultados, entre o primeiro quartil e a mediana, apresentam uma diferença de no máximo 2,26 mg/dL, já entre a mediana e o terceiro quartil podemos ter uma diferença de até 1,97 mg/dL.

Para análise estatística dos dados, como os mesmos não seguiam distribuição normal ($p < 0,0001$), foi utilizado o teste de *Wilcoxon* pareado.

No primeiro momento, foi realizada uma comparação entre os valores de ureia e creatinina séricas e plasmáticas de todas as amostras (dentro e fora dos valores de referência).

Para as comparações entre amostras coletadas em soro (padrão para análise) e em anticoagulantes (EDTA e citrato de sódio), houve diferenças estatisticamente significativas tanto nas dosagens de ureia quanto de creatinina.

As dosagens de ureia quando comparado soro e EDTA ($p = 0,0016$) e quando comparado soro e citrato de sódio ($p < 0,0001$) mostraram que os anticoagulantes influenciam, pelo menos quando comparados estatisticamente, às amostras de soro nas dosagens. A mesma diferença estatisticamente significativa foi observada quando comparadas dosagens de creatinina sérica e em plasma com EDTA ($p = 0,0147$) e entre a creatinina sérica e em plasma com citrato de sódio ($p < 0,0001$), como observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparações estatísticas, pelo teste de *Wilcoxon* pareado*, entre as amostras de soro e plasma com EDTA e citrato de sódio em dosagens de ureia e creatinina

	ureia	creatinina
soro/ EDTA	$p = 0,0016$	$p = 0,0147$
soro/citrato	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

* $p < 0,05$

Em um segundo momento foram realizadas análises estatísticas em cada grupo separadamente. No grupo em que as dosagens séricas foram realizadas em pacientes com valores dentro do padrão de referência, quando comparado os valores de ureia entre as amostras de soro e plasma com EDTA, observou-se não haver diferença estatisticamente significativa ($p = 0,2618$). A mesma comparação, quando realizada entre soro e citrato de sódio, apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). Já para as dosagens de ureia de pacientes fora do padrão de referência, quando comparados estatisticamente soro e EDTA, foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0028$).

Tabela 2 - Comparações estatísticas, pelo teste de Wilcoxon pareado*, entre as dosagens de ureia em pacientes com valores dentro e fora do padrão de referência, analisando soro e plasma de EDTA e citrato de sódio

	dentro do padrão de referência	fora do padrão de referência
soro/ EDTA	$p = 0,2618$	$p = 0,0028$
soro/citrato	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

* $p < 0,05$

Ao se compararem soro e citrato de sódio para este mesmo grupo também foi encontrada diferença significativa estatisticamente ($p < 0,0001$), como mostra a Tabela 2.

A mesma comparação também foi realizada para analisar os valores de creatinina. Para os pacientes com valores dentro do padrão de referência, entre as amostras de soro e plasma foi observada diferença estatisticamente significativa nas análises de soro e EDTA ($p = 0,0170$), assim como nas análises soro e citrato de sódio ($p < 0,0001$). Na dosagem de creatinina fora do padrão de referência, quando comparados estatisticamente soro e EDTA, estes apresentavam diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0473$). O mesmo foi observado na comparação entre soro e citrato de sódio ($p < 0,0001$), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Comparações estatísticas, pelo teste de Wilcoxon pareado*, entre as dosagens de creatinina em pacientes com valores fora e dentro do valor de referência, analisando soro e plasma de EDTA e citrato de sódio

	dentro do padrão de referência	fora do padrão de referência
soro/ EDTA	$p = 0,0170$	$p = 0,0473$
soro/citrato	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

* $p < 0,05$

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliadas as concentrações séricas e plasmáticas de ureia e creatinina em 100 pacientes pelo método enzimático, assim como a literatura sugere, por ser um método que sofre menos interferências.⁽⁹⁾

Para todas as metodologias existentes há uma possibilidade de interferentes, levando assim à obtenção de resultados inadequados, no trabalho é discutida uma variável de importância determinante que é o tipo de amostra utilizada (soro e plasmas).⁽¹⁰⁾

As 100 amostras foram analisadas em conjunto e também separadas em dois grupos, um grupo com 50 pacientes com valores de ureia e creatinina séricas dentro do padrão de referência, e outro grupo com 50 pacientes com valores de ureia e creatinina séricas fora dos padrões de referência. Foram considerados como padrão os valores de 10 mg/dL a 45 mg/dL e 0,50 mg/dL a 1,20 mg/dL, para ureia e creatinina, respectivamente. Valores semelhantes ao utilizado por Almeida,⁽¹¹⁾ que relata em seu trabalho valores de referência, pelo método enzimático, entre 15 mg/dL e 39 mg/dL para a ureia e de 0,5 mg/dL a 1,2 mg/dL para creatinina.

O presente estudo comparou estatisticamente soro (padrão de análise) e plasmas com EDTA e citrato de sódio pelo método enzimático. No entanto, os trabalhos encontrados na literatura foram, em sua maioria, realizados em testes colorimétricos, o que poderia ser considerado um interferente em termos de comparação, apesar dos valores de referência para métodos enzimáticos e colorimétricos serem semelhantes.^(11,12)

Mesmo as amostras de soro serem o padrão de referência, a utilização do plasma pode ser útil por diversos motivos, como redução do tempo de espera para a coagulação, obtenção de maior volume de plasma do que de soro, ausência de interferência advinda do processo de coagulação e redução do número de tubos de coleta, em casos de coletas difíceis, tanto para pacientes internados por um longo prazo quanto para crianças em que o procedimento se torna difícil, muitas vezes, mais doloroso e desconfortável.⁽⁷⁾

Entretanto, o uso de plasmas permanece controverso na patologia clínica pelo desconhecimento sobre a interferência dos anticoagulantes nos métodos de análise. Alguns trabalhos realizados pelo método colorimétrico relatam e discutem a presença ou não de tais interferentes.

Lopes⁽¹³⁾ concluiu que o citrato de sódio interfere nas análises de ureia e creatinina quando comparadas com as realizadas em soro, porém não foram apresentados dados estatísticos que comprovem a diferença. Em nosso estudo também foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparado todos os resultados de ureia em amostras coletadas em soro e citrato de sódio ($p < 0,0001$), e entre todos os resultados de creatinina coletados em soro e citrato de sódio ($p < 0,0001$). A mesma diferença estatística foi observada quando apresentamos os resultados encontrados em dois grupos (com valores dentro da referência ou fora da referência), em que as comparações de ureia e creatinina, com valores dentro

da normalidade, entre soro e citrato de sódio apresentaram valores ($p < 0,0001$) para ureia e creatinina ($p < 0,0001$). Para as amostras com valores alterados, a comparação entre ureia sérica e em plasma com citrato de sódico apresentou ($p < 0,0001$) e entre creatinina sérica e em plasma com citrato sódico o valor de ($p < 0,0001$).

Já Saito⁽¹⁴⁾ apresentou, durante a semana de iniciação científica em Santa Catarina, um trabalho afirmando que o citrato sódico não interfere nos níveis de ureia e creatinina sanguíneo. Comprova tal situação ao afirmar que, em análise colorimétrica, esses biomarcadores, coletados em sangue de cães, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados à amostra de soro. Esses dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA, porém, os valores estatísticos não foram demonstrados no trabalho. Comparando com nosso estudo, que utilizou outra metodologia estatística (teste não paramétrico de Wilcoxon pareado), já que os dados não seguiam distribuição gaussiana, e as análises foram realizadas por técnicas enzimáticas, observamos diferenças estatisticamente significativas tanto nas comparações de ureia sérica e plasmática quanto nas comparações entre creatinina sérica e plasmática. Para as análises de ureia comparadas entre soro e citrato de sódio foi encontrado $p < 0,0001$, e para creatinina comparada entre soro e citrato, $p < 0,0001$, o que difere do estudo de Saito.

Condé,⁽¹⁵⁾ avaliando a função renal, por meio da dosagem plasmática (sem especificar o anticoagulante) de ureia e creatinina, por método colorimétrico, obteve como resultado valores mais elevados no grupo com DRC em diálise em comparação aos hipertensos sem danos renais. Afirma que os resultados encontrados nas dosagens plasmáticas são equivalentes aos resultados encontrados nas dosagens séricas, porém não apresenta dados estatísticos que comprovem essa semelhança. Em nosso estudo, realizado por método enzimático, os resultados não diferiram clinicamente, apesar da diferença estatisticamente significativa observada quando comparados resultados obtidos em soro e resultados obtidos em plasmas com EDTA e citrato de sódio, tanto no grupo de pacientes com valores normais quanto no grupo de pacientes com valores acima do padrão de referência. O único grupo que não apresentou diferença estatística foi aquele que comparou ureia entre soro e plasma com EDTA, com valores dentro do padrão da referência, no qual foi obtido $p = 0,2618$. No grupo fora do padrão de referência, os valores de ureia e plasma com EDTA apresentaram diferenças estatísticas com valor de $p = 0,028$, valor este maior que os apresentados pelo citrato sódico quando comparadas as determinações no soro.

Nos tubos de coleta utilizados (capacidade de 5 mL), o volume de EDTA está entre o intervalo de 1,2 mg a 2,0 mg por mL de sangue; já para o citrato de sódio, o intervalo é de 0,1 mol/L a 0,136 mol/L, com uma tolerân-

cia permitida de $\pm 10\%$; as concentrações utilizadas atualmente são de nove partes de sangue para uma parte de solução de citrato.⁽⁷⁾ Podemos observar nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 que os valores de ureia e creatinina nas amostras de plasmas com citrato sódico estavam sempre com resultados ligeiramente inferiores aos de soro e EDTA. Foram observados também valores de p sempre mais significativos entre soro e citrato sódico do que soro e EDTA. Uma questão possível de ser observada seria o maior volume do anticoagulante citrato de sódio no volume total da amostra.

Apesar de não haver diferença estatística no uso de EDTA para as dosagens de ureia no grupo dentro do padrão de referência, é necessário pensar que o laboratório nem sempre tem acesso ao dado clínico do paciente para observar se há ou não uma possível alteração dos valores de ureia e creatinina, e a escolha do tubo de coleta é feita antes do início da mesma. Optamos também pela análise de todos os pacientes (sem doença renal e com doença renal) de forma conjunta. Tanto nas comparações de ureia e creatinina entre soro e plasmas com EDTA e com citrato de sódio foi observada diferença estatística, o que a princípio nos levaria a afirmar que tubos contendo esses anticoagulantes interfeririam na dosagem desses biomarcadores.

Porém, analisando os resultados obtidos, de forma clínica, eles não apresentavam diferença, permitindo o uso dos mesmos na prática laboratorial.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram haver diferenças estatísticas significativas entre as dosagens realizadas em soro e plasmas de EDTA e citrato de sódio, tanto para a ureia quanto para a creatinina. Porém, a proximidade dos valores encontrados de ureia e creatinina em amostras de soro e plasmas mostrou não haver diferença que venha impactar na conduta clínica entre os mesmos. Estes, em nenhum dos pacientes alteravam a classificação dos mesmos entre dentro da faixa de normalidade e fora da faixa de normalidade. E os que estavam fora da faixa de normalidade apresentaram pequenas variações.

Abstract

Objective: This study aimed at the results of the urea and creatinine between samples serum and plasma samples with EDTA and sodium citrate as a way of determining if the biomarkers are interfering with their dosages when analyzed by plasma. **Methods:** A total of 100 patient samples admitted to the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora. Fifty patients were treated at an outpatient clinic with no history of renal disease, and 50 patients from the hemodialysis area, in order to obtain values inside and outside the hospital. Reference to urea and creatinine. All the results were compared by the paired Wilcoxon test, with a $p < 0.05$ showing statistical significance. **Results:** Statistically significant differences were observed comparing all urea values collected in serum and plasma tubes with EDTA ($p = 0.0016$), as well as the comparison between samples collected in serum and in plasma with

sodium citrate ($p < 0.0001$). The same statistically significant difference was observed when comparing all creatinine values collected in serum and plasma with EDTA ($p = 0.0147$) and between serum and sodium citrate values ($p < 0.0001$). **Conclusion:** The results showed that there are significant statistical differences between the dosages performed in serum and plasmas with EDTA and sodium citrate, both for urea and for creatinine. However, the proximity of the values of urea and creatinine found in serum and plasma samples showed no clinical difference between them.

Keywords

Biochemistry; Plasma; Serum; Laboratory test

15. Condé SAL, Fernandes N, Santos FR, Chouab A, Mota MMEP, Bastos MG. Declínio cognitivo, depressão e qualidade de vida em pacientes de diferentes estágios da doença renal crônica. *J Bras Nefrol.* 2010;32(3):242-8.

Correspondência

Daniela Marini de Andrade

Rua José Lourenço Kelmer, S/n - Martelos
36036-330 - Juiz de Fora - MG, Brasil

REFERÊNCIAS

1. Kirsztajn GM, Bastos MG, Andriolo A. Dia Mundial do Rim 2011. Proteinúria e creatinina sérica: testes essenciais para diagnóstico de doença renal crônica. *J Bras Patol Med Lab.* 2011;47(2):100-3.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Pesquisa nacional de saúde. [acesso em 15 de ago de 2015]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad98/saude/metodologia.shtm>
3. Barreto FC, Stinghen AE, Oliveira RB, Franco AT, Moreno NA, Barreto DV. Em busca de uma melhor compreensão da doença renal crônica: uma atualização sobre toxinas urêmicas. *J Bras Nefrol.* 2015;36(2):221-35.
4. Bastos MG. Biomarcadores de função renal na DRC [Internet]. *Soc Bras Nefrol.* 2011. Available at: <http://www.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>
5. da Silva MMH, Brune MFSS. Importância do cálculo da taxa de filtração glomerular na avaliação da função renal de adultos. *Rev Bras Farm.* 2011;92(3):160-65.
6. Sodrê FL, Costa JCB, Lima JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43(5):329-37.
7. SBPC/ML- Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial - Coleta e preparo de amostras biológicas, 2014. Disponível em: www.sbpc.org.br/. Acesso em: 20 fevereiro 2017.
8. LABTEST diagnósticos SA [homepage na internet]. Reagentes [acesso em jul 2016]. Disponível em: <http://www.labtest.com.br/reagentes#>
9. Delanaye P, Cavalier E, Cristol JP, Delanghe JR. Calibration and precision of serum creatinine and plasma cystatin C measurement: impact on the estimation of glomerular filtration rate. *J Nephrology.* 2014;27(5):467-75.
10. Dimeski G, Badrick T, John AS. Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences a review. *Clin Chim Acta.* 2010;411(5-6):309-17.
11. de Almeida, ML. Dosagens de ureia e creatinina em soro humano através da técnica de espectroscopia raman comparada com o método bioquímico. Programa de pós-graduação em bioengenharia, Universidade Camilo Castelo Branco; 2014.
12. Mizoi CS, Dezoti C, Vattimo MDFF. Função renal de pacientes de unidade de terapia intensiva: creatinina plasmática e proteína carreadora do retinol urinário. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2008;20(4):385-93.
13. Lopes ECP, Paim LR, Nunes LAS, El Khatib S. Avaliação da interferência do anticoagulante citrato de sódio na determinação de biomarcadores bioquímicos. *NewsLab.* 1012:116-22.
14. Saito EM, Lovatel M, Volpato J, Mattoso CRS, Costa A, Weinert NC, et al. Efeito do uso de diferentes anticoagulantes na rotina clínica para avaliação de perfil bioquímico em cães. In: Anais do 25º Seminário de iniciação científica Universidade federal de Santa Catarina, 2015 out 21-22-23; Santa Catarina: [evento na internet], Brasil.

Estabilidade de antígenos eritrocitários humanos para controle interno da qualidade imunohematológico

Stability of human erythrocyte antigens for immunohematological Internal Quality Control

Bruna Sutter¹

Marcella Pereira Paulo²

Cristine Valença Bordini³

Daiane Cobiانchi da Costa⁴

Alexandre Geraldo⁵

Resumo

Objetivo: Determinar a estabilidade dos antígenos eritrocitários do Sistema ABO, Rh e Ag Kell, a fim de estabelecer a temporalidade de armazenamento de amostras *in natura* e sem conservantes para uso no Controle Interno de Qualidade (CIQ) dos testes imunohematológicos. **Métodos:** Foram coletadas 20 amostras contendo EDTA e realizada a detecção dos antígenos A, B, RhD, RhC, RhE, Rhe, Rhc, Kell (K1) através do uso de anticorpos monoclonais. Os testes de hemólise através da inspeção visual da suspensão de eritrócitos foram executados no primeiro dia de coleta. Os mesmos testes foram repetidos após os 5º, 13º, 15º, 21º, 37º, 50º e 77º dia da coleta, sendo observados a intensidade de hemaglutinação e o grau de hemólise. **Resultados:** Dentre as 18 amostras, 55,6% foram classificadas como A RhD Positiva, 5,6% AB RhD Positiva, 38,8% O RhD Positiva e nenhuma do grupo B RhD Positiva, tendo sido duas amostras excluídas do estudo por não apresentarem o Ag RhD. Detectaram-se 61% de Ag RhC nas amostras estudadas, 77,7% de Rhc, 38,8% de RhE, 88,9% de Rhe e 11,1% de Kell. No 77º dia foi observada uma maior diminuição na intensidade da hemaglutinação para os antígenos Rhe, RhC e RhD, respectivamente, não sendo observada esta diminuição para os demais antígenos detectados. A partir do 37º dia de coleta foi observada hemólise em todas as amostras coletadas. **Conclusão:** Amostras *in natura* com EDTA por até 21 dias após a coleta não tiveram diminuição na intensidade da hemaglutinação e hemólise representativa. São necessários demais estudos de estabilidade para outros antígenos eritrocitários.

Palavras-chave

Eritrócitos; Controle da Qualidade; Reatividade-Estabilidade; Antígenos de Grupos Sanguíneos

INTRODUÇÃO

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária. Esses antígenos são herdados geneticamente e definidos por sequências específicas de aminoácidos, constituindo proteínas que podem ou não estar ligadas a carboidratos ou a lipídios.⁽¹⁻³⁾

De acordo com a nomenclatura da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), estão descritos mais de 328 antígenos eritrocitários, distribuídos em 36 sistemas de grupos sanguíneos. Esses números não são estáticos e novos antígenos de grupos sanguíneos estão sendo identificados periodicamente.^(4,5)

Dentre os sistemas já descritos é possível destacar o sistema ABO, Rh e Kell como os de grande importância clínica e estes serão brevemente explanados a seguir. O Sistema ABO, cujos antígenos não estão restritos apenas à membrana dos eritrócitos, são moléculas complexas presentes também em glicolipídios e glicoproteínas membranares.^(1,2) A expressão dos antígenos do Sistema ABO depende da atividade de glicosiltransferases específicas codificadas pelo gene ABO.⁽⁴⁾

O Sistema de grupo sanguíneo Rh é o mais polimórfico, composto por 54 antígenos de natureza glicoproteica com importante papel na integridade da membrana eritrocitária, possuindo função estrutural e de transporte de gases.^(3,6)

¹Biomédica. Universidade do Vale do Itajaí – Univali – Itajaí - SC, Brasil.

²Graduanda em Biomedicina – Universidade do Vale do Itajaí – Univali – Itajaí - SC, Brasil.

³Farmacêutica. Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Vale do Itajaí. Universidade do Vale do Itajaí – Univali Itajaí - SC, Brasil.

⁴Biomedicina – Universidade de Marília, Doutorado em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis - SC, Brasil.

⁵Farmacêutico Bioquímico. Mestrado em Farmácia Análises Clínicas pela Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis - SC, Brasil.

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí – Univali – Itajaí - SC, Brasil.

Artigo recebido em 12/08/2016

Artigo aprovado em 02/05/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700527

Dentre esses, apenas cinco antígenos possuem importância clínica pelo fato de estarem envolvidos com formas clinicamente significantes da Doença Hemolítica do Feto e Recém-nascido e reação transfusional (RhD, RhC, RhE, Rhc, Rhe), sendo o antígeno RhD o mais importante, devido ao seu alto grau de imunogenicidade.^(4,7)

O Sistema Kell é composto por antígenos glicoproteicos com função enzimática e estão expressos nos eritrócitos com baixa densidade antigênica. Estes estão expressos na glicoproteína Kell, que pertence à subfamília das endopeptidases zincodpendentes, cuja principal função é a ativação de peptídeos bioativos por clivagem enzimática; estes antígenos estão bem desenvolvidos ao nascimento e estão presentes no cérebro, órgãos linfoides, coração e músculos esqueléticos.⁽²⁻⁴⁾ Com a instituição rotineira do pré-natal e prevenção de aloimunização em gestantes RhD negativas, tem-se observado um aumento da frequência de casos de DHFRN por anti-K1.⁽²⁾

Os aloanticorpos contra antígenos dos demais sistemas de grupos sanguíneos, além do ABO são produzidos em resposta a uma sensibilização que pode ser em uma transfusão, aborto ou gravidez, devido à exposição do indivíduo a um antígeno eritrocitário diferente dos seus. Esses são capazes de desenvolver reações hemolíticas como na incompatibilidade transfusional, incompatibilidade materno-fetal, e anemia hemolítica autoimune.^(2,8)

O uso de amostras controle no Controle de Qualidade Interno (CQI) contendo antígenos ABO, RhD, RhC, RhE, Rhc, Rhe e K (Kell (K1) se faz necessário no laboratório de análises clínicas de acordo com o que é preconizado pela legislação vigente (RDC 302 de 15 de Outubro de 2005), com o objetivo de avaliar a estabilidade dos reagentes imunohematológicos.⁽⁹⁾

A obtenção de amostras controle é relevante para a validação de técnicas como também para verificar a reprodutibilidade dos resultados liberados. O emprego de amostras controle, bem como de outras medidas de CQI e externo em Laboratórios de Análises Clínicas é pertinente para avaliar constantemente a variabilidade das determinações e a confiabilidade dos resultados. Tais fatores contribuem para um diagnóstico mais preciso e eficiente, bem como para uma melhoria na qualidade dos produtos e serviços oferecidos pelos laboratórios clínicos.⁽¹⁰⁻¹³⁾

Os eritrócitos produzidos comercialmente para emprego nos testes imunohematológicos têm validade de até 35 dias. Essas suspensões de eritrócitos fenotipados são produzidas a partir de amostras de sangue humano,⁽¹⁴⁾ que durante a conservação dos eritrócitos podem sofrer as chamadas lesões de estoque. Essas lesões são alterações bioquímicas que ocorrem no eritrócito, tais como deformidade na membrana, alterações no metabolismo e hemólise, que podem levar a modificações no resultado dos exames

e gerar resultados falsos negativos.^(12,15,16) Nesse sentido, o aperfeiçoamento de técnicas de avaliação da estabilidade de eritrócitos que sejam efetivas e que possam manter sua viabilidade e função representa uma necessidade na área da imunohematologia, a fim de possibilitar a realização de exames laboratoriais e controle de qualidade, fornecendo subsídios para diagnóstico e prevenção.⁽¹²⁾

A obtenção de suspensões de eritrócitos estáveis que mantenham todas as suas características físico-químicas e morfológicas pode proporcionar melhorias na qualidade de serviços de imunohematologia, visto que essas mantêm o Potencial Zeta ideal para proporcionar a hemaglutinação nos testes imunohematológicos.^(2,12) Portanto, o estudo da estabilidade de antígenos eritrocitários em amostras utilizadas no CQI se faz necessário para melhorar a qualidade dos produtos oferecidos pelos laboratórios de análises clínicas, de forma que os serviços prestados possam ser precisos e confiáveis. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade dos principais antígenos eritrocitários do Sistema ABO (A e B), do Sistema Rh (RhD, RhC, Rhc, RhE, Rhe) e Kell (K) para o uso destas amostras sem o uso de conservantes eritrocitários no CQI dos exames laboratoriais imunohematológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) sob parecer 1.259.259 e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes do Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC), foram coletadas aleatoriamente as vinte amostras de indivíduos de ambos os sexos com volume de 4 mL de sangue venoso anticoagulado com EDTA, sem uso de conservantes preservadores de eritrócitos.

Foram incluídas no estudo amostras de indivíduos com idade entre 18 e 65 anos e excluídas amostras de indivíduos portadores do fenótipo RhD Negativo e TAD Positivo, sendo que, para esse teste, foram utilizados antiglobulinas humanas e reagentes de hemácias da BioRadLaboratories®.

Após a coleta das amostras, estas foram avaliadas através da inspeção visual de hemólise e detecção dos antígenos eritrocitários pela fenotipagem eritrocitária utilizando anticorpos monoclonais (FreseniusKabi®) para os antígenos A, B, RhC, RhE, Rhe, Rhc, K e para a fenotipagem RhD o uso de anticorpos monoclonais (BioRadLaboratories®) no primeiro dia de coleta e nos dias 5, 13, 15, 21, 37, 50 e 77 posteriores à coleta.

As amostras coletadas foram armazenadas *in natura*, sem adição de conservantes, visando a diminuição de custos para o CQI e avaliação da estabilidade des-

tes antígenos. As amostras foram armazenadas no refrigerador do Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC) da Univali e, durante seu armazenamento, foi monitorada à temperatura de 4° a 6°C visando preservar as amostras em temperaturas adequadas conforme legislação vigente.⁽¹⁷⁾

Os testes executados de forma singular (e não em duplicata) foram realizados em temperatura ambiente (20° a 24°C) no 1°, 5°, 13°, 15°, 21°, 37°, 50° e 77° dia. Os testes foram executados, sendo a leitura dos resultados realizada imediatamente, conforme instruções dos fabricantes.

Para a realização dos testes imunohematológicos não foi realizada em paralelo amostra controle comercial para a validação dos experimentos, visto que, conforme a literatura, há subgrupos sanguíneos que podem diminuir significativamente a expressão antigênica dos antígenos eritrocitários.^(1,2) Visto assim, em amostras controle (no qual possuem conservantes estabilizadores de eritrócitos) estas não mimetizam a amostra coletada originalmente neste experimento (*in natura*). Desta forma, não foi necessário realizar testes em duplicatas, visto que este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade das amostras de acordo com o grau de hemaglutinação preconizado por testes qualitativos padronizados com uso de equipamentos, materiais e insumos validados seguindo os critérios mínimos de intensidade da Portaria Ministerial 158 de 2016 e artigo científico.⁽¹⁷⁾

As intensidades mínimas da hemaglutinação esperadas para os antígenos A, B e RhD foram de no mínimo 3+, conforme descrito na literatura.⁽¹⁷⁾ Para os antígenos RhC, RhE, Rhe, Rhc e K não há artigos científicos preconizando sua intensidade mínima devida à variação antigênica entre indivíduos.^(1,2) Desta forma, este trabalho teve como critério a adesão de intensidade mínima de hemaglutinação de 3+ por ser uma intensidade de fácil visualização na técnica em tubo.

Fenotipagem ABO

Para a determinação do fenótipo ABO foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 3% em solução salina (NaCl 0,9%), e aos tubos identificados como A, B e AB foram adicionados 50 µL desta suspensão. Posteriormente, a cada tubo foram adicionados 50 µL dos respectivos antissoros monoclonais antiA, antiB, antiAB da FreseniusKabi® e, após homogeneização dos tubos, estes foram centrifugados a 2.326 g (sendo que g é a força centrífuga relativa) por 15 segundos e então submetidos a leitura.

A técnica em tubo seguiu o padrão de leitura da intensidade da reação de 0 (Negativo) a 4+ (Positivo) conforme Judd.⁽¹⁸⁾

Fenotipagem, RhC, RhE, Rhe, Rhc, K

Para a identificação dos principais antígenos do Sistema Rh foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 3% em solução salina (NaCl 0,9%), e a cada tubo identificado como RhC, RhE, Rhe, Rhc, K foram adicionados 50 µL desta suspensão. Posteriormente, a cada tubo foram adicionados 50 µL dos respectivos antissoros monoclonais Fresenius Kabi® e, após a homogeneização da reação, foram centrifugadas as reações a 2.326g por 15 segundos e então realizada a leitura.⁽²⁰⁾ A técnica em tubo seguiu o padrão de leitura da intensidade da reação conforme Judd.⁽¹⁸⁾

Fenotipagem RhD

Para realização da fenotipagem RhD em tubo, foi preparado uma suspensão de eritrócitos a 3% em solução salina (NaCl 0,9%) e, posteriormente, aos dois tubos identificados como D e Controle de Rh foram adicionados 50 µL da suspensão. Foram adicionados 50 µL de antiD BioRad Laboratories® e 50 µL do Controle do Rh BioRad Laboratories® nos respectivos tubos e, após homogeneização da reação, estas foram centrifugadas a 2.326 g por 15 segundos para leitura das reações. No caso das leituras negativas foi realizada a Pesquisa do Antígeno D Fraco, conforme preconizado pela legislação em vigor.⁽¹⁷⁾ Para a pesquisa de D fraco, as amostras negativas ou com intensidade de hemaglutinação $\leq 2+$ foram incubadas a 37°C por vinte minutos e então lavadas por três vezes com solução de NaCl a 0,9%. Às soluções lavadas foram adicionados 100 µL de soro de Coombs antiIgG BioRad Laboratories® e então foram centrifugadas por 15 segundos a 2.326 g.

Foi realizada posteriormente a leitura visualizando a presença ou a ausência de hemaglutinação. Em caso de não hemaglutinação foram adicionados 50 µL de hemácias para Controle CoombsBioRad Laboratories®, os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 15 segundos a 2.326 g e então realizada a leitura de acordo com Judd.⁽¹⁸⁾

Teste de Antiglobulina Direto

O Teste de Coombs Direto (TAD) foi realizado de acordo com Roback e colaboradores.⁽²⁾ Os eritrócitos das amostras coletadas foram lavados três vezes em solução salina (NaCl 0,9%) e posteriormente preparada uma suspensão de eritrócitos a 3% em NaCl 0,9%. Aos tubos identificados (IgG, Poli) foram acrescentados 50 µL de suspensão de eritrócitos e 100 µL do soro antiglobulina correspondente a cada tubo (Soro Antiglobulina Humana Monoespecífica IgG BioRadLaboratories® e Soro

Antiglobulina Humana Poliespecífica IgG+C3d BioRad Laboratories®) respectivamente. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 2.326 g por 15 segundos. A técnica em tubo seguiu o padrão de leitura da intensidade da reação conforme Judd.⁽¹⁸⁾ No caso de resultados negativos, a reação permaneceu incubada por cinco minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foi centrifugada à força de 2.326 g por 15 segundos, sendo realizada uma nova leitura das reações.

Os resultados negativos foram confirmados com adição do controle de Coombs BioRad Laboratories®, centrifugando e observando a hemaglutinação, conforme descrito por Judd.⁽¹⁸⁾

Hemólise

O teste de hemólise foi realizado mediante a inspeção visual. As suspensões de eritrócitos 3% foram centrifugadas a 2.326 g por 45 segundos.⁽¹⁸⁾ Em seguida, foi observado o sobrenadante da suspensão, visualizando a presença (sobrenadante rosado ou avermelhado) ou ausência de hemólise (sobrenadante límpido), conforme Portaria 158 de 2016.⁽¹⁷⁾

RESULTADOS

Dentre as vinte amostras coletadas, duas (10%) foram excluídas por apresentarem resultado RhD negativo e nenhuma amostra analisada apresentou resultado positivo para o TAD. Sendo assim, o estudo deu continuidade na avaliação da estabilidade dos antígenos eritrocitários com 18 amostras.

Do total das 18 amostras, 11 (55,6%) eram do A RhD Positivo, uma (5,6%) AB RhD Positivo, sete (38,8%) O RhD Positivo e nenhuma amostra possuía o fenótipo B RhD Positivo. O número absoluto e o percentual de amostras, respectivamente, contendo o antígeno RhC foi de 11 (61%), Rhc 14 (77,7%), RhE 7 (38,8%), Rhe 16 (88,9%) e K 2 (11,1%).

Em todas as amostras classificadas como A RhD Positivo, pôde-se observar que a intensidade de hemaglutinação de 4+ entre o antígeno A e o anticorpo monoclonal AntiA se manteve constante ao longo dos 77 dias. Em uma amostra (AB RhD Positiva), essa manteve a intensidade de hemaglutinação entre o antígeno B e o anticorpo monoclonal AntiB constante de 4+ até o 77º dia.

O antígeno RhD apresentou variação na intensidade das reações ao longo dos 77 dias. Do total de amostras, uma (5,55%) apresentou diminuição na intensidade da hemaglutinação a partir do 50º dia. As demais amostras apresentaram variação de 4+ e 3+ entre os 1º e 77º dia.

Para o antígeno RhC, não foi observada variação de intensidade em dez (90,9%) das 11 amostras entre os dias 1º ao 77º, sendo o percentual da diminuição da amostra apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Números absolutos de amostras que sofreram diminuição de intensidade de hemaglutinação e seu respectivo percentual de acordo com a presença deste antígeno nas amostras analisadas do 1º ao 77º dia

Antígeno	Número absoluto da amostra e seu respectivo percentual
RhD	1 (5,5%)
RhC	1 (9,1%)
Rhe	7 (43,8%)

Dentre as dez amostras que não sofreram diminuição na intensidade da hemaglutinação, no 37º dia houve a observação de que uma amostra apresentou intensidade de 2+. Contudo, a mesma amostra voltou a apresentar intensidade de 3+ e 4+ nos 50º e 77º dias, respectivamente. Assim, essa amostra não foi considerada rejeitada pelos pesquisadores, visto que pode ter ocorrido excesso de homogeneização no 37º dia. Assim, dentre as 11 amostras que possuíam o antígeno RhC, uma amostra sofreu diminuição na intensidade da reação antígeno-anticorpo no 77º dia de 4+ para 2+.

Ao avaliar a estabilidade dos antígenos Rhc e RhE ao longo dos 77º dias, a intensidade de aglutinação se manteve em 100% das amostras, tendo variações entre 3+ e 4+ durante a interpretação da intensidade da hemaglutinação ao longo dos dias.

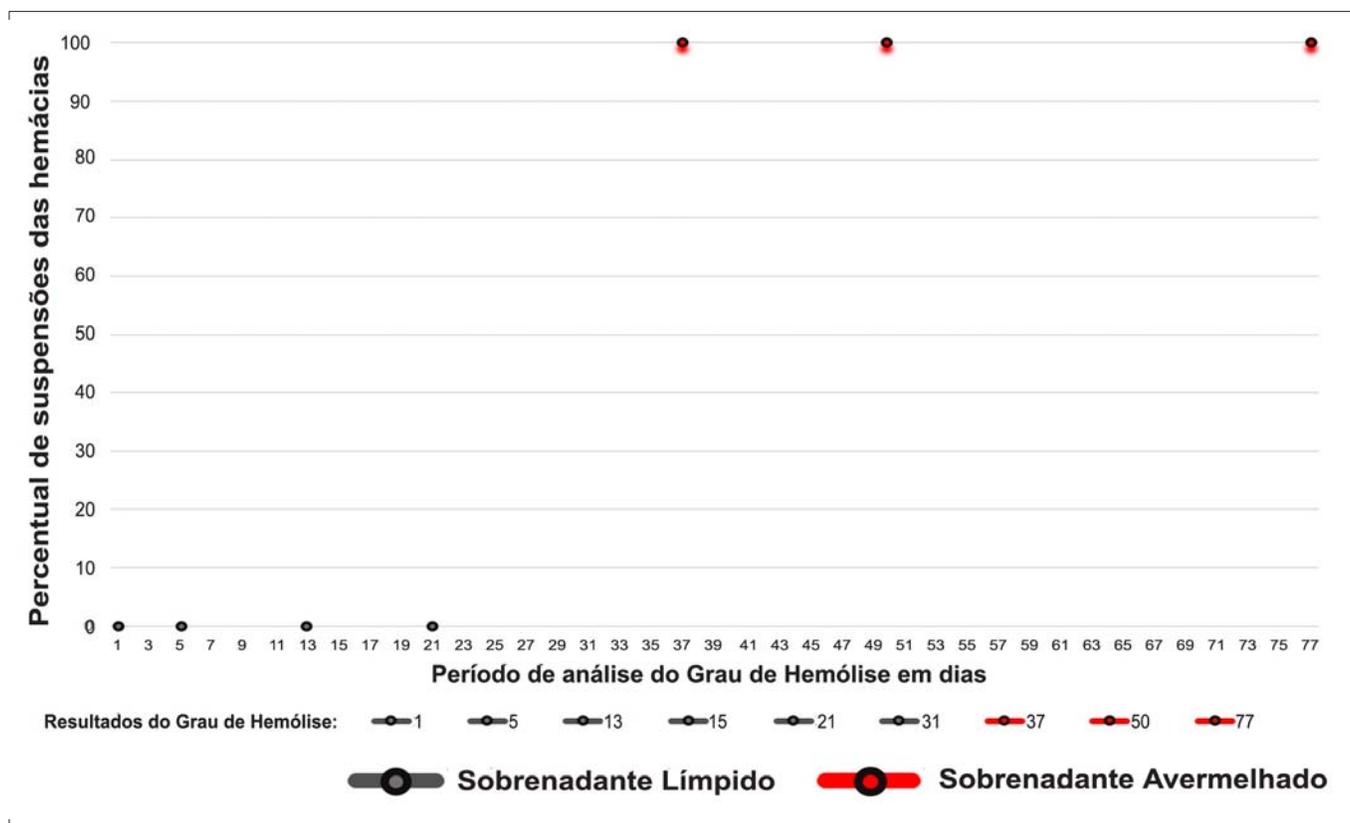
Houve uma maior diminuição na estabilidade dos antígenos Rhe durante o estudo conforme descrito na Tabela 1.

Dentre as 16 amostras, nove (56,2%) se mantiveram constantes ao longo dos testes. Destacando que sete amostras apresentaram intensidade de 2+ somente no 77º dia da pesquisa.

Apenas duas amostras continham o antígeno K e estas demonstraram intensidade entre 4+ e 3+ do primeiro dia de análise até o 77º dia. Contudo, uma amostra no 13º dia apresentou intensidade de 2+, voltando a apresentar intensidades entre 4+ e 3+ nos dias posteriores. Desta forma, essa amostra não foi considerada rejeitada pelos pesquisadores, visto que pode ter ocorrido excesso de homogeneização no 13º dia.

Ao analisar a Figura 1 o grau de hemólise das Suspensões de Hemácias a 3% foi evidenciado que no 1º, 5º, 13º e 21º dias de análises (marcadores em cinza) estas não apresentaram hemólise.

A partir do 37º dia (marcadores em vermelho) pôde-se observar presença de hemólise avermelhada em 100% das amostras.



DISCUSSÃO

O desenvolvimento de estudos para o uso de eritrócitos fenotipados em técnicas de CQI de forma eficiente, em que os antígenos eritrocitários tornam-se estáveis por longos períodos, é relevante.⁽¹²⁾ A elaboração destes estudos deve levar em consideração antígenos transmembranares, de superfície e/ou adsorvidos à membrana.^(1,2) É necessário o desenvolvimento de metodologias que visem aumentar o tempo de estabilidade dos antígenos em relação às suspensões de eritrócitos disponíveis comercialmente ou *in house*, podendo contribuir para melhorar a qualidade de serviços em análises clínicas durante a execução dos exames imunohematológicos.⁽¹²⁾

O armazenamento de eritrócitos resulta no aumento de hemólise, sendo este um parâmetro importante para avaliar a qualidade dos eritrócitos armazenados.⁽¹⁹⁾ Com o armazenamento também poderá ocorrer uma redução nos níveis de adenosina trifosfato (ATP), sendo este necessário para a proteção da forma e estabilidade da membrana dos eritrócitos. Eventualmente, estas alterações causam redução na viabilidade dos eritrócitos.^(20,21) O grau de hemólise dos eritrócitos durante a preservação constitui-se um fator limitante para o tempo de armazenamento, e autores têm considerado a taxa de hemólise espontânea como marcador fundamental da preservação.^(11,12)

A partir da análise dos resultados, foi possível observar que 100% das amostras começaram a apresentar hemólise a partir do 37º dia. Pesquisas anteriores mostram baixos índices de hemólise, com valores inferiores a 2% após 60 dias de preservação em meio de conservação de eritrócitos (CE) (meio contendo Na₂HPO₄ 8 mmoles/L, glicose 20 mmoles/L, EDTANA₂ 1 mmol/L, KCl 8 mmoles/L, NaCl 75 mmoles/L, citrato de sódio 40 mmoles/L e albumina bovina (AB) 6 g/L), e de menos de 1% após 90 dias de preservação de eritrócitos em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído.⁽⁸⁾ No presente estudo não foi observada interferência da hemólise na diminuição da intensidade de hemaglutinação, porém foi evidenciado que, após o dia 21, a hemólise era observada visualmente e, por consequência disso, pode ocorrer a diminuição de antígenos na suspensão de hemácias e essa diminuição interfere diretamente na reação antígeno-anticorpo.⁽²⁾

De acordo com Sallem, foi possível manter os antígenos eritrocitários A, B, D, C, c, E, e, K estáveis por 63 dias em solução CE, sendo que alguns deles apenas diminuíram a sua intensidade de hemaglutinação ao longo dos 63 dias.⁽¹²⁾ No presente estudo foi possível observar que a intensidade dos antígenos A e B foram constantes ao longo de 77 dias sem o uso de conservantes de eritrócitos, sendo que estes mantiveram a intensidade de hemaglutinação de 4+ do primeiro ao último dia de análise.

Para a aprovação de reagentes imunohematológicos quanto à reatividade, os antígenos A e B precisam ter reatividade mínima de 3+, o que condiz com o encontrado neste trabalho.⁽¹⁷⁾ Esta intensidade constante pode estar relacionada com a alta densidade antigênica do Sistema ABO, no qual a hemólise observada nesses dias não seria suficiente para interferir nos testes imunohematológicos.⁽¹⁾

Os estudos de Myhre e colaboradores mostram que não há nenhuma mudança significativa nos antígenos do Sistema ABO e Rh (C, c, E, e) durante o armazenamento, de 21 a 42 dias, com qualquer um dos sistemas de conservação de anticoagulantes testados por eles (citrato-fosfato-dextrose, fosfatocitrato de dextrose-adeninaona, citratofosfatodextrose com aditivo salinoadeninaglicose e um sistema de citrato fosfato dupla de dextrose com aditivo de solução de glucose e solução salina tamponada com adenina).⁽²²⁾ Nesse mesmo estudo foi observado que apenas o antígeno RhD teve alteração na reatividade e em poucos casos houve mudanças individuais mudando de 4+ para 3+.⁽²²⁾ Esses dados corroboram o presente estudo, ainda que, sem uso de conservantes de eritrócitos, se observou apenas que uma amostra sofreu redução na intensidade de hemaglutinação de 2+. Vale ressaltar que a expressão do antígeno RhD de um indivíduo pode variar qualitativa ou quantitativamente devido a mutações no gene RHD.⁽²⁾ A quantidade de sítios antigênicos expressos por eritrócitos também é diferente para cada indivíduo, visto que esta expressão está envolvida com os demais fenótipos do Sistema Rh. Contudo, todos os eritrócitos possuem a mesma quantidade de antígenos expressos. A densidade antigênica do antígeno RhD varia de 10.000 a 25.000 sítios por eritrócitos.⁽²⁾ No presente estudo, diferentes amostras apresentaram reação de intensidade inicial de 3+ e ao final do estudo aumentaram a intensidade para 4+. Essas mudanças podem estar relacionadas também com homogeneização excessiva, que destaca a possibilidade de resultados falsos negativos ou diminuição na intensidade das reações na fase de leitura devido à agitação excessiva, já que os testes em tubos são subjetivos e dependem do desempenho e habilidade do operador.⁽²³⁾

Pesquisadores estabeleceram requisitos mínimos esperados na inspeção de qualidade dos soros identificadores de antígenos eritrocitários que o antígeno RhC tenha reatividade mínima de 3+ e o antígeno Rhc 1+.⁽²⁴⁾ De acordo com esses dados, todas as amostras que continham o antígeno Rhc se mostraram em conformidade, apresentando os requisitos mínimos. Já para o antígeno RhC, apenas 9,1% das amostras não apresentaram o valor mínimo esperado, tendo diminuído sua intensidade de hemaglutinação para 2+ no 77º dia. Os antígenos RhC e Rhc estão localizados em duas proteínas expressas na membrana dos eritrócitos e possuem menor expressão

que o antígeno RhD, o que pode justificar a variação encontrada.⁽¹⁾

São requisitos mínimos para a aprovação de reagentes imunohematológicos quanto à reatividade, que o antígeno RhD tenha intensidade de 3+.⁽²⁴⁾ Segundo a legislação hemoterápica, o serviço de hemoterapia deve realizar controles de qualidade de reagentes em imunohematologia, sendo que a intensidade mínima esperada para o reagente RhD é de 3+.⁽¹⁷⁾ Embora os Laboratórios de Análises Clínicas não possuam critérios mínimos de aprovação através da RDC 302, os resultados encontrados neste estudo demonstram a importância desta avaliação da estabilidade dos antígenos no CQI utilizando amostras sem uso de conservantes, avaliando assim a estabilidade dos mesmos.

Embora o antígeno RhE seja antígeno transmembranar e possuir uma diferença do antígeno RhD de aproximadamente 39 aminoácidos, neste estudo não foram evidenciadas alterações na estabilidade do antígeno RhE. Os resultados corroboram aos de Novaretti e colaboradores na inspeção de qualidade, visto que o mesmo necessita ter reatividade mínima de 3+.⁽²⁴⁾ Já o antígeno Kell (K1), que não teve alterações na reatividade dos eritrócitos, apenas uma amostra apresentou decréscimo de 4+ para 3+. No entanto, essa diminuição não faz com que as amostras entrem em não conformidade, já que elas precisam ter reatividade mínima de 1+ para aprovação na inspeção de qualidade.⁽²⁴⁾ Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes com os encontrados por Sallem,⁽¹²⁾ onde houve decréscimo de 1+ na reatividade do antígeno Kell (K), amostras que iniciaram com 3+ apresentavam 2+ ao final de 63 dias e amostras com 4+ apresentavam 3+. Contudo, quando avaliado o antígeno Rhe, foi evidenciada uma diminuição representativa da estabilidade e capacidade de detecção do antígeno Rhe. O decréscimo de intensidade foi de 4+ nos dias iniciais do estudo. Ao final do 77º dia, 50% das amostras continuaram em conformidade. Porém, este estudo não utiliza conservantes de eritrócitos, o que pode justificar um maior percentual para este antígeno transmembranar. A homogeneização excessiva pode ter relação com essa diminuição de intensidade de hemaglutinação, já que, para Rumsey, os testes manuais são menos precisos e aumentam a subjetividade dos resultados.⁽²⁵⁾

Os conservantes de eritrócitos podem auxiliar na estabilidade dos antígenos por um período maior. Um estudo que utilizou conservante de eritrócitos e que estabeleceu reatividade mínima de 1+ obteve resultados que contrapõem aos evidenciados neste estudo, sem uso de conservantes. O antígeno Rhe com uso de conservantes pode ter reatividade média de 4+ por 63 dias.⁽¹²⁾ Outros pesquisadores, ao avaliarem a estabilidade de antígenos de outros grupos sanguíneos (Luhtran e Diego), obtiveram resultados de esta-

bilidade desses antígenos de até 120 dias. Contudo, pesquisadores utilizaram metodologias de criopreservação, nas quais, os resultados utilizando criopreservadores de eritrócitos evitaram a diminuição dos níveis de expressão dos antígenos estudados. Frequentemente é observada, após ciclos de congelamento e descongelamento, a diminuição da expressão antigênica dos mesmos. Por fim, os autores concluíram que as células estabilizadas podem ser armazenadas e transportadas a um menor custo e risco, em comparação com as células criopreservadas.⁽²⁶⁾

Existe a necessidade de desenvolvimento de técnicas efetivas para preservação de eritrócitos que man-tenham *in vitro* a viabilidade, a fim de possibilitar a realização de exames laboratoriais e controle de qualidade, fornecendo subsídios para diagnóstico, prevenção e conduta em casos de sensibilização associados à transfusão, gestação e transplante de órgãos.⁽¹³⁾ Desta forma, a partir de resultados de pesquisas sobre estabilidade dos eritrócitos sem uso de conservantes, foi possível manter as amostras com antígenos eritrocitários A, B, RhD, RhC, Rhc, RhE, Rhe, K estáveis até 77 dias. Esse estudo pode contribuir para o controle de qualidade interno imunohematológico, assegurando resultados mais fidedignos e trazendo uma alternativa às suspensões de eritrócitos fenotipados disponíveis comercialmente. Novos métodos de análise envolvendo nanocristais de semicondutores, como sondas fluorescentes, têm sido utilizados na Imunohematologia para avaliar a estabilidade dos antígenos eritrocitários.⁽²⁷⁾ É importante avaliar a estabilidade de antígenos eritrocitários de outros sistemas de grupos sanguíneos. Esses estudos são de suma importância, visto que antígenos eritrocitários do sistema de grupo sanguíneo I, Lewis e P1pK são adsorvidos na membrana do eritrócito. Assim, ao longo do tempo de armazenamento de reagentes eritrocitários, mesmo contendo conservantes de eritrócitos, esses antígenos podem ser removidos da membrana eritrocitária, ocasionando resultados falsos-negativos na detecção de anticorpos irregulares.^(1,15,20) Assim como, são necessários estudos para avaliar a estabilidade do antígeno RhD com outros clones de anticorpos utilizados nesse estudo. Esses estudos são importantes, uma vez que observamos variações na intensidade de hemaglutinação ao longo do estudo. Essas alterações podem estar associadas à avidéz dos clones de anticorpos anti-RhD utilizados na rotina laboratorial.^(17,23,25)

CONCLUSÃO

Para laboratórios clínicos que possuem recursos financeiros escassos é viável manter amostras de antígenos eritrocitários (A, B, RhD, RhE, Rhe, RhC, Rhc, K (K1)) armazenado por até 21 dias em geladeira (4 - 6°C), para uso no CQI imunohematológico, visto que a partir desta

data foi observada a presença de hemólise nas amostras, embora as intensidades de hemaglutinação tenham ficado dentro dos requisitos legais.

Reforça-se a importância da análise da hemólise apresentada nas amostras, embora não tenham interferido no decréscimo de intensidade de hemaglutinação das amostras, sendo que muitas delas mantiveram seu grau de hemaglutinação mesmo após a constatação de hemólise.

A hemólise, apesar de não ser um interferente para os antígenos estudados, pode vir a variar a intensidade de hemaglutinação de antígenos que não são de membrana, e sim adsorvidos à membrana eritrocitária, como os antígenos do Sistema P1pk e Sistema Lewis). O uso de amostras *in natura* até 21 dias para CQI pode ser um método econômico, evitando assim o uso de controles comerciais. Os resultados desta e outras pesquisas se fazem necessários e podem contribuir para melhorar o controle de qualidade dos serviços de análises clínicas.

Abstract

Objective: To determine the stability of the ABO, Rh and Ag Kell erythrocyte antigens to establish the storage time of preservative-free and in natura samples for use in the Internal Quality Control (IQC) of immunohematological tests. **Methods:** Twenty samples containing EDTA were collected. Through the use of monoclonal antibodies the detection of A, B, RhD, RhC, RhE, Rhe, Rhc, Kell (K1) antigens and the hemolysis test were performed by visual inspection of the erythrocyte suspension. The tests were performed on the first day of collection and repeated after fifth, 13th, 15th, 21st, 37th, 50th and 77th of the collection, in which hemagglutination intensity and degree of hemolysis were observed. **Results:** Among the 18 samples, 55.6% were classified as A RhD Positive, 5.6% AB RhD Positive, 38.8% RhD Positive and none of Group B RhD Positive, having two samples excluded from the study because they did not present the RhD antigen. 61% ag RhC in the studied samples, 77.7% Rhc, 38.8% RhE, 88.9% Rhe and 11.1% Kell were detected. On the 77th day, a greater decrease in hemagglutination intensity was observed for Rhe, RhC and RhD antigens, respectively, and no decrease was observed for the other antigens detected. From the 37th day of collection, hemolysis was observed in all samples collected. **Conclusion:** In natura samples with EDTA for up to 21 days after collection had no decrease in hemagglutination intensity and representative hemolysis. Further stability studies are required for other erythrocyte antigens

Keywords

Erythrocytes; Quality control; Reactivity-stability; Blood group antigen

REFERÊNCIAS

1. Daniels G. Human Blood Groups. 2th ed. Oxford: Blackwell Science; 2002.
2. Roback JD, Aronson CA. Technical manual. 17 ed. Estados Unidos: AABB. 2011.
3. Bonifácio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(2):104-11.
4. Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. Vox Sang. 2009;96(2):153-6.

5. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, de Haas M, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). *Vox Sang*. 2014;107(1):90-6.
6. Reid ME, Lomas Francis C, Olsson ML. The blood group antigen facts book. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2012.
7. Denomme GA. Kell and Kx blood group systems. *Immunohematology*. 2015;31(1):14-9.
8. Machado SL, Vizzoni AG. Introdução à ImunoHematologia. In: Paulo CJLS, Silva AM, Neto LMR. *Hematologia: métodos e interpretação*. São Paulo: Roca; 2013;389421.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos.
10. Leonart MSS. Estudos Sobre a Preservação de Eritrócitos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1994.
11. Cozac APCNC. Estudo do potencial antigênico relativo dos antígenos de grupos sanguíneos menores em pacientes sob esquema transfusional [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP; 2009.
12. Sallem ZV. Estudo sobre a preservação de eritrócitos humanos para emprego em exames imunohematológicos e controle de qualidade para a contagem de reticulócitos [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2011.
13. Hauser AB. Programa de controle de qualidade em hematologia: variações interlaboratoriais para eritrograma e plaquetas em Curitiba e Região Metropolitana - PR [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2003.
14. Novaretti MCZ et al. Controle de qualidade interno de reagentes em imunohematologia- aspectos práticos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24(4):270-85.
15. Chin Yee I, Arya N, d'Almeida MS. The red cell storage lesion and its implication for transfusion. *Transfus Sci*. 1997;18(3):447-58.
16. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA preserved red blood cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):279-82.
17. Ministério da Saúde (Brasil). Portaria Nº 158, de 4 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos.
18. Judd WJ, et al. *Judd's Methods in Immunohematology*. 3rd ed. Bethesda: AABB; 2008.
19. Brecher ME, Zylstra-Halling VW, Pineda AA. Rejuvenation of erythrocytes preserved with AS-1 and AS-3. *Am J Clin Pathol*. 1991;96(6):767-9.
20. Stapley R, Rodriguez C, Oh JY, Honavar J, Brandon A, Wagener BM, et al. Red blood cell washing, nitrite therapy, and antiheme therapies prevent stored red blood cell toxicity after trauma-hemorrhage. *Free Radic Biol Med*. 2015;85:207-18.
21. Hogman CF, Meryman HT. Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited. *Transfusion*. 2006;46(1):137-42.
22. Myhre BA, Demaniew S, Nelson EJ. Preservation of red cell antigens during storage of blood with different anticoagulants. *Transfusion*. 1984;24(6):499-501.
23. Malomgré W, Neumeister B. Recent and future trends in blood group typing. *Anal Bioanal Chem*. 2009;393(5):1443-51.
24. Novaretti MCZ, et al. Controle de qualidade de reagentes de glóbulos vermelhos para detecção e identificação de anticorpos irregulares: experiência da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. *Boletim de hematologia*. 1997. 251.
25. Rumsey DH, Ciesielski DJ. New protocols in serologic testing: a review of techniques to meet today's challenges. *Immunohematology*. 2002;16(4):2-9.
26. González C, Esteban R, Canals C, Muñoz-Díaz E, Nogués N. Stabilization of Transfected Cells Expressing Low-Incidence Blood Group Antigens: Novel Methods Facilitating Their Use as Reagent-Cells. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161968.
27. Cabral Filho PE, et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;10:4393-404.

Correspondência

Bruna Sutter

Rua Uruguai, 458

88 302-202 – Itajaí - SC, Brasil

Tel/fax: +55 47 33417540

Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná, Brasil

Etiology of hospital infections and profile of antimicrobial sensitivity in a hospital of southwest Parana, Brazil

Jardel Cristiano Bordignon¹

Leticia Ramos de Lima²

Resumo

Objetivo: Identificar os principais micro-organismos causadores de infecções, a incidência desses patógenos e os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos. **Métodos:** Foram analisados relatórios dos resultados de testes de sensibilidade a antimicrobianos de culturas de pacientes internados em um hospital do sudoeste do Paraná no período de março a junho de 2016. Este estudo analisou 241 resultados, englobando uroculturas, hemoculturas e culturas em geral. **Resultados:** As bactérias mais encontradas foram *Staphylococcus coagulase* negativa (31,95% dos achados), seguido por *Escherichia coli* (21,16%) e *Klebsiella* spp. (12,86%). A pesquisa dos fenótipos de multirresistência mostrou que 25,9% das enterobactérias eram produtoras de beta-lactamases de espectro estendido. Dos *Staphylococcus aureus*, 10,5% eram portadoras do fenótipo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Conclusão:** Os resultados corroboram os dados da literatura, segundo os quais a escalada da multirresistência tem continuado, especialmente nos pacientes hospitalizados

Palavras-chave

Infecção hospitalar; Resistência a antimicrobianos; Bactérias

INTRODUÇÃO

A prevenção e controle de infecções no âmbito hospitalar afeta a todos os departamentos das instituições. Por se tratar de um local com uma variedade grande de micro-organismos, os pacientes e os profissionais da saúde estão expostos a patógenos perigosos e os membros da comunidade procuram tratamento para doenças contagiosas, ocorrências comuns que os hospitais precisam saber controlar. Para garantir a segurança de pacientes, profissionais de assistência à saúde, familiares, visitantes e outros que entrem em contato com um hospital, essa prevenção deve ser prioridade.⁽¹⁾

Na Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998 do Ministério da Saúde (MS), define-se como Infecção hospitalar aquela "adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares".⁽²⁾

A infecção hospitalar é um problema mundial, que contribui para o aumento de vários problemas relacionados a

saúde, como aumento da morbidade, da letalidade, do tempo de internação, dos custos, além da ameaça constante da disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos.⁽³⁾

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema médico crescente gerado por diversos mecanismos genéticos e pela consequente seleção de cepas resistentes. Contribuem para isso o consumo desnecessário e excessivo de antibióticos. Essa resistência pode causar infecções difíceis de serem tratadas, o que facilita a permanência das bactérias no local e favorece sua proliferação.^(4,5)

Os hospitais são os principais locais onde ocorrem infecções por bactérias resistentes ou multirresistentes, principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde existe uma população vulnerável devido à gravidade das doenças e utilização de múltiplos processos invasivos. Isso faz com que o sistema imunológico fique comprometido, tornando os pacientes mais vulneráveis à aquisição de infecções.⁽⁶⁾

Por representar uma ameaça à saúde global, a resistência aos antibióticos compromete avanços na saúde e na

¹Professor. Especialista SBAC

²Acadêmica do curso de Farmácia – Instituto Federal do Paraná – IFPR – Curitiba - PR, Brasil.

Instituição: Instituto Federal do Paraná – IFPR – Curitiba - PR, Brasil.

Artigo recebido em 13/02/2017

Artigo aprovado em 14/09/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700566

Medicina, além de comprometer o tratamento de doenças infecciosas, podendo afetar qualquer pessoa, independentemente da idade e do país onde reside. A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015, coordenou uma campanha mundial de sensibilização para a resistência aos antibióticos e incentivo às melhores práticas entre o público, os políticos, profissionais da saúde e agricultura para evitar mais emergência e propagação da resistência aos antimicrobianos.⁽⁷⁾

Segundo relatório da OMS⁽⁸⁾ em 2014 – "Antimicrobial resistance: global report on surveillance" – as principais bactérias resistentes são: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* não tifoide, *Shigella* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*. Outras bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são também multirresistentes.⁽⁹⁾

Entre os mecanismos de resistência com impacto mundial destacam-se: *Escherichia coli* resistente à terceira geração de cefalosporinas, incluindo resistência conferida por beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e a fluoroquinolonas; *Klebsiella pneumoniae* resistente à terceira geração de cefalosporinas, incluindo a resistência conferida ESBL e aos carbapenens; *Staphylococcus aureus* resistente à betalactâmicos (metilina, MRSA); *Streptococcus pneumoniae* resistente ou não sensível a penicilina (ou ambos); *Salmonella* não tifoide (NTS) resistente a fluoroquinolonas; espécies de *Shigella* resistente às fluoroquinolonas; e *Neisseria gonorrhoeae* com diminuição da susceptibilidade a cefalosporinas de terceira geração.⁽⁸⁾

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias causadoras de infecção em um hospital do Sudoeste do Paraná, identificando os principais microrganismos causadores, a incidência desses patógenos e os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo retrospectivo, transversal, não controlado realizado entre março e junho de 2016 em um hospital do sudoeste do Paraná. Foram analisados 241 resultados de testes de sensibilidade a antimicrobianos de culturas de pacientes internados na instituição. Traçou-se o perfil de sensibilidade dos patógenos encontrados, identificando a sensibilidade e resistência a cada antimicrobiano utilizado nos testes.

Foram realizadas buscas em sites de pesquisa utilizando palavras-chave como "perfil de sensibilidade" (*sensitivity profile*), "infecção hospitalar" (*hospital infection*), "bactérias resistentes" (*bacterial resistance*), "ESBL" (*extended-spectrum beta-lactamases*) e "MRSA" (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Os critérios para refinar os estudos foram artigos publicados nos anos de 2010 a 2017, em

português, inglês e espanhol. As bases de dados utilizadas foram Pubmed, na Biblioteca Virtual de Saúde (BIREME), Scientific Electronic Library Online (SCIELO) e na *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Por não ter havido acesso aos dados dos pacientes, não foi necessário submeter este estudo ao comitê de ética.

RESULTADOS

Foram avaliados 241 testes de sensibilidades a antimicrobianos (TSA) provenientes de hemoculturas 69/241 (28,63%), uroculturas 76/241 (31,54%) e culturas em geral 96/241 (39,83%).

Entre as bactérias analisadas no estudo destaca-se a ocorrência de casos de infecção por *Staphylococcus coagulase* negativa, com 77 ocorrências (31,95%), tendo sua maior incidência nas hemoculturas (53). O segundo e terceiro patógenos mais frequentes foram *Escherichia coli* (51 casos, correspondendo a 21,16%) e *Klebsiella* spp. com 31 achados (12,86%). O quarto foi *Staphylococcus aureus*, com maior incidência em culturas em geral (18) com um total de 19 testes analisados, representando 7,88% do total das amostras. Seguindo uma ordem decrescente de frequência encontra-se *Pseudomonas aeruginosa* (6,64%), *Enterobacter* spp. (4,56%), *Citrobacter* spp. (4,15%), *Proteus* spp. (3,32%), *Enterococcus* spp. (2,07%), *Acinetobacter baumannii* (1,66%), *Streptococcus* spp. (1,66%), *Staphylococcus saprophyticus* (1,25%), *Morganella morganii* (0,42%) e *Serratia* spp. (0,42%). (Tabela 1)

Entre as enterobactérias (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Morganella morganii*) pode ocorrer um tipo de resistência conhecida pela sigla ESBL, que significa beta-lactamases de espectro estendido. Neste trabalho foram encontradas 29 bactérias com essa resistência, sendo elas: *Enterobacter* spp. (3 casos, correspondendo a 27,27% dos *Enterobacter* spp.), *Escherichia coli* (10 casos, correspondendo a 19,61% das *Escherichia coli* encontradas), *Klebsiella* spp. (15 casos, correspondendo a 48,39%) e *Proteus* spp. (um caso, correspondendo a 12,5% dos achados de *Proteus* spp.).

Outro tipo de resistência de importante impacto na saúde identificado nesse trabalho foi a MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina). Dos 19 achados de *Staphylococcus aureus*, dois foram classificados como MRSA, o que corresponde a 10,53% das cepas.

A Figura 1 mostra a distribuição das cepas multirresistentes.

A Tabela 2 apresenta o perfil de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos utilizados no TSA.

Nos resultados de TSA para o grupo das enterobactérias alguns antibióticos apresentaram sensibilidade

Tabela 1 - Frequência de bactérias encontradas em hemoculturas, uroculturas e culturas em geral no período de março a junho de 2016

	Hemocultura	Urocultura	Cultura em Geral	Total	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	-	2	4	1,66
<i>Citrobacter</i> spp.	1	-	9	10	4,15
<i>Enterobacter</i> spp.	1	5	5	11	4,56
<i>Enterococcus</i> spp.	-	2	3	5	2,07
<i>Escherichia coli</i>	2	44	5	51	21,16
<i>Klebsiella</i> spp.	5	16	10	31	12,86
<i>Morganella morganii</i>	-	1	-	1	0,42
<i>Proteus</i> spp.	-	4	4	8	3,32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1	15	16	6,64
<i>Serratia</i> spp.	1	-	-	1	0,42
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	-	18	19	7,88
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	53	-	24	77	31,95
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	3	-	3	1,25
<i>Streptococcus</i> spp.	3	-	1	4	1,66



inferior a 50%, sendo eles: ampicilina e amoxicilina (17,12%), aztreonam (19,05%), cefazolina (22,22%), cefalotina (41,07%), amoxicilina + ácido clavulânico (44,25%), ampicilina + sulbactam (44,64%), ceftazidima (46,02%), ceftriaxona (46,02%), cefotaxima (46,43%) e cefepima (48,61%). Imipenem e meropenem foram os únicos antibióticos que apresentaram sensibilidade 100% nas culturas de enterobactérias seguidas por amicacina (92,08%), nitrofurantoina (87,18%), fosfomicina (85,14%), ácido nalidíxico (78,95%), cefalexina (75%), gentamicina (70%), ciprofloxacino (61,95%), levofloxacino (60,36%), norfloxacino (60%) e sulfametoxazol + trimetropima (55,77%).

O perfil de sensibilidade para *Enterococcus* spp. demonstrou sensibilidade de 100% para os antibióticos ciprofloxacino, estreptomicina (alta dose), gentamicina (alta dose), levofloxacino e vancomicina; 66,67% para nitrofurantoina; e 40% de sensibilidade para amoxicilina, ampicilina e penicilina.

Para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, ampicilina + sulbactam, aztreonam, imipenem, levofloxacino, meropenem, minociclina, norfloxacino, piperacilina + tazobactam e polimixina obtiveram sensibilidade de 100%.

Staphylococcus aureus apresentou três antibióticos com sensibilidade menor que 50%, sendo eles: amoxicilina (16,67%), ampicilina (16,67%) e penicilina (16,67%). Os outros antibióticos demonstraram sensibilidade superior a 80%: cefalexina (82,35%); oxacilina (87,5%); amoxicilina + ácido clavulânico, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona, eritromicina, levofloxacino e meropenem (88,89%); cefalotina e imipenem (89,47%); clindamicina (94,12%); sulfametoxazol + trimetropima (94,44%); ciprofloxacino e gentamicina (94,74%); amicacina, linezolida, rifampicina, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina (100%).

Para *Staphylococcus coagulase neg.* somente 6/25 antibióticos apresentaram perfil de sensibilidade acima de 50%, sendo amicacina (77,5%), tetraciclina (80%), linezolida (94,52%) e teicoplanina (98,65%). Apenas a rifampicina e vancomicina foram 100% sensíveis a essa bactéria. Amoxicilina e ampicilina demonstraram um percentual de sensibilidade de 10,53%; penicilina 14,29%; cefalotina e meropenem 15,58%; cefalexina, cefazolina, oxacilina e ceftazidima 15,79%; ceftazidima e imipenem 17,11%; amoxicilina + ácido clavulânico e ceftriaxona 18,42%; eritromicina 21,62%; clindamicina 28,57%; ciprofloxacino 34,21%; levofloxacino 36,84%; gentamicina 37,14%; e sulfametoxazol + trimetropima 40,85%.

Para *Staphylococcus saprophyticus*, nos testes de sensibilidade a antimicrobianos, quatro antibióticos obtive-

Tabela 2- Porcentagem de sensibilidade dos antibióticos utilizados no TSA para cada espécie de bactérias.

	<i>Acinetobacter</i> %S	Enterobactérias * %S	<i>Enterococcus</i> %S	<i>P. aeruginosa</i> %S	<i>S. aureus</i> %S	<i>Staphylococcus</i> coagulase neg %S	<i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i> %S	<i>Streptococcus</i> %S	Média de S por antibiótico (%)
Ácido Nalidíxico	-	78,95	-	-	-	-	-	-	78,95
Amicacina	100	92,08	-	93,33	100	77,5	-	-	92,58
Amoxicilina	-	17,12	40	-	16,67	10,53	33,33	100	36,28
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico	-	44,25	-	-	88,89	18,42	66,67	100	63,65
Ampicilina	-	17,12	40	-	16,67	10,53	33,33	100	36,28
Ampicilina + Subbactam	100	44,64	-	100	-	-	-	-	81,55
Aztreonam	100	19,05	-	100	-	-	-	-	73,02
cefalexina	-	75	-	-	82,35	15,79	66,67	100	67,96
Cefalotina	-	41,07	-	-	89,47	15,58	66,67	100	62,56
Cefazolina	-	22,22	-	-	88,89	15,79	66,67	100	58,71
Cefepima	100	48,61	-	93,75	-	-	-	-	80,79
Ceftazidima	100	46,02	-	93,75	88,89	17,11	66,67	100	73,21
Ceftriaxona	-	46,02	-	-	88,89	18,42	66,67	100	64
Cefotaxima	-	46,43	-	-	-	-	66,67	-	56,55
Ciprofloxacino	100	61,95	100	93,75	94,74	34,21	-	100	83,52
Clindamicina	-	-	-	-	94,12	28,57	-	100	74,23
Eritromicina	-	-	-	-	88,89	21,62	-	-	55,25
Estreptomina (Alta Dose)	-	-	100	-	-	-	-	-	100
Fosfomicina	-	85,14	-	-	-	-	-	-	85,14
Gentamicina	75	70	-	93,75	94,74	37,14	-	100	78,44
Gentamicina (Alta Dose)	-	-	100	-	-	-	-	-	100
Imipenem	100	100	-	100	89,47	17,11	-	100	84,43
levofloxacino	100	60,36	100	100	88,89	36,84	33,33	100	77,43
Linezolida	-	-	-	-	100	94,52	100	100	98,63
Meropenem	100	100	-	100	88,89	15,58	-	100	84,08
Minociclina	100	-	-	100	-	-	-	-	100
Nitrofurantoína	-	87,18	66,67	-	-	-	100	-	84,62
Norfloxacino	100	60	-	100	-	-	-	-	86,67
Oxacilina	-	-	-	-	87,5	15,79	-	100	67,76
Penicilina	-	-	40	-	16,67	10,53	33,33	100	43,08
Piperacilina + tazobactam	100	-	-	100	-	-	-	-	100
Polimixina B	100	-	-	100	-	-	-	-	100
Rifampicina	-	-	-	-	100	100	-	100	100
Sulfametoxazol + Trimetropima	100	55,77	-	60	94,44	40,85	50	100	77,29
Teicoplanina	-	-	-	-	100	98,65	-	100	99,55
Tetraciclina	-	-	-	-	100	80	-	-	90
Vancomicina	-	-	100	-	100	100,0	-	100	100,0

* Enterobactérias inclui *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Morganella Morganii*. Para a bactéria *Acinetobacter baumannii* foram utilizados os antibióticos: amicacina, ampicilina + subbactam, aztreonam, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, levofloxacino, meropenem, minociclina, norfloxacino, piperacilina + tazobactam, polimixina B e sulfametoxazol + trimetoprima. De todos os antibióticos utilizados apenas a gentamicina apresentou sensibilidade de 75%, os demais demonstraram sensibilidade de 100%.

ram 33,33% de sensibilidade (amoxicilina, ampicilina, levofloxacino, penicilina), um com 50% (sulfametoxazol + trimetropima), sete com 66,67% (amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina, cefalotina, cefazolina, ceftazidima,

ceftriaxona, cefotaxima e dois com sensibilidade de 100% (linezolida e nitrofurantoína).

Somente *Streptococcus* spp. foi sensível a todos os antibióticos utilizados.

DISCUSSÃO

No relatório da OMS⁽⁸⁾ em 2014, destacava-se a preocupação com mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias. Alguns desses mecanismos de resistência foram observados neste trabalho: *Escherichia coli* ESBL (10 cepas), *Klebsiella* spp. ESBL (15 casos) e *Staphylococcus aureus* MRSA (2 casos). Nos casos de resistência descritos no relatório, além de ESBL para as enterobactérias, a resistência à terceira geração de cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima) também foi citada, sendo observado que, para a cefotaxima, a resistência foi de 53,57%, próxima do resultado para ceftriaxona e ceftazidima (53,98%).

A produção de ESBL é um mecanismo de resistência pelo qual as enterobactérias são capazes de hidrolisar os antibióticos da classe das penicilinas, todas as gerações de cefalosporinas e monobactâmicos como o aztreonam.⁽¹⁰⁾

Vários trabalhos apresentam resultados com o aparecimento de enterobactérias produtoras de ESBL, principalmente com a maior incidência de *Escherichia coli*. No trabalho de Rodrigues e Mesquita,⁽¹¹⁾ de 63 amostras identificadas de enterobactérias, 18 foram classificadas como ESBL, sendo a mais frequente a *Escherichia coli*, em segundo *Klebsiella* spp. e, em terceiro, *Enterobacter* spp. No trabalho de Lago e colaboradores⁽¹²⁾ foram utilizadas 208 amostras de enterobactérias ESBL e a maior prevalência foi de cepas de *Escherichia coli*, seguida de *Enterobacter* sp. Já nesse estudo, a maior prevalência foi de amostras de *Klebsiella* spp., seguida de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Proteus* spp.

O MRSA apresenta resistência a todos os antibióticos betalactâmicos, tais como as penicilinas, cefalosporinas e carbapenens. Oxacilina e meticilina servem como marcadores dessa resistência.⁽¹³⁾ Em pesquisa realizada por Ludden e colaboradores⁽¹⁴⁾ em moradores de uma instituição de cuidados de longo prazo, a incidência de casos de MRSA foi mais elevada. Em 64 amostras foram identificados 17 MRSA, equivalente a 26,56%, resultado maior quando comparado aos 10,53% dos encontrados nesse estudo.

Dereli et al.,⁽¹⁵⁾ em sua pesquisa durante três anos de casos de infecção nosocomial em UTI, identificaram maior incidência de infecções na corrente sanguínea, assim como em Brito et al.⁽¹⁶⁾ Essas infecções são diagnosticadas por meio de hemoculturas, nas quais são isolados e identificados os microrganismos patogênicos que possam estar causando infecção no paciente.⁽¹⁷⁾ O principal causador das infecções em todos os tipos de materiais analisados foi a bactéria *Acinetobacter baumannii* (20%), com *Staphylococcus coagulase* negativa em quarto lugar, com 13,71%. Diferentemente desses resultados, *Staphylococcus coagulase* negativa foi o principal causador de infecções no presente

trabalho, sendo identificados em 31,9% das culturas, valor este aproximado ao de Brito e colaboradores⁽¹⁶⁾ de 36,5% de incidência desse patógeno e maior quando comparado a Silva e colaboradores⁽¹⁸⁾ com um percentual de 19,2%.

Os antibióticos que apresentaram piores perfis de sensibilidade na média geral para todas as bactérias foram: ampicilina e amoxicilina 36,28% (utilizado para enterobactérias, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* neg, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus* spp.).

As enterobactérias foram as principais causadoras de infecção no trato urinário, diagnosticadas por meio de urocultura nesse estudo. *Escherichia coli* com 44 amostras foi a principal responsável pelas infecções, seguida por *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Proteus* spp. Esta família é responsável pela maioria das infecções comunitárias e hospitalares no trato urinário, mas também são causadoras de infecções intra-abdominais e bacteremias.⁽¹⁹⁾ Os antibióticos betalactâmicos foram os que mais apresentaram resistência no TSA para a enterobactérias. As enterobactérias nesse estudo não eram produtoras de carbapenemase. Houve 100% de sensibilidade aos antibióticos meropenem e imipenem que pertencem a esta classe. Leão-Vasconcelos e colaboradores,⁽²⁰⁾ além de sensibilidade 100% a imipenem e meropenem, tiveram sensibilidade total para cefepima, ciprofloxacina, gentamicina e levofloxacino.

Em pesquisa realizada por Machado e colaboradores⁽²¹⁾ em cepas de *Acinetobacter* sp. e de *Pseudomonas aeruginosa*, não produtoras de metalo-betalactamases, houve resistência aos 12 antibióticos utilizados. Gentamicina obteve 42% de resistência para *Acinetobacter* sp., 17% a mais que o resultado encontrado neste estudo (25%), sendo que esse foi o único antibiótico, dos 15 utilizados, a apresentar resistência para *Acinetobacter baumannii*.

No estudo conduzido por Silva e colaboradores,⁽¹⁸⁾ bem como no presente trabalho, o antibiótico vancomicina foi 100% eficaz contra *Staphylococcus coagulase* negativa. A eritromicina foi o antibiótico com maior resistência (87,5%), resultado maior que o encontrado neste estudo, que foi de 78,38%, que indicou como antibiótico com maior resistência a amoxicilina, ampicilina e penicilina com 89,47%.

CONCLUSÃO

Estudos como este são relevantes em virtude do monitoramento das taxas de resistência em hospitais. A interação com a comissão de controle de infecção hospitalar deve ser íntima para a entidade de tratamento. As bactérias resistentes são uma grande preocupação mundial, principalmente as produtoras de ESBL, os MRSA, e a produção de carbapenemase. Este último tipo de resistência não

foi encontrado nesse estudo. A análise dos dados oriundos desta pesquisa mostrou etiologia e perfis de sensibilidade compatíveis com os apresentados na literatura recente, e corrobora a preocupação em relação às altas taxas de resistência aos antimicrobianos encontradas em amostras hospitalares.

Abstract

Objective: Identify the microorganisms, the incidence of these pathogens and the antimicrobial susceptibility. **Methods:** Antimicrobial susceptibility tests from cultures of patients hospitalized in a hospital in the southwest of Paraná were analyzed. The selected period was from March to June 2016. This study analyzed 241 tests, including urocultures, blood cultures and other cultures. **Results:** The most common bacteria were coagulase-negative Staphylococcus (31.95% of the positive cultures), followed by Escherichia coli (21.16%) and Klebsiella spp. (12.86%). Multiresistance strains were found: 25.9% of the enterobacteria were extended-spectrum beta-lactamases positive. Between the Staphylococcus aureus, 10.5% were carriers of the Methicillin-resistant Staphylococcus aureus phenotype. **Conclusion:** The results are according to the literature, and demonstrated that the multidrug resistance is becoming higher than ever.

Keywords

Hospital Infection; Antimicrobial resistance; Bacteria

REFERÊNCIAS

- Slavisc SM. Manual de Prevenção e Controle de infecções hospitalares. Artmed. 2012.
- Ministério da Saúde (Brasil). Portaria Nº 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede na forma de anexos diretriz e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares. Diário Oficial da União. 13 mai 1998. Seção 1.
- Medeiros EAS, Rosenthal C. A prática segura e a qualidade na atenção In: O controle da infecção hospitalar no Estado de São Paulo. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo, 2010. [Acesso em 17 fev. 2016] Disponível em: http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/Saude_Publica/infeccao_hospitalar_2010.pdf.
- Pereira FM, Pereira AMS, Silva MCG, Gonçalves VD, Brum PR, Castro EAR, et al. Aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. Braz J Microbiol. 2002;33(4).
- Kadosaki LL, Sousa SF, Borges JCM. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. Revista Brasileira de Farmácia. 2012;93(2):128-35.
- Reis HPLC, Vieira JB, Magalhães DP, Sartori DP, Fonseca DB, Viana JM, et al. Avaliação da resistência microbiana em hospitais privados de Fortaleza - Ceará. Revista Brasileira de Farmácia. 2013; 94(1):83-7.
- World Health Organization (WHO). Antibiotic resistance: Multi-country public awareness survey. Geneva. 2015. [Acesso em 27 fev. 2016] Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/194460/1/9789241509817_eng.pdf?ua=1.
- World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva. 2014. [Acesso em 27 fev. 2016]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.
- Ossa-Giraldo AC, Echeverri-Toro LM, Santos ZM, García MG, Agudelo Y, Ramírez F, et al. Risk factors for multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection, in a tertiary hospital in Colombia. Rev Chilena Infectol. 2014;31(4):393-9. [Article in Spanish].
- El-Jade MR, Parcina M, Schmithausen RM, Stein C, Meilaender A, Hoerauf A, et al. ESBL Detection: Comparison of a Commercially Available Chromogenic Test for Third Generation Cephalosporine Resistance and Automated Susceptibility Testing in Enterobacteriaceae. PLoS One. 2016;11(8):e0160203.
- Rodrigues FCB, Mesquita ARC. Enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) em uroculturas de transplantados renais: frequência e perfil de resistência. RBAC. 2016;48(2):129-32.
- Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2010;43(4).
- Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, D'Azevedo PA. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: emerging community dissemination. An Bras Dermatol. 2009;84(5):501-6. [Article in Portuguese]
- Ludden C, Cormican M, Vellinga A, Johnson JR, Austin B, Morris D. Colonisation with ESBL-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant enterococci, and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a long-term care facility over one year. BMC Infect Dis. 2015;15:168.
- Dereil N, Ozayar E, Degerli S, Sahin S, Koç F. Three-year evaluation of nosocomial infection rates of the ICU. Braz J Anesthesiol. 2013; 63(1):73-8.
- Brito DV, Brito CS, Resende DS, Moreira de O J, Abdallah VO, Gontijo Filho PP. Nosocomial infections in a Brazilian neonatal intensive care unit: a 4-year surveillance study. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(6):633-7.
- Freire ILS, Araújo RO, Vasconcelos QLDAQ, Menezes LCC, Costa IKF, Torres GV. Perfil Microbiológico, de Sensibilidade e Resistência Bacteriana das Hemoculturas de Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica. Revista de Enfermagem da UFSM. 2013;3(3): 429-39.
- da Silva AR, Simões ML, Werneck L dos S, Teixeira CH. Healthcare associated infections caused by coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit. Rev Bras Ter Intensiva. 2013;25(3):239-4. [Article in English, Portuguese].
- Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):519-28.
- Leão-Vasconcelos LS, Lima AB, Costa DeM, Rocha-Vilefort LO, Oliveira AC, Gonçalves NF, et al. Enterobacteriaceae isolates from the oral cavity of workers in a Brazilian oncology hospital. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57(2):121-7.
- Machado GM, Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Occurrence and the susceptibility to antimicrobial agents in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter sp. at a tertiary hospital in southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(2):168-72. [Article in Portuguese].

Correspondência

Jardel Cristiano Bordignon
PRT 280, sn, trevo da Codapar
Palmas - PR, Brasil

Ocorrência de micoses superficiais em um centro de saúde pública localizado na cidade de Patos - PB, Brasil

Occurrence of superficial mycoses in public health unit in the city of Patos - PB, Brazil

Ertenia Paiva Oliveira¹
Franciélia de Sousa Andrade²
Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto³

Resumo

Micoses superficiais são infecções fúngicas que acometem as camadas superficiais da pele e seus anexos. Essas micoses são prevalentes em todo mundo, e, embora o semiárido nordestino apresente clima propício para o surgimento dessas infecções, são raros os estudos acerca do assunto. Diante do exposto, essa pesquisa teve como objetivo diagnosticar e evidenciar a incidência de micoses superficiais em pacientes atendidos na área de dermatologia de um centro de saúde pública na cidade de Patos - PB, além de determinar o perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos isolados. Foram coletadas 34 amostras biológicas, obtidas através de escarificações epidérmicas ou ungueais. Das amostras coletadas, 15 (44,11%) apresentaram resultado positivo para dermatomicose. As infecções que mais acometeram os pacientes foi Candidíase (60%), Pitiríase versicolor (26,66%), Fusariose cutânea (6,66%) e Onicomicose aspergilar (6,66%). Nos testes de sensibilidade antifúngica, os isolados de *Candida* sp. foram sensíveis a todos os fármacos testados, já o *Fusarium* sp. apresentou resistência. A *Candida* sp. foi o agente etiológico isolado mais frequente e isso pode ser explicado pelos fatores climáticos e socioeconômicos da região, que são propícios para o desenvolvimento desse fungo oportunista.

Palavras-chave

Micoses; Diagnóstico; *Candida* sp.; *Fusarium* sp.; Testes de sensibilidade a antifúngicos

INTRODUÇÃO

As micoses superficiais são infecções causadas por fungos que mais comumente atingem a população humana, restringindo-se às camadas mais superficiais da pele e seus anexos, acometendo pele, cabelo e unhas, sendo os fungos queratinofílicos seus principais agentes etiológicos.^(1,2,3)

As principais dermatomicoses no homem são as dermatofitoses (tinhas), pitiríase versicolor, além das leveduras superficiais. Segundo Criado et al.,⁽⁴⁾ as micoses superficiais são prevalentes em todo o mundo, sendo frequentes no Brasil devido a seu clima tropical, sendo mais encontrada em locais de clima quente e úmido. Na região Nordeste, o maior número de casos de dermatoses encontram-se em regiões litorâneas, no entanto não há pesquisas suficientes acerca do assunto no semiárido, embora saibamos que o referido clima é propício para o desenvolvimento de tais micoses.⁽⁵⁾ Segundo um dos raros estudos epidemiológicos realizados no estado da Paraíba, obser-

vou-se um alto índice de pitiríase versicolor, com 78% de acometimento da população.⁽⁶⁾

Para a obtenção do tratamento adequado é necessário conhecer o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos e o espectro de ação dos antifúngicos, e para isso é importante a realização da análise *in vitro* da atividade antifúngica através do antifungigrama.⁽²⁾ Pouco tempo atrás, o antifungigrama não era solicitado na prática médica, pois a maioria dos fungos apresentavam-se sensíveis a anfotericina B; entretanto, os fungos desenvolveram resistência a algumas drogas, e isso, somado ao fato do tratamento tornar-se mais difícil quando o paciente apresenta um imunocomprometimento, levou à necessidade de se determinar o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos para orientação da terapêutica de forma correta. Além disso, esses fármacos podem causar diversos efeitos colaterais, entre eles destacando-se a hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade.^(1,7,8)

A frequência com que micoses superficiais acometem a população humana vem aumentando, tornando-as

¹Técnica de laboratório. Graduanda em Biomedicina – Faculdades Integradas de Patos - PB, Brasil.

²Graduanda em Biomedicina – Faculdades Integradas de Patos - PB, Brasil.

³Pós-Doutorando em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – Recife - PE, Brasil.

Instituição: Faculdades Integradas de Patos - PB, Brasil.

Artigo recebido em 30/11/2012

Artigo aprovado em 24/02/2016

DOI: 10.21877/2448-3877.201600064

de grande interesse na prática médica; além disso, as micoses não constituem doença de notificação obrigatória, portanto não sabemos a extensão dessa prevalência. Isso evidencia a necessidade de estudos que investiguem os agentes etiológicos dessas infecções em conjunto com a realização dos testes de antifungograma.

Este trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de micoses superficiais em um centro de saúde pública da cidade de Patos, isolar e identificar os agentes etiológicos dessas infecções e determinar o padrão de sensibilidade desses fungos isolados frente aos antifúngicos comercialmente disponíveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 34 amostras clínicas de pacientes atendidos na área de dermatologia do Centro de Saúde Frei Damião da cidade de Patos - PB. Nos casos sugestivos de Pitiríase versicolor, foi realizada uma assepsia no local da lesão e, em seguida, feita a coleta através da escarificação das escamas epidérmicas em placa de Petri devidamente esterilizada. Paralelamente foi realizado o método de Porto, sendo em seguida semeado parte do material em meio ágar Sabouraud, para que pudesse ser feita a identificação do agente etiológico, sendo também realizado o exame direto, onde as escamas epidérmicas eram colocadas entre lâmina e lamínula e adicionada KOH a 20%, para ser possível a visualização das estruturas fúngicas caso houvesse; já para a técnica de Porto utilizou-se o corante azul de metileno, com o objetivo de visualizar também estruturas fúngicas. Nos casos sugestivos de dermatofitoses (tinhas) e leveduras, foi feita assepsia no local da lesão, e o material foi então coletado por meio de escarificações epidérmicas, ungueais ou retirada de pêlo ou cabelo onde apresentavam lesões com indício de infecção fúngica. Estas coletas foram realizadas com auxílio de bisturi esterilizado, coletadas em placas de Petri, devidamente estéreis, sendo posteriormente analisadas por exame direto preparado com adição do KOH a 20% e semeado em ágar Sabouraud para o isolamento e identificação do fungo baseado nos estudos macro e micromorfológico das colônias, e, posteriormente, feita a verificação da sensibilidade aos antifúngicos.

Foram avaliados dois isolados de *Candida* e um isolado de *Fusarium* quanto ao perfil de sensibilidade para agentes antifúngicos. Os métodos utilizados seguiram as condições descritas no documento em M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008) e M38-A2 para fungos filamentosos (CLSI, 2008).

Os agentes antifúngicos comerciais utilizados no teste *in vitro* foram cetoconazol, itraconazol e ciclopirox olamina (Medley S.A., Campinas - SP, Brasil) diluídos em dimetil sulfoxido (DMSO; Gibco - Minas Gerais, Brasil) e o

fluconazol (FLU; Pfizer, Nova York, EUA), preparado em água destilada. Concentrações diferentes de ambos os antifúngicos foram preparados e usados nos intervalos de 0,03 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para cetoconazol e itraconazol, 0,06 a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para ciclopirox olamina e 0,125 a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para fluconazol.

As amostras clínicas de *Candida* foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA-Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. Suspensões dos isolados foram preparadas e a densidade foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância a 530 nm, utilizando-se um espectrofotômetro (Spectronic Genesys, Application Softcard™, Milton Roy). O volume final do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls/ mL^{-1} .

Os isolados de fungos filamentosos foram repicados em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA-Difco) e incubados a 37°C até ser obtida boa esporulação. Sequencialmente, 1 mL de solução salina (cloreto de sódio a 0,85%) esterilizada foi adicionada às colônias fúngicas e preparada uma suspensão mexendo-se delicadamente as colônias com a ponta de uma pipeta de transferência. Posteriormente, a mistura resultante foi transferida para tubo de ensaio esterilizado, adicionado de 10 μL de tween 20 para facilitar a dispersão dos esporos. Após cinco minutos de repouso, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e agitado por 15 segundos em vórtex. A densidade da suspensão foi ajustada por espectrofotômetro a 530 nm para obter uma transmitância de 65-70%. Em seguida, as suspensões foram diluídas (1:50) em RPMI 1640, obtendo-se uma concentração final de 5×10^4 céls/mL.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas testadas, e as placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas antes da leitura dos resultados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos avaliados.

A sensibilidade antifúngica foi determinada de acordo com o método de referência publicado pelo *Clinical Laboratory Standard Institute*, baseado na variação de sensibilidade. O valor de CIM para as leveduras foi definido como a menor concentração de cetoconazol, ciclopirox olamina e itraconazol capaz de inibir totalmente o desenvolvimento dos isolados clínicos e a concentração do fluconazol capaz de inibir 50% de desenvolvimento em relação ao controle. O valor de CIM para o *Fusarium* sp. foi definido como a menor concentração itraconazol capaz de inibir totalmente o desenvolvimento do isolado clínico, a concentração do cetoconazol e fluconazol capaz de inibir 50% de desenvolvimento em relação ao controle e a concentração de ciclopirox olamina capaz de inibir pelo menos 80%.

RESULTADOS

Foram analisadas 34 amostras biológicas (pele, unha e cabelo) coletadas de 32 pacientes, no período de agosto a setembro do ano de 2012. Destas, 15 amostras foram

positivas para micoses superficiais, representando um índice de 44,11% de positividade. Além disso, em sete amostras foram observadas a presença de bactérias. O resultado dos exames micológicos é sumarizado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados dos exames micológicos das amostras biológicas

Paciente	Sexo	Tipo de Amostra	Exame Direto	Cultura
1	F	Pele	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
2	M	Pele	Pseudo- hifas curtas e tortuosas	Não realizada
3	F	Pele	Leveduras agrupadas em cachos	Não realizada
4	F	Pele	Leveduras agrupadas em cachos	Não realizada
5	F	Pele	Células leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
6	M	Pele	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
7	F	Unha	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
8	F	Unha	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
9	F	Pele	Filamentos micelianos hialinos e septados	<i>Fusarium</i> sp.
10	F	Pele	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
11	M	Pele	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
12	F	Pele	Leveduras agrupadas em cachos	Não realizada
13	M	Pele	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
14	F	Unha	Células de leveduras hialinas globosas isoladas ou unibrotantes	<i>Candida</i> sp.
15	F	Unha	Filamentos micelianos hialinos, septados e em dicotomia	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Conforme os resultados descritos na Tabela 1, observamos que, dentre as quinze amostras positivas, em nove (60%) identificamos *Candida* sp., quatro (26,66%) apresentaram resultado do exame direto sugestivo de *Malassezia* sp., em uma (6,66%) identificamos *Fusarium* sp. e, em outra (6,66%), *Aspergillus fumigatus*.

Foi avaliada a atividade antifúngica de cetoconazol, ciclopirox olamina, itraconazol e fluconazol frente a dois isolados clínicos de *Candida* sp. e um isolado clínico de *Fusarium* sp. A variação da concentração mínima inibitória de cada antifúngico testado é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antifúngica de cetoconazol, ciclopirox olamina, itraconazol e fluconazol frente dois isolados clínicos de *Candida* sp. e um isolado clínico de *Fusarium*

	Antifúngicos (CIMs ^b em mg/mL)			
	Cetoconazol	Ciclopirox Olamina	Itraconazol	Fluconazol
ATCC 22019 ^a	0,125	1	0,125	2
<i>Candida</i> sp. 10	0,06	2	0,125	0,5
<i>Candida</i> sp. 13	0,125	2	0,06	1
<i>Fusarium</i> sp. 17	R ^c	16	R	R

^a*Candida parapsilosis* ATCC 22019 was used as reference strain

^bCIM = Concentração Inibitória Mínima

^cR = Resistente

De acordo com a Tabela 2 observamos que os isolados de *Candida* sp. apresentaram menor CIM para o cetoconazol e itraconazol e demonstraram sensibilidade *in vitro* frente a todos os antifúngicos testados. Já para o *Fusarium* sp. só foi determinado CIM do ciclopirox olamina de 16 mg/mL, considerado resistente, assim como os demais antifúngicos.

DISCUSSÃO

De acordo com Tomaz et al.,⁽⁹⁾ estima-se que 20% a 25% da população mundial é acometida por micoses superficiais. Nossos resultados demonstraram uma incidência de 44,11% de infecções superficiais causadas por fungos.

As leveduras são um dos principais agentes etiológicos responsáveis pelas micoses superficiais e nesse estudo foi observado uma alta incidência de leveduras do gênero *Candida* sp. como o principal agente causador das dermatomicoses nessa região, o que pode ser explicado pelos fatores climáticos e socioeconômicos que são propícios para o desenvolvimento deste fungo que é oportunista.⁽¹⁾

Em um trabalho realizado por Pontes et al.,⁽³⁾ a *Candida* sp. foi o fungo mais isolado como agente etiológico das onicomicoses em João Pessoa - PB com uma incidência de 82%, dados esses que corroboram nossos achados, pois

observamos as leveduras do gênero *Candida* sp. como as responsáveis por 75% das onicomicoses.

Um estudo realizado em Cuiabá - MT, no qual se pesquisaram leveduras do gênero *Candida* sp. na pele, mucosas e unhas de profissionais militares que apresentavam lesões clínicas compatíveis com levedurosas, demonstrou um índice de positividade de 46,2% de candidíase.⁽¹⁰⁾ Nessa pesquisa observamos a *Candida* sp. como a responsável por 60% das infecções fúngicas superficiais, acometendo pele e unha. Com relação à distribuição por sexo, essa levedura apresentou uma predisposição pelo sexo feminino.

Pitiríase versicolor é outra das dermatomicoses que mais acomete o homem, sua frequência varia de 5% a 50% em climas quentes e úmidos. Os raros estudos sobre essa micose realizados no estado da Paraíba evidenciam uma incidência de 78%.^(6,11) No presente estudo obtivemos uma incidência de 26,66 % de casos compatíveis com pitiríase versicolor.

A análise *in vitro* da atividade antifúngica permite a comparação entre os diferentes antifúngicos, podendo assim auxiliar na escolha da terapia eficaz para os pacientes acometidos por infecções fúngicas. As espécies de *Candida* sp. foram sensíveis a todos os antifúngicos testados, o que também foi observado no estudo de Silva et al.,⁽¹²⁾ que verificaram a sensibilidade aos antifúngicos de leveduras desse gênero.

A fusariose representa uma complicação de alta morbidade e mortalidade em imunocomprometidos, pois as opções terapêuticas são limitadas devido à relativa resistência do *Fusarium* sp. aos antifúngicos mais comumente utilizados.⁽¹³⁾ Nesse estudo, o *Fusarium* sp. aparece como agente etiológico de uma micose superficial, que apresentou resistência para os fármacos testados, confirmando os resultados de Guillermetti et al.,⁽¹⁴⁾ Azor et al.,⁽¹³⁾ e Almeida et al.,⁽¹⁾ onde o *Fusarium* sp. apresentou CIM elevada frente aos antifúngicos comercialmente disponíveis. Nossos resultados possibilitaram determinar CIM apenas para ciclopirox olamina de 16 mg/mL.

CONCLUSÃO

Foi possível observar neste estudo que as infecções que acometeram os pacientes foram Candidíase, Pitiríase versicolor, Onicomicose aspergilar e Fusariose cutânea, onde o *Fusarium* sp. apresentou resistência frente a todos os agentes antifúngicos testados, o que sinaliza a necessidade da busca de novas opções de terapêuticas antifúngica.

Agradecimentos

Agradecemos aos diretores e funcionários do Centro de Saúde Frei Damião e ao dermatologista Dr. Umberto Joubert, além dos voluntários que aceitaram participar da pesquisa.

Abstract

Superficial mycoses are fungal infections that affect the more superficial layers of the skin. These mycoses are prevalent worldwide, and although semi-arid present favorable climate to the emergence of these infections, there are few studies about this question. Considering the above, this work aimed to diagnose and to display the incidence of superficial mycoses in patients served in the dermatological service of a public health center at Patos, Paraíba, Brazil, besides to determine the antifungal susceptibility profile of the etiologic agent isolates. We collected 34 samples obtained by epidermal and nail scraping. Our results showed that 15 (44.11%) were positive for dermatomycosis. Infections that attacked patients were candidiasis (60%), tinea versicolor (26.66%), cutaneous fusariosis (6.66%) and aspergillar onychomycosis (6.66%). In the antifungal susceptibility testing all Candida isolates were susceptible to cetoconazole, fluconazole, itraconazole and anidulafungin. However, Fusarium sp. was resistant all drugs tested. Candida was the most common etiologic agent and this can be explained by climatic and socioeconomic factors in the region that are conducive to the development of opportunistic fungus.

Keywords

Mycoses; Diagnosis; Candida sp.; Fusarium sp.; Antifungal sensitivity tests

REFERÊNCIAS

- Almeida LM, Souza EA, Bianchin DB, Svidzinski TI. In vitro response of cutaneous mycosis fungal agents to the most widely used systemic antifungals in dermatology. *An Bras Dermatol.* 2009; 84(3):249-55. [Article in English, Portuguese]
- Magagnin CM, Stopiglia CD, Vieira FJ, Heidrich D, Machado M, Vettoratto G, et al. Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(4):694-701. [Article in English, Portuguese]
- Pontes ZB, Lima Ede O, Oliveira NM, Dos Santos JP, Ramos AL, Carvalho MF. Onychomycosis in João Pessoa City, Brasil. *Rev Argent Microbiol.* 2002;34(2):95-9.
- Criado PR, Oliveira CB, Dantas KC, Takiguti FA, Benini LV, Vasconcelos C. Superficial mycosis and the immune response elements. *An Bras Dermatol.* 2011;86(4):726-31. [Article in English, Portuguese]
- Araújo Gde M, Araújo ND, Farias RP, Cavalcanti FC, Lima Mdo L, Braz RA. Superficial mycoses in Paraíba: a comparative analysis and bibliographical revision. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):943-6. [Article in English, Portuguese]
- Vasconcelos PA, Lima EO. Estudo epidemiológico da Pitiríase versicolor no Estado da Paraíba-Brasil. *An Bras Dermatol.* 33:63-67, 2001.
- Peres NT, Maranhão FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol.* 2010;85(5):657-67.
- Schreiber AZ. Antifungograma: Quando solicitar e como interpretar. *Prática Hospitalar.*, Ano IX, 49: 87-91, 2007.
- Tomaz D. Será fungo? *Revista Portuguesa de Clínica Geral.*, 27 (1):96-108, 2011.
- Leite Júnior DP, Yamamoto AC, Martins ER, Teixeira AF, Hahn RC. Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(4):675-80. [Article in English, Portuguese]
- Brito LB, Lima EO, Carmo ES, Carvalho FFP, Albuquerque PBS, Figueiredo MM P. Estudo epidemiológico da pitiríase versicolor na cidade de João Pessoa, PB, de 1999 a 2008. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.* 2011;43(2):142-4.
- Silva JO, Ferreira JC, Candido RC. Enzymatic activity, slime production and antifungal agent sensitivity of *Candida* sp. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(3):354-5. [Article in Portuguese]

13. Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J. Universal in vitro antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1500-3.
14. Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TI. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *Int J Dermatol.* 2007;46(8):822-6.

Correspondência

Ertenia Paiva Oliveira

*Rua Horácio Nóbrega, S/N – Belo Horizonte
58704-000 – Patos - PB, Brasil*

Estudo comparativo da associação entre a ocorrência de parasitos intestinais e diferentes variáveis clínicas e epidemiológicas em moradores da comunidade Ribeira I, Araci - BA, Brasil

Comparative study of the association between the occurrence of intestinal parasites and different epidemiological and clinical variables in the Ribeira I community residents, Araci - BA, Brazil

Ana Lúcia Moreno Amor¹

Vaneide Firmo Oliveira²

Resumo

Objetivo: Determinar a prevalência de enteroparasitos correlacionando-a com variáveis clínicas e epidemiológicas em moradores da comunidade Ribeira I (Araci - Bahia, Brasil) em 2008, comparando com dados obtidos em 2006 na mesma comunidade. **Métodos:** Trata-se de um estudo de corte transversal, seccional descritivo. Dos 344 indivíduos que fizeram parte da pesquisa anterior, aproximadamente 50% participaram deste estudo. **Resultados:** Com relação aos indivíduos infectados em 2006 e 2008, observou-se uma positividade de 71,3% e 79,5%, respectivamente. Entre os participantes, 45,0% em 2006 e 56,7% em 2008 apresentaram poliparasitismo. Quando comparados os indicadores desnutrição, anemia e eosinofilia nos indivíduos parasitados destaca-se a diminuição da frequência dos indivíduos anêmicos (n=24 em 2006; n=6 em 2008) e de eosinofílicos, (n=53 em 2006; n=37 em 2008) e um aumento da frequência dos desnutridos (n = 65 em 2006; n = 72 em 2008). O presente estudo evidenciou aumento na presença de fossas sanitárias nas residências pesquisadas (8,8% em 2006; 47,3% em 2008). **Conclusão:** Em virtude da persistência da infecção, sugere-se que a educação sanitária deve preceder e acompanhar todas as etapas do controle, mobilizando e organizando a participação da comunidade, modificando hábitos higiênicos, tratamentos e avaliações que forem necessárias.

Palavras-chave

Doenças parasitárias; Prevalência; Perfil de saúde

INTRODUÇÃO

A prevenção e controle de infecções no âmbito hospitalar, em especial as enteroparasitoses, são de distribuição universal e apresentam gravidade que persistem nos países em desenvolvimento e contribuem para problemas socioeconômicos e de saúde, sendo um dos principais fatores debilitantes da população, associando-se a frequentes sinais e sintomas característicos que podem levar o indivíduo à morte ou a um comprometimento no desenvolvimento físico e intelectual.⁽¹⁾ A falta de condições mínimas de saneamento básico e inadequadas práticas

de higiene pessoal são os principais mecanismos de transmissão dos enteroparasitos.^(2,3)

De um modo geral, as informações sobre a prevalência de enteroparasitos no Brasil são escassas ou mesmo nulas para determinadas regiões. Quando existe, esta informação é fragmentada, desatualizada e as técnicas parasitológicas realizadas não são específicas,⁽⁴⁾ impedindo a comparação dos dados.

Em municípios baianos, é comum, nas zonas rurais e em bairros periféricos, o encontro de crianças servindo-se de água contaminada, convivendo com o lixo e realizando suas necessidades fisiológicas ao ar livre, criando um elo

¹Professora Adjunto I - Parasitologia Humana / Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas - BA, Brasil.

²Farmacêutica. Especialista em Tópicos Avançados no Diagnóstico Laboratorial – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas - BA, Brasil.

Instituição: Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCS / UFRB – Cruz das Almas - BA, Brasil.

Artigo recebido em 01/04/2013

Artigo aprovado em 03/06/2015

DOI: 10.21877/2448-3877.201500146

para a transmissão de agentes parasitários intestinais, sobretudo os que fazem parte das geohelmintoses.^(2,5)

O quadro clínico das enteroparasitoses vai desde a forma assintomática até a presença de sinais e sintomas característicos: dores abdominais, diarreia, vômitos, náuseas, irritabilidade, distúrbios do sono, anorexia, apresentando-se mais grave em pacientes desnutridos, imunocomprometidos, com neoplasias, portadores de doença do colágeno, anemia falciforme, tuberculose, paciente esplenectomizado e pacientes em uso prolongado de corticoides.^(1,6)

Alguns trabalhos no Brasil procuram correlacionar parasitoses intestinais com anemia, alteração do estado nutricional e outros sinais e sintomas no indivíduo.⁽⁷⁻¹²⁾

Na Bahia, a maioria dos estudos está voltada para ocorrência de enteroparasitoses em escolares.^(2,9,12-14) Contudo, há uma grande lacuna particularmente no que se refere à prevalência de enteroparasitos correlacionada com anemia e aos fatores de risco associados a essa deficiência nutricional em uma população carente.

A comunidade rural faz parte de uma população onde as condições socioeconômicas, ambientais e culturais são precárias, com difícil acesso à assistência médica e laboratorial, vítima de condições sanitárias que favorecem a prevalência de infecções parasitárias, podendo ocorrer disseminação, principalmente por falta de medidas profiláticas.^(15,16)

O presente estudo tem como base temática verificar a ocorrência de parasitos intestinais correlacionando-os com anemia, estado nutricional e outras variáveis clínicas e epidemiológicas na comunidade rural do distrito de Ribeira I, em Araci - Bahia, possibilitando a comparação dos resultados obtidos a partir de uma pesquisa pioneira realizada em 2006⁽¹⁶⁾ na referida comunidade e, desta forma, permitir avaliar os impactos das ações que foram realizadas junto à população na época, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novas ações.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal, seccional descritivo, explorativo e comparativo, que foi realizado na comunidade rural Ribeira I, município de Araci, região do semiárido baiano, no período de julho a setembro 2008. Foram integrantes deste inquérito, indivíduos de ambos os sexos, faixa etária variada, que fizeram parte de estudo anterior no ano de 2006.^(11,16,17) Dos 344 pesquisados, aproximadamente 49,7% (n=171) participaram da pesquisa em 2008.

Instrumentos de pesquisa

Para comparação dos resultados, foram separados os cadastros dos que aceitaram participar da pesquisa e

os percentuais foram tabulados a partir dos mesmos critérios analisados anteriormente⁽¹⁶⁾ e realização de novas entrevistas durante as visitas domiciliares: dados pessoais (identificação e antropometria, além de questões sobre os principais sinais e sintomas apresentados correlacionados com parasitoses intestinais) e perfil socioeconômico e cultural da população (composição e renda familiar, condições habitacionais físicas e sanitárias e nível de escolaridade). No mesmo dia da visita distribuíam-se recipientes de plástico, devidamente identificados, a fim de serem realizados exames parasitológicos de fezes (três recipientes por pessoa).

Avaliação do estado nutricional

Avaliação realizada seguindo a mesma metodologia de 2006⁽¹⁶⁾ por meio da utilização do índice de massa corporal (IMC): $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ (kg/m²), com adequação por percentis para idade e sexo,⁽¹⁸⁾ utilizando-se como valores de referência: < 18,0 - baixo peso (desnutrido); 18,0 - 24,9 - peso normal (eutrófico); 25,0 - 29,0 - sobrepeso; 29,1 - 39,9 - obesidade; > 40,0 - obesidade grave.

Procedimentos laboratoriais

Foram coletadas três amostras de fezes e uma de sangue de cada indivíduo, em diferentes dias. Utilizou-se, para diagnóstico parasitológico, o método coproscópico de Hoffmann, Pons e Janer (sedimentação espontânea), realizado no laboratório do Centro de Saúde Municipal de Araci-Bahia, com leitura de três lâminas por amostra.

Para análise hematológica, utilizando-se uma amostra de 5 mL de sangue venoso em ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), fez-se a determinação da hemoglobina pelo método da cianohemoglobina, e o hematócrito pelo cálculo indireto do Volume Corpuscular Médio (VCM), realizado por contador eletrônico de células (MS4). Considerando-se anêmico quando hemoglobina (Hb) < 11,5 g/dL e hematócrito (Ht) < 35% (para o sexo feminino), e Hb < 12 g/dL e Ht < 35% (para o sexo masculino), obedecendo os critérios da OMS.⁽¹⁹⁾

Para a pesquisa de eosinófilos, utilizou-se contagem diferencial de leucócitos pela observação, ao microscópio, de distensões sanguíneas, em lâminas com sangue sem anticoagulantes. Foi considerado eosinofílico o indivíduo que apresentou em sua distensão sanguínea mais de 6% do total de 100 leucócitos.⁽²⁰⁾

Análise estatística e considerações éticas

Os dados foram processados e analisados pelo programa SPSS 9.0 e Excel, por meio de medidas de frequências, médias, desvio-padrão, teste de associação e medidas de comparação de médias. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da FTC, segundo a Resolução 196/96 do Conselho

Nacional de Saúde. Cada participante foi orientado a assinar (ou marcar sua digital) em um termo de consentimento, inserindo-se e/ou aceitando a participação dos filhos (ou crianças sob sua responsabilidade) como critério de inclusão para realização da pesquisa.

RESULTADOS

Com relação aos mesmos indivíduos pesquisados no ano de 2006, percebeu-se uma diminuição percentual nas amostras negativas, aumento percentual nas amostras positivas no ano de 2008, com maior ocorrência de poliparasitados (Tabela 1) e dados parecidos quanto à correlação com sexo, apresentando maior prevalência de positividade para as amostras dos indivíduos do sexo feminino (Tabela 2).

Ocorreu aumento percentual para positividade a protozoários com diminuição para o encontro de helmintos (Tabela 3). Este aumento esteve diretamente relacionado ao *Endolimax nana*, que apresentou maior prevalência quando observada frequência em 2006 e em 2008.

Tabela 1 - Porcentagem da infecção parasitária em 2006 e 2008 - Distrito de Ribeira I (Araci-Bahia). Período: out/2005 a jul/2006 e jul-set 2008

Grau de acometimento	2008			
	Amostra negativa		Monoparasitado	
	n	%	n	%
Amostra negativa	15	8.8	10	5.8
2006 Monoparasitado	10	5.8	11	6.4
Poliparasitado	10	5.8	18	10.5
Total	35	20.5	39	22.8

$\chi^2 = 6.37$

Tabela 2 - Prevalência de enteroparasitos segundo a distribuição por sexo no Distrito Ribeira I - Bahia (outubro/2005 a julho 2006 e julho a setembro 2008)

Sexo	Indivíduos infectados			
	2006		2008	
	n	%	n	%
Feminino	90	52.6	96	52.6
Masculino	32	18.7	40	21.1
Total	122	71.3	136	73.7

$\chi^2 = 4.1$

Tabela 3 - Prevalência específica de enteroparasitos em 2006 e 2008 - Distrito Ribeira I - Araci - Bahia (outubro/2005 a julho/2006 e julho a setembro 2008)

Enteroparasitos	2006	
	n	%
Protozoários	222	89.88
<i>Entamoeba coli</i>	99	42.10
<i>Entamoeba histolytica / E. dispar</i>	57	23.89
<i>Endolimax nana</i>	30	12.15
<i>Iodamoeba butschilii</i>	16	6.48
<i>Giardia duodenalis</i>	13	5.26
Helmintos	25	10.12
Ancilostomídeos	14	5.67
<i>Enterobius vermiculares</i>	10	4.05
<i>Ascaris lumbricoides</i>	01	0.40
<i>Hymenolepis nana</i>	00	0.00
Total	247	100

A respeito da faixa etária dos participantes, percebe-se maior ocorrência de resultado positivo para enteroparasitos nos indivíduos inseridos no intervalo compreendido de 2 a 7 anos para 2006⁽¹⁶⁾ e de 8 a 15 anos em 2008 (dados não mostrados).

Quando comparados os indicadores desnutrição, anemia e eosinofilia nos indivíduos mono e poliparasitados destacam-se a diminuição da frequência dos indivíduos anêmicos e eosinofílicos e um aumento da frequência dos desnutridos na população pesquisada (Tabela 4). Os dados foram estatisticamente significativos ($\chi^2 = 0.0042$) quando correlacionado anemia e eosinofilia com monoparasitismo e poliparasitismo nos participantes da pesquisa de 2006 e 2008.

Foi observado aumento percentual na presença de sinais e sintomas ocorridos nos últimos 15 dias antes da entrevista entre os períodos pesquisados para indivíduos com amostras positivas e negativas. (Tabela 5). Nos dois estudos, a dor abdominal, anorexia, prurido anal, diarreia e manchas na pele foram os sinais e sintomas mais prevalentes nos moradores (dados não mostrados).

Quanto aos fatores epidemiológicos estudados em ambos os períodos, 100% dos participantes ainda referiram não possuir sistema de abastecimento de água potável.

Tabela 4 - Prevalência para três indicadores (desnutrição, anemia e eosinofilia) correlacionada com monoparasitismo e poliparasitismo. Distrito de Ribeira I (Araci-Bahia) (outubro/2005 a julho/2006 e julho a setembro 2008)

Indicador 2016 e 2008	Número de espécie por hospedeiro em 2006				Número de espécie por hospedeiro em 2008				Total 2006		Total 2008	
	Monoparasitismo		Poliparasitismo		Monoparasitismo		Poliparasitismo		n	%	n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Desnutrição	13	28.3	33	71.7	18	31.6	39	68.4	46	100.0	57	100.0
*Anemia	08	33.3	16	66.7	01	16.7	05	83.3	24	100.0	06	100.0
*Eosinofilia	17	32.1	36	67.9	16	43.2	21	56.8	53	100.0	37	100.0

$\chi^2 = 0.0042$

Tabela 5 - Ocorrência de enteroparasitos associado a presença de sinais e sintomas - Distrito Ribeira I, município de Araci, Bahia (outubro/2005 a julho/2006 e julho a setembro 2008)

Sinais e sintomas 2006 e 2006	Resultados dos exames coprológicos 2006				Resultados dos exames coprológicos 2008			
	Amostra negativa		Amostra positiva		Amostra negativa		Amostra positiva	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Presente	40	23.4	103	60.2	31	18.2	121	70.8
Ausente	09	5.3	19	11.1	04	2.3	15	8.7
Total	49	28.7	122	71.3	35	20.5	136	79.5

$\chi^2 = 0.12$; $\pi = 0.12$

vel em seu domicílio. Ocorreu aumento percentual dos participantes com prática adequada para descarte do lixo doméstico e possuindo sistema de destino adequado de dejetos (fossa sanitária) (Tabela 6). Na população estudada houve correlação estatisticamente significativa entre presença de parasitos e destino adequado de dejetos quando correlacionados 2006 e 2008. Observa-se aumento dos casos de indivíduos com animais domésticos e também parasitados.

As condições econômicas foram analisadas tomando-se como referência a renda familiar definida, como o número de salários mínimos recebidos pelo número de

peças que compunha a família. Com uma renda familiar abaixo de um salário mínimo mensal foram encontrados todos os indivíduos pesquisados nos dois anos; sendo assim, não foi possível fazer esta correlação com enteroparasitados.

Nos resultados referentes à escolaridade dos pesquisados, a frequência de enteroparasitados mostrou-se elevada entre indivíduos com 1º grau incompleto e com nenhuma escolaridade em ambos os períodos pesquisados (dados não mostrados).

Após resultados laboratoriais da pesquisa de 2006 e 2008, algumas medidas de intervenção foram aplicadas na comunidade estudada:

a) *Medidas aplicadas após resultados da pesquisa em 2006*⁽¹¹⁾: palestra sobre infecção parasitária; implantação da Unidade da Saúde da Família na comunidade Ribeira I, construção de alguns sanitários residenciais; calçamento da praça da localidade; doação de filtros para água; atendimento nutricional; atendimento médico; doação (dispensação) de medicamentos: antiparasitários e para o controle da anemia.

b) *Medidas aplicadas após resultados da pesquisa em 2008*⁽¹⁶⁾: palestra sobre infecção parasitária; atendimento médico; doação (dispensação) de medicamentos: antiparasitários e para o controle da anemia.

Tabela 6 - Distribuição de aspectos epidemiológicos em 2006 e 2008 - Distrito de Ribeira I - Araci - Bahia (out/2005 a jul/2006 e jul-set/2008)

Condições ambientais/domiciliares		Resultados de exames coprológicos em 2006				Resultados de exames coprológicos em 2008				Total 2006	Total 2008	p		
		Amostra negativa		Amostra positiva		Amostra negativa		Amostra positiva						
		n	%	n	%	n	%	n	%					
1. Água encanada e tratada	Sim	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0,39
	Não	49	28.7	122	71.3	35	20.5	136	79.5	171	100.0	171	100.0	
2. Destino adequado dos dejetos	Sim	7	4.1	15	8.8	29	17.0	81	47.3	22	12.9	110**	64.3	0.042
	Não	42	24.6	107	62.6	6	3.5	55	32.2	149	87.1	61	35.7	
3. Destino adequado do lixo doméstico	Sim	0	0.00	0	0.00	12	7.0	33*	19.3	0	0.00	45**	26.3	0.003
	Não	49	28.7	122	71.3	23	13.5	103	60.2	171	100.0	126	73.7	
.Presença de animais no domicílio	Sim	20	11.7	61	35.7	16	9.4	65*	38.0	81	47.4	81**	47.4	0.03
	Não	29	17.0	61	35.7	19	11.1	71	41.5	90	52.6	90	52.6	

*Dados apresentando significância estatística para o fator epidemiológico estudado ($p < 0.05$); **Dados apresentando significância estatística entre os anos pesquisados; ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

Entre os períodos analisados, verificou-se persistência da infecção por enteroparasitos nos indivíduos reavaliados, com predomínio de poliparasitismo. Dados que podem estar relacionados, provavelmente, com os hábitos higiênicos não adequados da população.⁽²¹⁾

Apesar do percentual elevado de parasitismo apresentado, nota-se diminuição na ocorrência de parasitos patogênicos que pode estar associada à ação medica-

mentosa aplicada como medida de intervenção na comunidade em 2006. O aumento na prevalência de protozoários comensais, evidenciando a manutenção de contaminação oral-fecal, mostra a necessidade de se realizarem mais medidas de intervenção, como, por exemplo, promoção para educação em saúde feita em colaboração com membros da comunidade (formando mais agentes multiplicadores dos conhecimentos adquiridos).

Os ancilostomídeos foram os helmintos mais prevalentes na região, mostrando um índice importante de in-

fecção por penetração de larvas, provavelmente decorrente do solo adequado para a proliferação destas, situação verificada em outros estudos^(22,23) e que ainda reflete o perfil da comunidade pesquisada: realização das necessidades fisiológicas ao ar livre, aumentando a probabilidade de encontro do homem com o parasito.

Destacam-se duas ocorrências para o helminto *Hymenolepis nana* em 2008. Vale atentar-se para outras pesquisas de controle deste parasito, pois, em crianças, pode promover o aparecimento de perturbações no sistema nervoso central, agitação, insônia e crises epiléticas.⁽²⁴⁾

A maior prevalência de protozoários intestinais do tipo enterocomensais (*E. coli*, *E. nana* e *I. butschlii*) em relação aos protozoários intestinais patogênicos (*E. histolytica* e *G. duodenalis*), como verificado em outros trabalhos,^(10,14,23,25,26) é um dado importante, visto que eles têm o mesmo mecanismo de transmissão e podem servir como indicadores de condições socio sanitárias precárias e da má qualidade de higiene alimentar, evidenciando a necessidade da adoção de medidas de cuidados, principalmente com a água a ser ingerida e utilizada no preparo dos alimentos.

Quanto ao estado nutricional, registra-se diminuição do número de eutróficos e aumento de desnutridos na população, bem como apresentando sobrepeso nos períodos estudados, mesmo após a medida de intervenção feita pela Secretaria de Ação Social do município, em 2006, com atendimento individual por nutricionista, anamnese alimentar e orientação dietética. Dados que merecem atenção e monitorização, considerando-se a fragilidade socioeconômica da comunidade em adquirir uma dieta nutricionalmente adequada.

Em localidades mais restritas, como o distrito de Ribeira I, em Araci, Bahia, onde a exclusão social se apresenta de forma mais contundente, os valores são mais preocupantes: muitas famílias relataram que só faziam duas refeições diárias, mostrando uma dieta pobre em nutrientes por não terem condições financeiras para mudar essa situação. O aumento da frequência de indivíduos com sobrepeso também mostra uma alimentação inadequada, justificando-se condução de inquéritos nessas comunidades notadamente submetidas aos fatores de risco nutricionais.

A prevalência de anemia e de eosinofilia observadas no estudo em 2008 foi inferior à observada no estudo em 2006, o que pode estar associado à medida de intervenção realizada em 2006 com a dispensação de medicamentos antianêmicos e antiparasitários, visto que, para este último, na maioria das vezes, a infecção parasitária provoca aumento no número de eosinófilos.⁽²⁴⁾

Para sinais e sintomas apresentados pelos participantes, no presente estudo, o que agrava o quadro de alta frequência das enteroparasitoses é que estas são sempre

negligenciadas e esquecidas, já que os sintomas clínicos são inespecíficos ou confundidos com os de outras doenças.⁽¹⁰⁾

A infecção por enteroparasitos é claramente relacionada com a precariedade das condições de higiene e saneamento.^(27,28) O reconhecimento da área de abrangência na região rural Ribeira I mostrou que a região ainda apresenta um histórico bastante favorável à presença de parasitoses intestinais como inicialmente apresentado em 2006.⁽¹¹⁾ A alta positividade no distrito existe em decorrência não só da questão social, mas, principalmente, pela falta de uma infraestrutura relativa ao saneamento básico, mesmo com as melhorias realizadas após 2006, como calçamento da praça e instalação de sanitários em alguns domicílios. O predomínio da infecção prevalece e pode ser devido aos maus hábitos que a população ainda tem em ingerir água e alimentos sem o devido tratamento e higiene, bem como hábitos de andar descalça, possibilitando a penetração por larvas de ancilostomídeos, por exemplo.

Vários fatores ambientais facilitadores da infecção enteroparasitária estavam presentes no âmbito da comunidade estudada, entre esses a ausência de água de boa qualidade e de fossas; dejetos e detritos a céu aberto; solo úmido; altas temperaturas; proliferação de insetos; dificuldade de acesso aos serviços públicos de saúde, população em massa servindo-se de água poluída, convivendo com o lixo, banhando-se em barragem junto com animais, realizando suas necessidades fisiológicas ao ar livre, formando uma tríade epidemiológica para a transmissão das doenças parasitárias intestinais.

Com relação ao item abastecimento de água encaçada e tratada e destino do lixo doméstico, pode-se observar que a maioria dos indivíduos em questão, tanto parasitados como não parasitados, viviam em um ambiente desprovido desse saneamento básico, de forma que estes dois parâmetros pouco avaliaram a condição de parasitismo para comparação com ambiente apresentando saneamento adequado. Já em relação ao destino adequado dos dejetos (ou presença de sanitário no domicílio), mesmo havendo aumento de residências com sanitários, não ocorreu diminuição da infecção parasitária. Souza et al⁽⁶⁾ mostraram que a simples presença de fossas sanitárias não assegura hábitos adequados de higiene, já que, em uma pesquisa onde 48 indivíduos apresentavam fossa sanitária em casa, 32 eram positivos para algum tipo de parasito.

Quanto à presença de animais domésticos, nos estudos de 2006 e 2008 em Ribeira I houve correlação estatisticamente significativa entre presença de animais domésticos e infecção parasitária. Faz-se importante a realização de parasitológico de fezes nos animais domésticos, pois alguns parasitos próprios destes animais, como exemplo do *Toxocara canis* e *Ancylostoma caninum*, podem pro-

vocar no homem lesões como a larva *migrans* visceral e a larva *migrans* cutânea, respectivamente, constituindo-se o homem como hospedeiro acidental para estes parasitos.^(24,29)

A realização de obras de infraestrutura e de saneamento básico na comunidade deste estudo, tais como calçamento da praça e construção de sanitários em algumas residências, pode estar associada ao decréscimo verificado para os parasitos patogênicos, em colaboração com a dispensação de medicamentos (anti-parasitários) utilizados em 2006. Contudo, a manutenção da infecção parasitária mostra que não basta apenas ter água e fossa sanitária dentro de casa, é necessário saber utilizar adequadamente estes recursos, o que resulta a importância da melhoria do nível educacional como coadjuvante na resolução dos problemas de saúde. Sugere-se que as escolas desenvolvam programas de combate às parasitoses e de promoção a uma alimentação saudável, por exemplo,⁽¹¹⁾ pois a educação sanitária deve preceder e acompanhar todas as etapas do controle, mobilizando e organizando a participação da comunidade, com o objetivo de modificar seus hábitos higiênicos e de aceitar os tratamentos e as avaliações que forem necessárias.

É fundamental o estabelecimento de uma política de saúde que não seja baseada somente no diagnóstico e tratamento individual, mas que vise à eliminação das fontes de infecção.^(27,30) Espera-se que este inquérito coprológico seja feito anualmente, principalmente em virtude do alto índice de infecção no distrito, para a observação da dinâmica da infecção parasitária, a fim de se verificar a efetividade de possíveis intervenções (educação + tratamento + melhorias no saneamento básico) realizada no local. A resultante destas modificações influenciará decisiva e inversamente na prevalência das enteroparasitoses neste distrito, como responsável por uma possível evolução da negatização de enteroparasitos nos exames de fezes.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que ocorreu maior prevalência dos parasitos *Endolimax nana* e ancilostomídeos, com predomínio do grupo dos protozoários nos dois estudos e das infecções do tipo poliparasitária. Na população estudada ocorreu diminuição do número de eutróficos e de anêmicos, aumento do número de desnutridos, bem como de indivíduos apresentando sobrepeso nos períodos estudados. Quanto aos fatores epidemiológicos, foram observadas associações estatisticamente significativas destes com infecção parasitária para o fator presença de animais domésticos e destino inadequado dos dejetos.

O quadro de saúde verificado ainda requer intervenções a fim de garantir melhores condições de crescimento, desenvolvimento e de qualidade de vida na comunidade. A prevenção é possível e o tratamento com medicamentos específicos costuma ser muito eficaz, porém, essa comunidade necessita de ações que modifiquem o saneamento ambiental e hábitos destes indivíduos; o consumo de água potável e alimentos higienizados provavelmente seria um aspecto que diminuiria a infecção parasitária. É imprescindível sensibilizar os órgãos competentes, a fim de incentivar melhorias nas condições de vida dos indivíduos, principalmente com base em inquéritos epidemiológicos como o deste estudo, devendo ser inserido nos sistemas públicos de saúde.

Abstract

Objective: The aim of the study was to determine the prevalence of intestinal parasites correlating it with clinical and epidemiological community residents in Ribeira I (Araci - Bahia, Brazil) in 2008, compared with data obtained in 2006 in the same community. **Methods:** This was a study of cross-sectional descriptive: Of the 344 individuals who participated in the previous survey, approximately 50% participated in this study. **Results:** With regard to individuals infected in 2006 and 2008, there was a positive 71.3% and 79.5%, respectively. Among the participants, 45.0% in 2006 and 56.7% in 2008 presented poliparasitism. When comparing the indicators malnutrition, anemia and eosinophilia in infected individuals highlights the decreasing frequency of anemic patients (n = 24 in 2006; n = 6 in 2008) and eosinophilic (n = 53 in 2006; n = 37 in 2008) and an increased incidence of malnutrition (n = 65 in 2006; n = 72 in 2008). The present study showed an increase in the presence of cesspools in the households surveyed (8.8% in 2006; 47.3% in 2008). **Conclusion:** Because of persistent infection suggests that health education must precede and follow all the steps of control, organizing and mobilizing community participation, so that you can modify hygienic habits, accept treatments and evaluations as needed.

Keywords

Parasitic diseases; Prevalence; Health profile

REFERÊNCIAS

1. Melo MCB, Klem, VGQ, Mota JAC, Penna FJ, Parasitoses intestinais. Rev Med. Minas Gerais, 14 (Supl 1): S3 - S12, 2004.
2. Luz ECCS. Meio ambiente e parasitoses intestinais em crianças no município de Jussiape, Bahia. 2008 [Dissertação] Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA.
3. Santos FS, Gama ASM, Fernandes AB, Reis-Junior JDD, Guimarães J. Prevalência de enteroparasitismo em crianças de comunidades ribeirinhas do Município de Coari, no médio Solimões, Amazonas, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude 2010;1(4):23-8.
4. Souza RF, Amor ALM. Controle de qualidade de técnicas realizadas nos laboratórios de parasitologia da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Salvador, Bahia. RBAC. 2010;42(2): 101-6.
5. Santos JF, Correia JE, Gomes SSBS, Silva PC, Borges FAC. Estudo das parasitoses intestinais na comunidade carente dos bairros periféricos do município de Feira de Santana (BA), 1993-1997, Sítientibus, Feira de Santana, 20: 55 - 67, 1999.
6. Souza AI, Ferreira LOC, Filho MB, Dias MRFS. Enteroparasitoses, anemia e estado nutricional em grávidas atendidas em serviço público de saúde. RBGO. 2002;24(4):253-9.

7. Vitale MSS, Romero KT, Medeiros ELGR. Prevalência de anemia carencial ferropriva, parasitoses intestinais e estado nutricional em pacientes assistidos no centro de saúde de atendimento e apoio ao adolescente. In: Costa COM & Pagnoncelli R, editors, *Adolescência - aspectos clínicos e psicossociais*, Porto Alegre: Artmed, 2001.
8. Costa MF, Melro CBF, Silva MP. Endemias e Meio Ambiente no Litoral Norte - Bahia, I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, UFPB, 2002.
9. Brito LL, Barreto, ML, Silva RCR, Assis AMO, Reis MG, Parraga I, et al. Fatores de risco para anemia por deficiência de ferro em crianças e adolescentes parasitados por helmintos intestinais, *Pan Am J Public Health*. 2003;14(6):422-31.
10. Saturnino ACRD, Nunes JFL, Silva EMA. Relação entre a ocorrência de parasitas intestinais e sintomatologia observada em crianças de uma comunidade carente de Cidade Nova, em Natal - Rio Grande do Norte, Brasil. *RBAC*. 2003;35(2):85-7.
11. Oliveira VF, Amor ALM. Associação entre a ocorrência de parasitos intestinais e diferentes variáveis clínicas e epidemiológicas em moradores da comunidade Ribeira I, Araci, Bahia, Brasil. *RBAC*. 2012; 44(1):15-25.
12. Santos IP, Carvalho FL, Silva IM, Pereira JS, Jesus RS, Jesus MC, et al. Correlação de parasitos intestinais com estado nutricional, sintomatologia e condições sociais em crianças do bairro Cajueiro, município de Santo Antônio de Jesus - BA. *Revista Higiene Alimentar*, volume 25, 1149-1151, 2011.
13. Prado MJ, Barreto ML, Strina A, Faria JAS, Nobre AA, Jesus SR. Prevalência e intensidade da infecção por parasitos intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil), *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(1):99-101.
14. Correia AA, Brandão DS, Ribeiro LC. Estudo das parasitoses intestinais em alunos da 5ª série do Colégio da Polícia Militar (CPM) de Feira de Santana-Bahia. *Diálogos & Ciência -- Revista Eletrônica da Faculdade de Tecnologia e Ciências de Feira de Santana*. Ano III, n. 6, 2005.
15. Brasil. Estimativas da população para 1 de julho de 2009 (PDF). *Estimativas de População*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (14 de agosto de 2009). Página visitada em 16/08/2009.
16. Oliveira VF, Amor ALM. Ocorrência de parasitos intestinais correlacionada com sintomatologia, estado nutricional e fatores sócio-econômicos-ambientais em moradores da comunidade Ribeira I - Araci - Bahia - Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:260.
17. Oliveira VF. Ocorrência de parasitos intestinais correlacionando com anemia e estado nutricional em moradores da comunidade Ribeira I - Araci - Bahia - Brasil. 2006 [Monografia]. Faculdade de Tecnologia e Ciências.
18. Anjos LA. Índice de massa corporal (massa corporal x estatura-2) como indicador do estado nutricional de adultos: revisão da literatura. *Rev Saúde Pública*, São Paulo. 1992;26(6):431-6.
19. Nih - National Institutes of Health, Lung and Blood Institute, *Clinical guidelines on the identification evaluation and treatment of overweight and obesity in adults - The evidence report*, NIH Publication, 98, 4083, 1998.
20. Unicef. WHO. Preventing iron deficiency in women and children: technical consensus on key issues, New York: UNICEF/WHO; 1998, p, 21.
21. Marquez AS, Marquez AS, Hasenack BS, Trapp EH, Guilherme RL. Prevalência de enteroparasitoses em crianças de um bairro de baixa renda em Londrina-Paraná. *Unopar. Cient Ciên Biol Saúde*. 2002;4(1):55-9.
22. Ribeiro MCM, Madeira C, Marçal MG, Marçal Jr O. Parasitoses Intestinais na Comunidade de Martinésia, Zona Rural de Uberlândia, Minas Gerais. *Bioscience J*. 2005;21:113-21. 2.
23. Rocha RS, Silva JG, Peixoto SV, Caldeira RL, Firmo JO, Carvalho OS, Katz N. Assessment of schistosomiasis and other intestinal parasitoses in school children of the Bambui municipality, MG, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(5):431- 6.
24. Neves DP, Melo AL, Linardi PM, et al. *Parasitologia humana*, 2005, 11a, ed, São Paulo: Atheneu.
25. Nolla AC, Cantos GA. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2005;21(2):641-5.
26. Malta RCG. Estudo epidemiológico dos parasitos intestinais em crianças no município de Votuporanga - SP, [dissertação de mestrado] Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2006.
27. Tavares-Dias M, Grandini AA. Prevalence and epidemiological aspects of enteroparasites in the population of São José da Bela Vista, São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(1):63-5. [Article in Portuguese].
28. Marques SMT, Bandeira C, Quadros RM. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. *Parasitol Latinoam* 2005;60:78-81.
29. Figueiredo SD, Taddei JA, Menezes JJ, Novo NF, Silva EO, Cristovão HL, et al. Clinical-epidemiological study of toxocarasis in a pediatric population. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(2):126-32. [Article in Portuguese]. [Internet]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572005000300007&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572005000300007>.
30. Ferreira HS, Assunção ML, Vasconcelos VS, Melo FP, Oliveira CG, Santos TO. Saúde de populações marginalizadas: desnutrição, anemia e enteroparasitoses em crianças de uma favela do "Movimento dos Sem Teto", Maceió, Alagoas. *Re. Bras. Saúde Matern. Infant. Recife*, 2(2):177-85, 2002.

Correspondência

Ana Lúcia Moreno Amor

*Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Campus do Governo
Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro
44570-000 – Santo Antônio de Jesus - BA, Brasil*

Uso de amostras individualizadas e em *pool* no diagnóstico de parasitos intestinais

Use of individualized and pooled samples in the diagnosis of intestinal parasites

Juliana da Silva Matos¹

Andreza Rodrigues Ramos¹

Alynne da Silva Barbosa²

Otilio Machado Pereira Bastos³

Claudia Maria Antunes Uchôa⁴

Resumo

Objetivo: O uso de amostras fecais de diferentes dias tem sido recomendado para aumentar a eficácia do diagnóstico de enteroparasitos. Porém, essa estratégia determina maior tempo de processamento e custo. Como alternativa, em algumas rotinas adota-se o uso de *pool* de amostras. Esse estudo teve como objetivo comparar o uso de amostras individualizadas e *pool*, no diagnóstico parasitológico. **Métodos:** Amostras de 24 indivíduos foram processadas de forma individual e em *pool* pelas técnicas de Ritchie modificada, Lutz e Faust et al. **Resultados:** Dos 24 participantes, 11 (45,8%) foram positivos para formas evolutivas de protozoários e helmintos. Em nove indivíduos positivos obteve-se concordância substancial (K=0,80) entre os resultados da análise de amostras individuais e em *pool*, o que foi confirmado pela análise estatística ($p < 0,0001$). No entanto, quando foi analisada a associação entre as abordagens empregadas, avaliando-se a análise individual vs. análise em *pool*, no presente estudo, foi observado que não houve diferença estatística significativa entre as taxas de positividade ($p = 0,77$). Quando comparado o resultado do uso de apenas uma amostra individual e do *pool* de amostras, a diferença não foi significativa ($p = 0,75$), indicando que, estatisticamente, no grupo de amostras analisadas não houve diferença entre o uso de uma amostra única ou do *pool* de amostras, embora o último tenha obtido maior número de amostras positivas. **Conclusão:** Nesse estudo, o uso do *pool* de amostras fecais para análises de amostras múltiplas representou uma estratégia eficaz no diagnóstico parasitológico por microscopia, reduzindo o tempo de processamento, com um melhor custo-benefício, gerando resultado eficaz e confiável.

Palavras-chave

Análise parasitológica; Fezes; Parasitos; Testes diagnósticos de rotina

INTRODUÇÃO

Parasitoses intestinais humanas são infecções causadas por helmintos e protozoários.⁽¹⁾ Essas infecções refletem as condições de vida de diferentes indivíduos nas comunidades, e a prevalência das mesmas é influenciada por diversos fatores, que, quando existem de formas satisfatórias, coíbem a expansão dessas parasitoses. Por mais que tenha ocorrido uma queda na prevalência de enteroparasitoses no Brasil, de maneira geral, essas ainda representam um problema de saúde em determinadas regiões do país.⁽²⁾

A maioria das enteroparasitoses é diagnosticada apenas com base em exames clínicos, contudo grande parte dos sinais e sintomas são inespecíficos, tornando, dessa forma, necessárias investigações laboratoriais para se chegar a um resultado fidedigno.⁽³⁾ Os exames laboratoriais parasitológicos demonstram ser importantes procedimentos para o diagnóstico, uma vez que, na maioria das vezes, podem identificar se o indivíduo está parasitado ou não e, se positivo, qual espécie o está parasitando, direcionando assim para um tratamento específico adequado.⁽⁴⁾

Para o diagnóstico das doenças parasitárias intestinais, a pesquisa de parasitos nas fezes, também

¹Discente de Graduação do Curso de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ) – Niterói - RJ, Brasil.

²Doutor. Docente da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP), Instituto Biomédico (CMB), Universidade Federal Fluminense – UFF/RJ e pós-doutoranda do Laboratório de Toxoplasmose, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz - Rio de Janeiro - RJ

³Doutor. Docente da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP), Instituto Biomédico (CMB), Universidade Federal Fluminense – UFF/RJ – Niterói - RJ, Brasil.

⁴Doutor. Professor associado. Universidade Federal Fluminense – UFF/RJ – Niterói - RJ, Brasil.

Instituição: Universidade Federal Fluminense - Instituto Biomédico. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia – Niterói - RJ, Brasil

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse

Artigo recebido em 03/05/2017

Artigo aprovado em 02/10/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700578

conhecido como exame parasitológico de fezes (EPF), é considerado fundamental, apesar de frequentemente não merecer a devida atenção por parte dos profissionais de saúde.⁽⁵⁾

Existem diversas técnicas que são utilizadas para o diagnóstico de protozoários e helmintos intestinais. Os procedimentos mais utilizados na rotina para diagnosticar os parasitos intestinais são as técnicas de enriquecimento coproparasitológicas, por sedimentação ou flutuação, pois permitem concentrar formas evolutivas de parasitos, determinar a sua presença e identificá-las até família, gênero ou espécie.⁽⁶⁾

Um ponto crítico no diagnóstico parasitológico microscópico é a amostra fecal. A análise de uma única amostra pode recuperar apenas algumas das formas evolutivas dos parasitos que estão infectando o hospedeiro. Essa situação pode estar relacionada à liberação intermitente de formas evolutivas por alguns helmintos como *Schistosoma mansoni* e protozoários como *Giardia duodenalis*.⁽⁷⁾

Para aumento da acurácia diagnóstica, frente à menor eficiência de uma única amostra, recomenda-se a análise de múltiplas amostras fecais, o que aumenta a probabilidade de encontro de formas evolutivas de parasitos.⁽⁷⁻¹⁰⁾ A literatura preconiza a análise de três amostras fecais coletadas num intervalo de dois ou três dias durante um período de seis a dez dias.^(7,11)

Todavia, a prática estabelecida de coleta de múltiplas amostras fecais eleva os custos, o tempo para obtenção de resultado e a carga de trabalho. Além disso, existe contínuo debate na literatura científica da real necessidade de análise de amostras múltiplas por paciente para a detecção confiável de parasitos intestinais. Andrews,⁽¹²⁾ Sawitz e Faust,⁽¹³⁾ Hiatt et al.⁽⁹⁾ e Cartwright⁽¹⁴⁾ defenderam a análise em separado de múltiplas amostras fecais no diagnóstico parasitológico, porém outros têm proposto o uso de amostras fecais em *pool*, resultando em um processamento único.^(8,11,15-18) Baseado nesse contexto, esse estudo teve como objetivo comparar o uso de amostras individuais de diferentes dias e de *pool* dessas amostras no que se refere à sensibilidade do diagnóstico de parasitoses intestinais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram convidados para participar do estudo crianças e adultos inseridos em uma comunidade escolar durante o período de maio a junho de 2016, em Niterói, RJ. A amostragem foi por conveniência e dependente do retorno de amostra pelos indivíduos participantes. A participação foi voluntária e mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi entregue a cada participante um *kit* coletor, composto por três recipientes de plástico, sendo dois com conservante Railliet-Henry e um

sem conservante. O conservante foi escolhido por ser utilizado com excelentes resultados na rotina de coleta de amostras fecais do laboratório de Bioagentes Ambientais da UFF, tendo em sua composição solução salina, ácido acético e formol. Foi orientada de forma oral e por escrito a coleta de cerca de 40 gramas de fezes de dias diferentes, sendo eles consecutivos ou alternados.

Parte das amostras foi separada e processada na rotina do laboratório de Bioagentes Ambientais da UFF para determinação de positividade e negatividade, utilizando-se as técnicas de Lutz,⁽¹⁹⁾ Ritchie⁽²⁰⁾ modificada por Young et al.⁽²¹⁾ e Faust et al.⁽²²⁾ Outra parte foi reservada para realização desse estudo, tendo sido inseridas aquelas que apresentaram quantidade suficiente de amostra fecal.

Os resultados foram entregues na forma de laudo individual para cada participante, sendo orientado, em caso de positividade para parasitos patogênicos, a procura de atendimento médico. No caso de positividade para parasitos não patogênicos, foi informado ao participante que a presença desses parasitos não representava risco para a saúde, porém indicava baixa qualidade higiênico-sanitária, o que pode favorecer a aquisição de parasitos patogênicos.⁽²³⁾

Após o diagnóstico preliminar, a amostra fecal de cada dia, coletada de forma individual, foi homogeneizada, pesada e foram separados 6 gramas para realização de todas as técnicas. Para confecção do *pool*, foram pesados 2 gramas adicionais da amostra de cada dia, que foram transferidos para outro coletor plástico primoultimado e homogeneizados, totalizando 6 gramas.⁽¹⁸⁾ As amostras individuais e em *pool* foram processadas posteriormente pelas três técnicas parasitológicas. Foi realizada a leitura de uma lâmina de cada técnica em microscópio óptico Olympus® BX41 em aumento de 100X e confirmação, quando necessária, em aumento de 400X.

Cada amostra individual e em *pool*, constituídas respectivamente por 6 gramas de fezes, foram eluídas em 20 mL de água destilada, sendo posteriormente filtradas em gaze dobrada quatro vezes sobre tamiz. A suspensão filtrada foi transferida para proveta graduada para aferir o volume recuperado de amostra, sendo esse ajustado para 21 mL, quando necessário, com água destilada. Padronizou-se o protocolo com 7 mL de filtrado da suspensão de material fecal para cada técnica. Para as técnicas de Ritchie modificada e Faust et al. foram transferidos 7 mL para dois tubos de fundo cônico tipo Falcon, de 15 mL, previamente identificados e, para técnica de Lutz, 7 mL foram transferidos para cálice de fundo cônico, sempre após homogeneização da amostra.

Os resultados obtidos foram analisados de forma descritiva e a concordância entre os tipos de amostras individual e em *pool* foram avaliados por meio do índice de

concordância (Kappa). A análise da significância entre os resultados pelo uso de amostras individuais e em *pool* foi avaliada pelo teste Exato de Fisher, com intervalo de confiança de 5% utilizando-se o programa GraphPad QuickCalcs®.

Ética

Esse estudo fez parte do projeto "Parasitoses intestinais em escolares de Niterói, RJ: frequência, conhecimentos e profilaxia", que obteve parecer favorável em 22 de abril de 2014 no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Hospital Universitário Antônio Pedro, possuindo registro de identificação no CEP, CMM/HUAP nº 621.193 e CAAE nº 25061913.0.0000.5243.

RESULTADOS

Dos 41 indivíduos que entregaram amostras fecais, 24 foram inseridos nesse estudo, baseado na quantidade suficiente de amostra fecal enviada. Desses, nove coletaram duas amostras e 15 três amostras, totalizando 87 amostras, das quais 63 eram individuais e 24 em *pool*. Considerando o total de amostras e a realização de três técnicas parasitológicas distintas, realizaram-se 261 análises, das

quais 189 foram nas amostras individuais e 72 nas em *pool*. Das 87 amostras analisadas, trinta foram positivas para formas evolutivas de parasitos intestinais. Na Tabela 1 são apresentados os resultados de positividade por amostra individual e em *pool*.

Considerando as trinta amostras positivas para alguma forma evolutiva de parasito intestinal, os mais detectados foram *Blastocystis* sp. e *Endolimax nana*, ambos diagnosticados em 13 amostras. Foram evidenciados: *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. hartmanni* em oito (26,7%) amostras, *Giardia duodenalis* em sete (23,3%), *Enterobius vermicularis* em uma (3,3%). Em 22 amostras detectou-se apenas um parasito e em oito encontrou-se associação de uma ou mais espécies.

Dos 24 indivíduos participantes, 11 (45,8%) foram positivos para parasitos intestinais associando-se as duas formas de análise em *pool* e individual. Desses indivíduos, quatro realizaram coleta de dois dias, e sete, de três dias.

A espécie de parasito mais frequente foi *Blastocystis* sp., encontrada em sete (63,3%) indivíduos, seguida por *E. nana* em cinco (45,5%), *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. hartmanni* em três (27,3%), *Giardia duodenalis* em dois (18,2%) e *Enterobius vermicularis* em um (9,1%).

Tabela 1 - Resultados obtidos pela análise de 63 amostras fecais individuais e 24 em *pool* por técnicas parasitológicas de fezes para pesquisa de parasitos intestinais em Niterói, RJ

Amostras	Análise Individual				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Pool	Total
Positiva	8 (9,2%)	6 (6,9%)	7 (8%)	9 (10,3%)	30 (34,5%)
Negativa	16 (18,4%)	18 (20,7%)	8 (9,2%)	15 (17,2%)	57 (65,5%)
Total	24 (27,6%)	24 (27,6%)	15 (17,2%)	24 (27,6%)	87 (100%)

A concordância entre a positividade obtida por pelo menos uma amostra individual e o *pool* ocorreu em nove amostras (K= 0,80; P < 0,0001), sendo considerada substancial. No entanto, quando foi analisada a associação entre as abordagens empregadas no presente estudo (análise individual vs. análise em *pool*), foi observado que não houve diferença estatística significativa entre as taxas de positividade (P= 0,77). Foi observado que, quando as três ou duas amostras eram positivas individualmente, o *pool* foi positivo. Nos dois indivíduos em que o *pool* foi negativo, somente uma das amostras estava positiva, sendo observada nessas a presença de poucas formas evolutivas parasitárias de *Blastocystis* sp. Quando comparado o uso de apenas uma amostra individual e o *pool*, a diferença não foi significativa (P= 0,75). Nos 11 indivíduos positivos para parasitos intestinais, a análise de uma única amostra detectou o parasitismo em oito indivíduos. A segunda amostra individual detectou seis

indivíduos positivos e a amostra do terceiro dia, sete. Em um participante, a positividade só foi evidenciada no segundo dia, e, em dois, no terceiro dia, considerando amostras individuais. Em uma das amostras positivas no terceiro dia, o *pool* foi positivo.

Em dois indivíduos, onde o diagnóstico do *pool* concordou com o das amostras individuais quanto à positividade, houve discordância com relação às espécies parasitárias, sendo detectado somente no *pool* de amostras, em um indivíduo, presença de ovos de *Enterobius vermicularis* e cistos de *Endolimax nana* e, em outro, forma vacuolar de *Blastocystis* sp. Em um terceiro indivíduo houve discordância entre as amostras individuais, tendo sido capaz de recuperar apenas no *pool* de amostras todas as espécies parasitárias detectadas. Os resultados obtidos por espécie parasitária com relação às amostras individuais ou em *pool* estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultado de positividade por gênero/espécie de parasito intestinal obtido por técnicas parasitológicas microscópicas em amostras individuais de três dias diferentes e em *pool* de amostras em Niterói, RJ

Parasito	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Pool
<i>Blastocystis</i> sp.	1	1	3	2
<i>Endolimax nana</i>	2	0	2	3
<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> / <i>E. hartmani</i>	2	0	1	2
<i>Giardia duodenalis</i>	1	1	1	1
<i>Enterobius vermicularis</i>	0	0	0	1

Tabela 3 - Resultado de positividade por gênero/espécie de parasito intestinal obtido por técnicas parasitológicas microscópicas em amostras individuais de dois dias diferentes e em *pool* de amostras em Niterói, RJ

Parasito	Dia 1	Dia 2	Pool
<i>Blastocystis</i> sp.	1	3	2
<i>Endolimax nana</i>	2	2	2
<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> / <i>E. hartmani</i>	1	1	1
<i>Giardia duodenalis</i>	1	1	1

DISCUSSÃO

A maioria dos indivíduos que entregaram amostra fecal coletou pouca quantidade de material, apesar das orientações orais e escritas, o que resultou na inserção nesse estudo de 24 indivíduos. A literatura aponta a importância da coleta de pelo menos 50 mL de amostra fecal ou de fezes inteiras, possibilitando que o profissional responsável pelo diagnóstico possa escolher a porção mais provável de ter o diagnóstico positivo,⁽⁷⁾ ou realizar mais de uma técnica, aumentando a sensibilidade do diagnóstico. Tal fato fundamenta-se na dispersão heterogênea de formas evolutivas de parasitos intestinais nas fezes eliminadas pelo hospedeiro, associada à espécie parasitária.^(7,23) A pouca quantidade de material fecal entregue interferiu na seleção de amostras, como também pode ter influenciado na eficácia do diagnóstico, apesar de ter sido realizada a orientação quanto à coleta de amostras. Essa situação demonstra a importância da orientação na coleta de amostras pelos profissionais de saúde como enfermeiros, técnicos em enfermagem, técnicos em laboratório de análises clínicas, farmacêuticos, biólogos e biomédicos, a fim de minimizar erros no diagnóstico parasitológico por microscopia.

Outro fator complicador no diagnóstico parasitológico é a coleta de múltiplas amostras. Apesar de autores como Andrews,⁽¹²⁾ Sawitz e Faust,⁽¹³⁾ Hiatt et al.⁽⁹⁾ e Cartwright⁽¹⁴⁾ defenderem que a coleta de amostras múltiplas resulta em maior eficácia no diagnóstico, esse procedimento repre-

senta um fator limitante. Hira et al.⁽²⁴⁾ relataram que o uso de amostra múltiplas nem sempre é solicitado pelo médico devido a ser inconveniente, demorar muito tempo para processamento e seu resultado não ter influência direta no tratamento, associado à relutância do paciente em realizar esse tipo de coleta, no caso de infecções por *Strongyloides stercoralis*. Observou-se no presente estudo que vários participantes entregaram duas amostras e que a não adesão ao estudo por outros pode ter sido associada a esse fato.

No presente estudo, houve casos de discordância entre os resultados por gênero/espécie entre as amostras individuais de dias diferentes. Essa situação pode estar relacionada à liberação intermitente de formas evolutivas por alguns parasitos intestinais, como relatado nos estudos de Tsuchiya,⁽²⁵⁾ para *Giardia duodenalis*, e de Vennila,⁽²⁶⁾ para *Blastocystis* sp.

A concordância da análise de amostras em *pool* e de amostras individuais mostrou-se, segundo a classificação de Landis e Koch,⁽²⁷⁾ como substancial, o que indica que houve concordância de resultados positivos em 80% das amostras. Resultados similares foram obtidos por Peters et al.,⁽¹⁵⁾ que, em 123 conjuntos, verificaram maior eficiência do *pool*; por Wahlquist et al.,⁽⁸⁾ que avaliaram 267 amostras em *pool* com os resultados de suas amostras individuais preservadas em formalina para diagnóstico de *Giardia duodenalis*, sugerindo que o uso de amostras em *pool* pode ser útil no diagnóstico de *Giardia duodenalis*, economizando tempo e dinheiro; por Aldeen et al.,⁽¹¹⁾ que analisaram comparativamente amostras de 265 pacientes, concluindo que o *pool* não promove a diluição de formas evolutivas de parasitos a ponto de não serem detectadas pelas técnicas de rotina, e Libman et al.,⁽¹⁶⁾ que avaliaram 231 pares de amostras e verificaram que o *pool* apresentou a mesma sensibilidade para detecção da presença de protozoários quanto à análise individual das mesmas amostras, com melhor custo-benefício. A análise de amostras em *pool*, como já apontado pelos autores anteriormente apresentados, representa economia de tempo e de custo na rotina laboratorial.

Entretanto, a diferença estatística entre os resultados do uso de amostras individuais de dois ou três dias associados e os do em *pool* não foi significativa, embora numericamente os resultados do uso de amostras individuais em conjunto tenham garantido maior eficácia no diagnóstico para obtenção de resultados positivos, porém implica maior custo e tempo. De forma similar, quando se comparou o resultado do *pool* com o resultado da análise de apenas uma amostra individual, não houve diferença estatística significativa ($P=0,75$), indicando que, estatisticamente, no grupo de amostras analisadas não há diferença entre o uso de uma única amostra fecal ou do *pool* de amostras. Cabe ressaltar que o *pool* obteve, em número absoluto, um maior número de amostras positivas, o que o torna uma estraté-

gia mais interessante do que amostra única. A diferença de resultado obtido em números absolutos representou diagnóstico positivo em maior número de indivíduos, que, em casos de parasitos patogênicos, torna-se importante na prevenção de doença e transmissão.

Branda et al.⁽²⁸⁾ propõem que, em procedimentos envolvendo múltiplas amostras, para redução de tempo e custo, deve-se analisar uma única amostra. Quando o resultado dessa amostra individual for negativo e os sintomas persistirem, deve-se analisar a segunda e/ou terceira amostra. Wahlquist et al.⁽⁸⁾ propuseram que, em caso de *pool* negativo e suspeita clínica de infecção por *Giardia duodenalis*, deve-se fazer análise de amostras individuais de dias diferentes. Da mesma forma, sugere-se, nesse estudo, que, em casos de *pool* negativo em pacientes sintomáticos, seja realizada a repetição do exame nas amostras individualizadas para minimizar o efeito de diluição de formas evolutivas de parasitos determinado pelo *pool* de amostras fecais.

Nesse estudo foi observado que, quando apenas uma das amostras individuais era positiva, o *pool* de amostras apresentou resultado negativo. Quando duas ou mais amostras eram positivas, o *pool* de amostras também foi positivo, o que concorda com os resultados obtidos por Wahlquist et al.⁽⁸⁾ Torna-se, dessa forma, importante que, no laboratório de análises clínicas, quando forem processadas amostras em *pool*, que o responsável técnico guarde parte das amostras individualizadas para repetição, caso necessário, evitando o degaste de nova coleta pelo paciente.

Considerando a proposta de Morris et al.⁽²⁹⁾ de análise de uma única amostra fecal, nesse estudo, o exame individual de uma única amostra determinou positividade de 72,7% (8/11) dos indivíduos positivos. Esse resultado foi similar ao obtido por Cartwright (1999), que obteve com uma única amostra individual eficácia em 75,9% dos resultados e diferiram dos relatados por Morris et al.⁽²⁹⁾ que obtiveram 93,3% de eficácia e Senay e Macpherson,⁽³⁰⁾ que alcançaram 93,5%. A adição de uma segunda análise determinou positividade em 9/11 (81,8%) indivíduos, sendo similar ao obtido pelo *pool*. Apesar desse aumento de eficiência, os resultados obtidos foram inferiores aos obtidos por Cartwright.⁽¹⁴⁾ A maior eficiência foi atingida pelo uso de três amostras de dias diferentes. Considerando o trabalho e custo de processamento de duas amostras individuais, o *pool* demonstrou ser a estratégia mais adequada.

A diferença de diversidade de espécies em amostras em *pool* quando comparadas com amostras individualizadas também foi observada por Peters et al.,⁽¹⁵⁾ onde foi observada menor diversidade no *pool*, sendo contrário ao observado nesse estudo. O *pool* de amostras permitiu o diagnóstico de maior diversidade parasitária do que as amostras individuais, no presente estudo. Tal fato pode ter sido devido ao fracionamento aleatório da amostra no momento

de porcionamento das alíquotas, apesar das amostras terem sido homogenizadas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, apesar do pequeno número de indivíduos inseridos no estudo, em função da quantidade enviada ao laboratório, possibilitou inferir que o uso de *pool* em análises de amostras múltiplas representa uma estratégia eficaz no diagnóstico parasitológico por microscopia. Essa estratégia reduz o tempo de processamento de amostras, resultando em menor custo com funcionário e infraestrutura, bem como a redução de gastos com bens de consumo e bens permanentes no laboratório de análises clínicas, gerando um resultado tão eficaz e confiável como a análise de amostra individualizada.

Abstract

Objective: The use of multiple fecal samples of different days has been recommended in order to increase the effectiveness of intestinal parasitosis diagnosis. This strategy increases processing time and costs. Alternatively, some routines adopt the analysis of samples in pool. This study aimed to compare the results of individual and pooled samples in parasitological diagnosis by microscopy.

Methods: Samples of 24 individuals were processed individually and pooled by the modified Ritchie, Lutz and Faust et al. techniques.

Results: Of the 24 participants, 11 (45, 8%) were positive to evolutive forms of protozoa and helminths. In nine positive samples the results between samples had a substantial agreement (K=0, 80) which was confirmed by statistical analysis ($p < 0, 0001$). However, when was analyzed the association between the approaches employed evaluating individual analysis vs. analysis in pool in the present study it was observed that there was no statistically significant difference between the positive rates ($p=0, 77$). When compared the results of using only a single sample and the pool samples, the difference was not significant, indicating that there is no difference between using a single sample or pooled samples in the samples group analyzed statistically, although the pool samples have increased the positive results. **Conclusion:** In this study the use of pooled stool is an effective strategy in parasitological microscopy, reducing processing time and improving cost-effective, producing more effective and reliable results.

Keywords

Parasitological analysis; Feces; Parasites; Routine diagnostic tests

REFERÊNCIAS

1. Moura EC, Bragazza L, Coelho MF, Aun SM. Prevalence of intestinal parasitosis in schoolchildren. J Pediatr (Rio J). 1997;73(6): 406-10. [Article in Portuguese]
2. Chieffi PP, Amato Neto V. Vermes, verminoses e a saúde pública. Cienc. Cult. 2003; 55(1):41-3.
3. Halabe Cherem J, Than Gómez MT, Cortés Lawrenz J, Laredo Sánchez F, Wachter Rodarte N, Lifshitz Guinzberg A, et al. An approach to re-evaluating fecal parasitological examinations. Gac Med Mex. 1992;128(2):134-7. [Article in Spanish]
4. Menezes RAO, Gomes MSM, Barbos FHF, Machado RLD, Andrade RF, Couto AARD. Sensibilidade de Métodos Parasitológicos para o Diagnóstico das Enteroparasitoses em Macapá - Amapá, Brasil. Rev. Biol. Ciências da Terra. 2013;13(2):66-73.

5. Tibiriça SHC, Abramo C, Simões AS, Pinheiro IO, Ribeiro LC, Coimbra ES. Validação do número de lâminas para realização do método de sedimentação espontânea das fezes. *Hu Revista*. 2009;35(2):105-10.
6. Navone GT, Gamboa MI, Kozubsky LE, Costas ME, Cardozo MS, Sisliauskas MN, Gonzalez M. Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico. *Parasitol. latinoam.*, Santiago. 2005;60(3-4):178-181.
7. Koontz F, Weinstock JV. The approach to stool examination for parasites. *Gastroenterol Clin North Am*. 1996;25(3):435-49.
8. Wahlquist SP, Williams RM, Bishop H, Addiss DG, Stewart JM, Finton RJ, et al. Use of pooled formalin-preserved fecal specimens to detect *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol*. 1991;29(8):1725-6.
9. Hiatt RA, Markell EK, Ng E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53(1):36-9.
10. Fernandes S, Beorlegui M, Brito MJ, Rocha G. Protocolo de parasitoses intestinais. *Acta Pediatr. Port*. 2012;43(1):34-40.
11. Aldeen WE, Shisenant J, Hale D, Matsen J, Carroll K. Comparison of pooled formalin-preserved fecal specimens with three individual samples for detection of intestinal parasites. *J Clin Microbiol*. 1993;31(1):144-5.
12. Andrews J. The diagnosis of intestinal protozoa from purged and normally passed stools. *J Parasitol* 1934;20:253-4.
13. Sawitz WG, Faust EC. The probability of detecting intestinal protozoa by successive stool examinations. *Am J Trop Med*. 1942;22(2):131-6.
14. Cartwright CP. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(8):2408-11.
15. Peters CS, Hernandez L, Sheffield N, Chittom-Swiatlo AL, Kocka FE. Cost containment of formalin-preserved stool specimens for ova and parasites from outpatients. *J Clin Microbiol*. 1988;26 (8):1584-5.
16. Libman MD, Gyorkos TW, Kokoskin E, Maclean JD. Detection of pathogenic protozoa in the diagnostic laboratory: result reproducibility, specimen pooling, and competency assessment. *J Clin Microbiol*. 2008;46(7):2200-5.
17. Mekonnen Z, Meka S, Ayana M, Bogers J, Vercruysse J, Levecke B. Comparison of individual and pooled stool samples for the assessment of soil-transmitted helminth infection intensity and drug efficacy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2189.
18. Kure A, Mekonnen Z, Dana D, Bajiro M, Ayana M, Vercruysse J, et al. Comparison of individual and pooled stool samples for the assessment of intensity of *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminth infections using the Kato-Katz technique. *Parasites & Vectors*. 2015;8(1):489.
19. Lutz A. *Schistosomum mansoni* and Schistosomiasis observed in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1919;11(1):121-55.
20. Ritchie LS. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull U S Army Med Dep*. 1948; 8(4):326.
21. Young HK, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J. Clin. Microbiol*. 1979;10(6):852-3.
22. Faust EC, D'Antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, et al. A critical study of clinical laboratory technics of the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I - Preliminary communication. *Amer. J. trop. Med*. 1938;18:169-83
23. Gonçalves AL, Belizário TL, Pimentel Jde B, Penatti MP, Pedroso Rdos S. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):191-3.
24. Araujo AJUS, Kanamura HY, Dias LCS, Gomes JF, Araújo SM. Coprotest® quantitativo: quantificação de ovos de helmintos em amostras fecais utilizando-se sistema de diagnóstico comercial. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro. 2003;39(2):115-24.
25. Hira PR, Al-ali F, Shweiki HM, Abdella NA, Johny M, Francis I, et al. Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004;98(3):261-70.
26. Tsuchiya H. A study on variabilities in dimensions and numbers of discharged cysts of *Giardia lamblia* (Stiles, 1915) from day to day under normal conditions. *Am J Epidemiol*. 1931;13(2):544-67.
27. Vennila GD, Suresh Kumar G, Khairul Anuar A, Rajah S, Saminathan R, Sivanandan S, et al. Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 1999;85(2):162-4.
28. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
29. Branda JA, Lin TY, Rosenberg ES, Halpern EF, Ferraro MJ. A rational approach to the stool ova and parasite examination. *Clin Infect Dis*. 2006;42(7):972-8.
30. Morris AJ, Wilson ML, Reller LB. Application of rejection criteria for stool ovum and parasite examinations. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(12):3213-6.
31. Senay H, MacPherson D. Parasitology: diagnostic yield of stool examination. *CMAJ*. 1989;140(11):1329-31.

Correspondência

Claudia Maria Antunes Uchôa

Laboratório de Bioagentes Ambientais

Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP)

Instituto Biomédico (CMB)

Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ)

Rua Prof. Hernani Pires de Melo, n° 101

24210-130 – Niterói - RJ, Brasil

tel: (21) 2629-2426

claudiauchoa@vm.uff.br

Hemoglobinopatias: relato de caso familiar

Hemoglobinopathies: family case report

Luiza Cristina de Moraes Silva¹

Frank Sousa Castro¹

Resumo

As hemoglobinopatias, devido à sua alta morbidade e mortalidade, têm sido consideradas um problema de saúde pública no Brasil, onde ainda existem muitos casos de pacientes sem diagnóstico e aconselhamento genético, para que possam então decidir sobre a geração de sua prole. O presente estudo analisou o caso de uma criança com suspeita de anemia falciforme juntamente com seu grupo familiar composto por trinta indivíduos. Os testes realizados foram: eritrograma, eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, teste de falcização, dosagem de hemoglobina A2. Indivíduos do grupo familiar com casos inconclusivos foram submetidos a Cromatografia Líquida de Alta Performance. Os resultados obtidos foram: três casos de portadores de traço falciforme, cinco casos de β -talassemia e um indivíduo portador de HbAS/ β -talassemia. Os resultados demonstraram a importância do diagnóstico precoce e da triagem populacional para os indivíduos pertencentes a este grupo familiar; assim poderão ser informados, através de aconselhamento genético, sobre os possíveis riscos para a geração futura de sua família, pois trata-se de uma doença que causa anemia hemolítica crônica incurável.

Palavras-chave

Anemia falciforme; Talassemia beta; Hemoglobinopatias; Traço falciforme; Aconselhamento genético

INTRODUÇÃO

Hemoglobinopatias são doenças que acometem os genes responsáveis pela síntese das hemoglobinas. O principal exemplo é a anemia falciforme, que é uma hemoglobinopatia genética, hereditária, de alta morbimortalidade.⁽¹⁾ Essa anemia é caracterizada por uma mutação pontual (GAG-GTG) nos genes da globina beta da molécula de hemoglobina, acarretando substituição de aminoácido ácido glutâmico por valina na sexta posição, originando a hemoglobina anômala S (HbS).⁽²⁾

A hemoglobina S pode se manifestar de três formas: Anemia falciforme, doença falciforme e traço falciforme. A anemia falciforme manifesta-se em indivíduos homocigotos para a hemoglobina S, a doença falciforme em pacientes heterocigóticos em combinação com outras hemoglobinas anormais com grau de gravidade variado: interação da hemoglobina C (Hb SC), associação com talassemia beta (lesão parcial [β^+] ou total [β^0] do gene β),⁽³⁾ e o traço falciforme, que se manifesta em interação com hemoglobina normal A. As HbS e C são de origem da raça negra, enquanto que as talassemias são de origem mediterrânea. Po-

rém, a intensa miscigenação no Brasil favorece o aparecimento de associações de hemoglobinopatias em um mesmo indivíduo (HbS/talassemias).⁽⁴⁾

As complicações clínicas podem ser raras para alguns indivíduos que possuem a mutação em apenas um gene (AS), enquanto que, para outros, associados a determinados fatores químicos e ambientais, a sintomatologia pode ser relativamente frequente, conferindo a estes indivíduos uma importância clínica.⁽⁵⁾ As características físico-químicas das moléculas da hemoglobina S diferentemente de Hemoglobina A, levam a polimerização, ocasionando a deformação dos eritrócitos, que passam a ser denominados de células em foice.⁽²⁾

As alterações laboratoriais encontradas com maior frequência na anemia falciforme são diminuição nos valores séricos de hemoglobina e hematócrito, aumento do número de reticulócitos e diminuição no tempo de vida das hemácias. O diagnóstico laboratorial da anemia falciforme consiste na identificação da HbS por meio dos testes, de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, focalização isoeletrica e ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC), que é considerado padrão ouro.⁽⁶⁾

¹Acadêmica. Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás – Goiânia - GO, Brasil.

²Mestre. Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás – Goiânia - GO, Brasil.

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás – Goiânia - GO, Brasil.

Artigo recebido em 15/02/2017

Artigo aprovado em 20/07/2017

DOI: 10.21877/2448-3877.201700567

Dentre as complicações clínicas mais frequentes em pacientes portadores da anemia falciforme estão a anemia hemolítica crônica, a vasculopatia cerebral, insuficiência renal, pulmonar e cardíaca, as crises dolorosas agudas osteoarticulares, as lesões crônicas com asplenia funcional, que ocorrem por conta da oclusão da microvasculatura com isquemia tecidual.^(2,7)

A β -talassemia em sua forma heterozigota (β -talassemia menor) tem como característica a elevação dos níveis séricos de Hb A2 e/ou Hb Fetal em casos clássicos, e em sua forma mais grave, a β -talassemia maior, caracteriza-se geralmente pela ausência completa da síntese de cadeias beta globínicas e anemia grave.^(8,9)

Esse artigo teve como objetivo, avaliar um grupo familiar, e demonstrar a importância do diagnóstico precoce das hemoglobinopatias, tanto em indivíduos em homozigose quanto em heterozigose.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os indivíduos do estudo tiveram cadastros realizados e os resultados liberados, no sistema de gestão laboratorial PC Lab Online®. Todas as etapas realizadas no trabalho ocorreram no período de Dezembro de 2015 a Abril de 2016. O trabalho foi realizado com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da PUC-GO, parecer 235.376 de 20/03/2013.

Grupo familiar

Foi realizado um estudo em um grupo familiar contendo trinta indivíduos, sendo pai e avô da criança não pertencentes à mesma linhagem sanguínea, atendidos no Laboratório Clínico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (LAC-PUC-GO), sob investigação de traço falciforme.

Exames laboratoriais

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação do eritrograma, eletroforese de hemoglobinas em pH alcali-

no, teste de falcização e dosagem de hemoglobina A2. Para a realização dos exames foram coletados de 4 a 5 mL de sangue total, em tubo contendo anticoagulante EDTA (Figura 1).

Eritrograma

Os eritogramas foram realizados em Contador Hematológico XE-2100D da Sysmex®, que determinou os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina total, hematócrito, índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) e o grau de anisocitose (RDW).

Eletroforese de Hemoglobinas em pH alcalino

Para a análise qualitativa das frações de hemoglobina, as moléculas foram separadas por eletroforese de hemoglobina em pH alcalino em fita de acetato de celulose e tampão Tris-glicina (TEB), sendo que o hemolisado foi preparado em uma placa de porcelana com 100 μ L de sangue total e 200 μ L de saponina a 1%. Em uma cuba eletroforética foram adicionados 50 mL de TEB em cada lado da cuba, com a fita estendida sobre a ponte do aparelho. A leitura dos resultados foi realizada após quarenta minutos, segundo técnica descrita por Naoum PC.⁽²⁾

Teste de Falcização

Utilizaram-se 5 μ L de sangue total e 10 μ L de metabisulfito de sódio a 1% aplicados em uma lâmina, cobertos por uma lamínula vedada com esmalte. Feito isso, a lâmina foi colocada em câmara úmida em repouso por 24 horas e, após, realizada a leitura segundo técnica descrita por Naoum PC.⁽²⁾

Dosagem de Hemoglobina A2

A dosagem de Hemoglobina A2 foi realizada pelo método de intercâmbio iônico sem interferência de HbS utilizando o kit comercial da BioSystems®. O hemolisado foi preparado com 50 μ L de sangue total e 200 μ L de água purificada. Após, o procedimento foi realizado de acordo

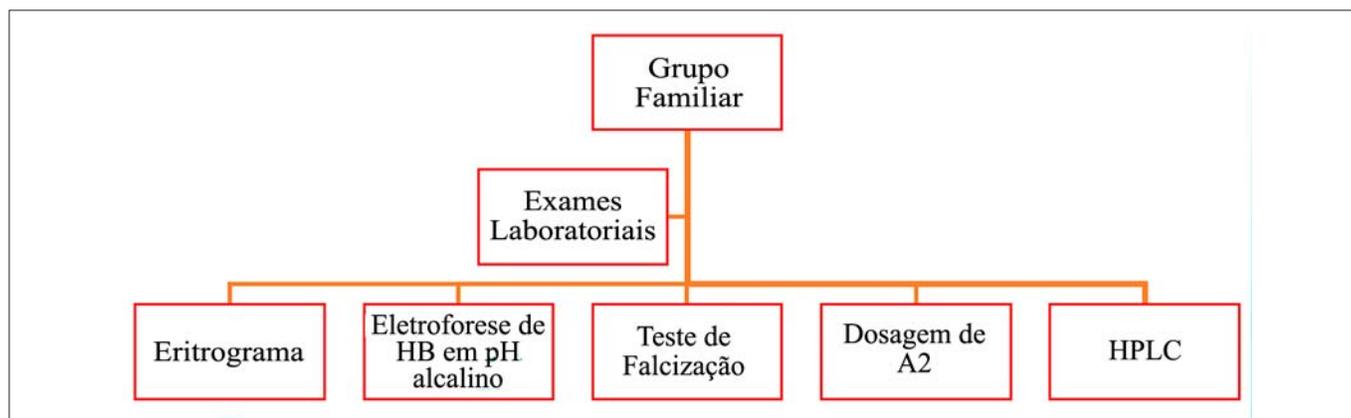


Figura 1. Fluxograma metodológico.

com as recomendações do kit. Foi feita a leitura em espectrofotômetro da marca Celm®, em comprimento de onda de 415 nm.

RELATO DE CASO

Paciente PLMSJ, sexo masculino, seis meses de idade, foi encaminhado para uma entidade de defesa de direitos, filantrópica e de utilidade pública de sua região após realização do teste do pezinho com suspeita de anemia falciforme. Ao comparecer à unidade, os pais foram informados que o sangue do mesmo ainda estava muito neonato e não poderia ser concluído o diagnóstico. Foram orientados a retornar à unidade quando a criança completasse 1 ano para realizar novos exames. A mãe GMS, e o pai OJJ procuraram o LAC-PUC-GO, para realização de exames e investigação da possível doença. Foi então iniciado um estudo do grupo familiar, onde todos os familiares procuraram o laboratório para a realização dos exames. Os bisavós maternos da criança, já falecidos, possuem dez filhos, dos quais nove compareceram à unidade com seus respectivos descendentes para realização dos exames, não sendo possível obtenção de dados do grupo familiar paterno (Figura 1).

Histórico familiar

A avó da Criança, VMAS, 57 anos, apresentou resultados compatível com traço falciforme (eritrograma normal,

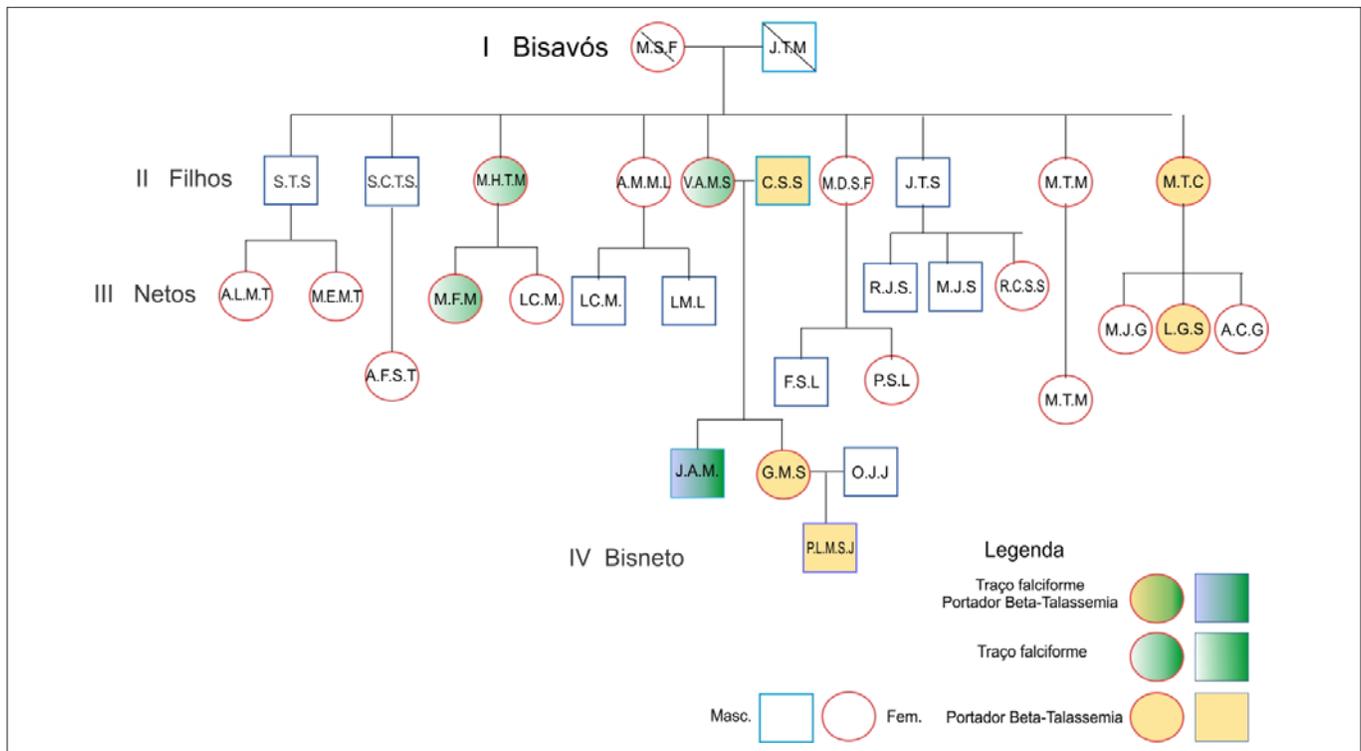
eletroforese em pH alcalino HbA/S, teste de falcização positivo).

O avô da criança, CSS, 58 anos, apresentou resultado compatível β-talassemia menor (eritrograma: microcitose moderada, hipocromia leve, anisocitose e presença de hemácias em alvo, dosagem de HbA2 - 4,5% [VR= 1,30 a 3,70%]). O tio materno, JAMS, 29 anos, apresentou uma associação de HbS e β-talassemia menor (eritrograma normal, eletroforese em pH alcalino perfil HbA/S, teste de falcização positivo, dosagem de HbA2 - 4,90%).

A tia-avó, MHTM, 48 anos, e uma de suas filhas (LCMS, 22 anos) obtiveram resultados compatível com traço falciforme (MHTM: eritrograma normal, eletroforese em pH alcalino perfil HbA/S, teste de falcização positivo, Dosagem de HbA2 - 2,48%. LCMS: eritrograma normal, eletroforese em pH alcalino perfil HbA/S, teste de falcização positivo, dosagem de HbA2 - 3,10%).

MTC, tia-avó, 69 anos, e uma de suas filhas (LGS) obtiveram resultados compatível com β-talassemia menor (MTC: heritrograma: anemia normocítica e normocrômica, eletroforese em pH alcalino perfil HbAA, teste de falcização negativo, dosagem de HbA2 - 4,64%. LGS: eritrograma normal, eletroforese em pH alcalino perfil HbAA, teste de falcização negativo, dosagem de HbA2 - 4,50%).

Os demais indivíduos do grupo familiar, apresentaram resultados dentro dos valores de referência esperado (Figura 2).



Histórico da criança

PLMS, no primeiro ano de vida, o eritrograma revelou anemia microcítica e hipocrômica. Ao se observar a lâmina, foi constatada a presença de microcitose moderada, hipocromia leve, anisocitose e hemácias em alvo. A eletroforese em pH alcalino revelou perfil HbA/F, o teste de falcização foi negativo, dosagem de HbA2 - 3,50%. A mãe apresentou no eritrograma alterações de VCM e HCM; em microscopia foi observada microcitose e hipocromia leve. A eletroforese em pH alcalino revelou perfil HbAA, teste de falcização negativo, dosagem de HbA2 - 5,20%. O pai da criança apresentou todos os resultados dentro dos padrões de normalidade. Ao comparecer novamente na unidade, no dia 07/04/2016, após a criança completar um ano, novos exames foram realizados na mãe, na criança e no pai pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), para elucidação dos resultados inconclusivos, que confirmaram a elevação dos níveis de HbA2 da mãe e Hb Fetal da criança e os resultados normais do pai (Tabela 1).

Os dados analisados, mostraram que a criança, possui β -talassemia menor. Todos os membros do grupo familiar até então não possuíam nenhum tipo de diagnóstico.

Foi possível observar que a mãe e o avô materno são portadores de β -talassemia menor, e a avó materna, portadora de traço falciforme. Ambos não tiveram o aconselha-

mento genético para decidir sobre a geração de sua prole. Assim, o filho mais novo e tio da criança herdou cada um dos genes dos pais, sendo portador de HbS/ β -talassemia menor. Gasparini et al.⁽⁴⁾ também observaram em um relato de caso na Argentina a associação entre β -talassemia e hemoglobinopatia S, reforçando a associação entre ambas as alterações, devido à intensa miscigenação mundial.

Guimarães et al.⁽¹⁰⁾ descreveram a importância do aconselhamento genético na resolução de problemas no campo da hereditariedade, ajudando a compreender sobre as características da doença, os possíveis riscos de recorrência em seus familiares, envolvendo todos os aspectos, sendo eles educacionais e reprodutivos, para que eles possam decidir futuramente sobre a sua continuação familiar.

No histórico familiar foram observados dois casos de beta talassemia e três casos de traço falciforme em pacientes isolados.

Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) de 2008, do Ministério da Saúde, nascem no Brasil 3 mil crianças por ano com Doença Falciforme (DF) e 200 mil com traço falciforme. Devido à prevalência elevada no Brasil, é considerado um problema de saúde pública.^(3,5) Como os bisavós da criança são falecidos não foi possível esclarecer a origem da β -talassemia menor ou a origem do traço falciforme.

Tabela 1- Resultados do teste Cromatografia Líquida de Alta Performance para confirmação do diagnóstico

Pacientes	HPLC			
	Hemoglobina A	Hemoglobina A2	Hemoglobina S	Hemoglobina Fetal
Mãe	92.4%	5.6%	0.0%	2.0%
Pai	96.7%	3.0%	0.0%	0.3%
Criança	71.2%	3.3%	0.0%	25.5%
Valores de Referência	94.30 a 96.50%	2.50 a 3.50%	0.0%	0.00 a 2.00%

Fonte: sistema de gestão laboratorial PC Lab Online®

CONCLUSÕES

O aconselhamento genético para portadores heterozigotos do traço falciforme é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), evidenciando o diagnóstico precoce, pois se trata de um problema de saúde pública. O casamento de dois heterozigotos HbA/S ou o casamento de indivíduos HbA/S com heterozigotos portadores de outras hemoglobinopatias, como por exemplo a β -talassemia menor, relatada no presente estudo, pode gerar crianças com anemias hemolíticas crônicas e incuráveis. Essas pessoas que apresentam risco de gerar filhos com a doença falciforme têm o direito de serem informadas pelo aconselhamento genético dos possíveis riscos e características da doença, respeitando os aspectos hereditários e demais informações clínicas da doença.

Abstract

Hemoglobinopathies, due to their high morbidity and mortality, have been considered a public health problem in Brazil, where there are still many cases of patients without diagnosis and genetic counseling, so that they can then decide on the generation of their offspring. The present study analyzed the case of a child suspected of having sickle cell anemia together with his family of 30 individuals. The tests performed were erythrogram, hemoglobin electrophoresis at alkaline pH, sickle cell test, hemoglobin A2 dosage. Individuals from the family group With inconclusive cases were submitted to High Performance Liquid Chromatography. The results were: three cases of patients with sickle cell trait, five cases of β -thalassemia and one individual with HbAS/ β -thalassemia. The results demonstrated the importance of early diagnosis and population screening for individuals belonging to this family group, thus, they can be informed through genetic counseling about the possible risks to the future generation of their family, since it is a disease that causes incurable chronic hemolytic anemia

Keywords

Sickle cell anemia; beta-Thalassemia; Hemoglobinopathies; Sickle cell trait; Genetic counseling

REFERÊNCIAS

1. Eufemia J, Christine M, Marilyn S, Judith EB, Marsha TLS. Changes in sleep, food intake, and activity levels during acute painful episodes in children with sickle cell disease. *J Pediatr Nurs*. 2006; 21(1):23-34.
2. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília: Anvisa, 2002. 142p.
3. Pace B, editor. Renaissance of sickle cell disease research in the Genome Era. London: Imperial College Press; 2007.
4. Gasparini NP, Agriello EE, Zanella MJ, Jommi MP, Maradei J, Sandoval MJ. Síndrome Drepanocítico. *Asociación De Hemoglobina S Y β Talasemia*. *Medicina B Aires*. 2016;76(6):369-72.
5. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Doença falciforme: Condutas básicas para tratamento. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2012. 13-15p.
6. Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(4):204-10.
7. Zago M. A anemia falciforme e doenças falciformes. Manual de doenças mais importantes por razões étnicas na população afro-descendente. Brasília: Ministério da Saúde; 2001. p. 13-35.
8. Domingos ALB, Granzotto LA, Junior EB, Oliveira TYK, Domingos ACB, Bonini-Domingos CR. Perfil de beta talassemia heterozigota obtido a partir de análise data mining em banco de dados [Carta]. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009;32(1):78-9.
9. Trigo LAMC, Surita FG, Parpinelli MA, Pereira BG, Fertrin KY, Costa ML. Talassemia beta maior e gestação na adolescência: relato de dois casos. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015;37(6):291-6.
10. Guimarães CTL, Coelho GO. A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme. *Cien & Sau Col*, 15(Supl. 1):1733-1740, 2010.

Correspondência

Luíza Cristina de Moraes Silva
Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas
Avenida Universitária, 1440 - Setor Universitário
74605-010 - Goiânia - GO, Brasil



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC], criada em 1969, é o órgão oficial de divulgação científica da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas [SBAC]. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no LILACS [Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde].

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC] é publicada em português e inglês e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária.

Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em ".pdf". As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de conflito de interesse é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde [CNS] e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa [CONEP]. A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 466/2012) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa [CEP] da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em ".pdf" da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [CONCEA] e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [COBEA], bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA] deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado, explicitamente, no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais [CEUA] da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em ".pdf" da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde [OMS], do International Committee of Medical Journal Editor [ICMJE] e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry [ANZCTR], International Standard Randomised Controlled Trail Number [SRCTN], Netherlands Trial Register [NTR], UMIN Clinical Trials Registry [UMIN-CTR], WHO International Clinical Trials Registry Platform [ICTRP]. No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>) do Ministério da Saúde [DECIT/MS], Organização Panamericana de Saúde [OPAS] e Fundação Oswaldo Cruz [Fiocruz]

é igualmente aceito pela RBAC. O número de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção Material e Métodos.

Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou, eventualmente, pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados pelos pareceristas/ revisores serão informados imediatamente aos autores.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunohematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categoriais de comunicação científica designadas abaixo:

ARTIGOS ORIGINAIS: trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

ARTIGOS DE REVISÃO: trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

COMUNICAÇÃO BREVE: trabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RELATO DE CASO: trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/abstract com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

NOTA TÉCNICA: Descrição/validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RESENHA: Revisão crítica de obra recém publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/abstract.

IMAGENS EM ANÁLISES CLÍNICAS: máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em ".jpg" ou ".tif" e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

CARTA AO EDITOR: correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na *Revista Brasileira de Análises Clínicas* ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnico-científicos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

EDITORIAIS: escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Deverão conter um máximo de 2000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é **enfaticamente** estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e de preferência, familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos. em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos.

A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a normalização técnica conforme o quadro abaixo.

ESTRUTURA DOS ARTIGOS	
Português	Inglês
Título Completo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Complete Title <i>Incluir versão em Português</i>
Título Corrido <i>Incluir versão em Inglês</i>	Running Title <i>Incluir versão em Português</i>
Autores	Authors
Resumo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Abstract <i>Incluir versão em Português</i>
Palavras-Chave <i>Incluir versão em Inglês</i>	Keywords <i>Incluir versão em Português</i>
Introdução	Introduction
Material e Métodos	Material and Methods
Ética	Ethics
Resultados	Results
Discussão	Discussion
Conclusão	Conclusion
Conflito de interesse	Conflicts of Interests
Suporte Financeiro	Funding Sources
Agradecimentos	Acknowledgements
Referências	References

TÍTULO COMPLETO: Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (exceto quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico.

TÍTULO CORRIDO: Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.

AUTORES: Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

RESUMO: Deverá ser redigido de forma impessoal, bem como ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado ainda de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

PALAVRAS-CHAVE: Deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chaves deverão ser extraídas do vocabulário DeCS [Descritores em Ciências da Saúde], elaborado pela Bireme, e/ou MeSH [Medical Subject Headings], elaborado pelo NLM [National Library of Medicine]. Os vocabulários DeCS (<http://decs.bvs.br/>) e MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

INTRODUÇÃO: Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

MATERIAL E MÉTODOS: Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção, deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como deverá ser feita a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também, claramente, indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

ÉTICA: Nesta seção, deverá ser declarado, textualmente, o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionado também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição a qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando, claramente, o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

RESULTADOS: Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

DISCUSSÃO: Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

CONCLUSÕES: Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

CONFLITOS DE INTERESSE: Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito "Não há conflitos de interesse".

SUPORTE FINANCEIRO: Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS: Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

TABELAS: O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto (ou amostra) a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra "Tabela", seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas

de rodapé (legendas), indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para notas de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excel e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

FIGURAS: Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias. Deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução (mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato ".jpg" ou ".tif" e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excel em formato ".doc", ".docx" ou ".xls" e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excel, caso não seja possível converter para formato ".tif". Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações serão colocadas deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverão ser enviados um número excessivo de figuras.

REFERÊNCIAS: As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédicas] pelo *International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE]* (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2611814/ (Versão em Português) ou em www.icmje.org/urm_full.pdf (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em *List of Journals Indexed in Index Medicus [National Library For Medicine]* (<http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt>). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. **A lista das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética.** Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de "resumo", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores.

As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

TEXTO: Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o Sistema de Chama-da Numérico. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parênteses. Os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

Observações Gerais:

- Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula "e" entre os sobrenomes;
- Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina "et al.";
- Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento deverão ser indicados/ tratados como autores;
- Nomes contendo mais de um sobrenome deverão ser indicado o último sobrenome, sem partículas de ligação como "de" ou "da";
- Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofes ou que formem uma expressão deverão ser indicados em seu conjunto;
- Termos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.

Alguns exemplos de citações:

- **Um/duos autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyaji⁽²⁶⁾ mudaram a denominação do fungo para *Hortaea werneckii*, em homenagem a Parreiras Horta.

- **Mais de dois autores:** Giannopoulos et al.⁽³²⁾ também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.

- **Autores corporativos:** De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabéticos,⁽¹⁷⁾ os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).

- **Editores/ Projetos editoriais:** Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,⁽⁵⁾ a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias.

- **Sem indicação de nome de autor:** O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.⁽¹⁴⁾

AUTORES: Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. **Todos os autores** deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

Observações Gerais:

- Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;
- Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;
- Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;
- Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livre-docência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;
- Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/ emissão recomendados pela NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.

- Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência como suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS: Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra deverá ser iniciada por letra maiúscula. O texto do título não deverá vir nem em negrito e nem em itálico e deverá ser finalizado por ponto.

TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO: Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita com a utilização de ponto e vírgula.

MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS: O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: *Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec*. No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais (445-449, utilizar: 445-9).

EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO: As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra "edição" no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição.

PARÁGRAFOS: Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

Alguns exemplos de referências:

Periódicos:

- **Um Autor:** Marques SA. Paracoccidiodomycosis. *Clin Dermatol*. 2012 Nov;30(6):610-5.
- **Mais de um autor:** Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. *Singapore Med J*. 2012 Sep;53(9):604-7.
- **Até seis autores:** Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui

S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. *Intern Med.* 2012;51(20):2967-71.

• **Mais de seis autores:** Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Nov;56(11):5898-906.

• **Autores pessoais e corporativos:** Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis.* 2012;16(3):205-42.

• **Volume com suplemento:** Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

• **Número com suplemento:** Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. *Cancer Control.* 2012; 19(4 Suppl):4-15.

• **Editorial com indicação de autoria:** Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int.* 2012;61(3):351-2.

• **Editorial sem indicação de título:** Bartels PD. Editorial. *Ugeskr Laeger.* 2012;174(42):2518.

• **Artigo/ Editorial sem indicação de autoria:** Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. *Proteomics.* 2012;12(19-20):2902-3.

• **Carta ao editor:** Dettkenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(8):139.

• **Artigo com DOI:** Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. *Pediatrics.* 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.

• **Autor corporativo:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012 Oct 19;61:839-42.

Livros:

• **Um autor/ mais de um autor:** Stockham SL, Scott MA. *Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

• **Autor de obra e de capítulo:** Rey L. *Bases da parasitologia médica.* 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

• **Capítulo:** Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Penteado MV. *Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

• **Responsabilidade intelectual destacada:** Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F, organizadores. *Ética em pesquisa: temas globais.* Brasília: Editora UNB; 2008.

Teses, Dissertações e Monografias:

• **Autor e indicação de grau:** Maranhão FCA. Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

Eventos Científicos:

• **Anais com indicação de título:** Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.

• **Anais com indicação de autoria, trabalho e título:** Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH, Dornelas-Ribeiro M, Maia S, et al. Espécies de *Candida* isoladas de pacientes leucêmicos. In: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007. p. 314.

Órgãos/ Instituições:

• **Um autor corporativo:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes.* Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

• **Mais de um autor corporativo:** Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. *Relatório de atividades: 2006.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.

Referências Legislativas:

• **Leis:** Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 20 set 1990; seção 1.

• **Decretos:** Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 29 jun 2011; seção 1.

• **Portarias:** Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. *Diário Oficial da União* 13 mai 1998; seção 1.

• **Resoluções:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. *Diário Oficial da União* 14 out 2005; seção 1.

Meios Eletrônicos:

• **Periódicos:** Mondelli AL, Niêro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf>.

• **Referências legislativas:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. *Diário Oficial da União* 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.unesp.br/pgp/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.

• **Eventos Científicos:** Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 4o. Congresso Virtual de Micologia de Hongos Patógenos em América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: <http://congresomicologia.ucv.ve>.

A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo **Sistema de Gestão de Publicações (SGP)**, no endereço: www.sgponline.com.br/rbac/sgp. Outras formas de submissão, não serão aceitas.

Observações Gerais:

• A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo SGP, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status;

• Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de *login* e senha;

• A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;

• O SGP atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;

• Pedidos de *fast-track* poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pós-graduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores. Os pedidos de *fast-track* deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.

MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da *Revista Brasileira de Análises Clínicas* - RBAC para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC. Declaramos também que o artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores. Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____/____/____.

AMOSTRAS PARA CONTROLE EXTERNO DA QUALIDADE

PRO-EX

Programa de Controle Externo da Qualidade

A RDC 302:2005 da ANVISA estabelece que o laboratório clínico deve realizar Controle Externo da Qualidade para todos os exames realizados na sua rotina. O PNCQ disponibiliza controles em diversas especialidades:

Análises Clínicas

Programa Básico:

Bioquímica

Hematologia

Imunologia

- ASO
- B-HCG
- Chagas
- HBsAg
- HIV
- Sífilis
- VDRL

Microbiologia

Espectrofotometria

Parasitologia

Reticulócitos virtual

Urinálise

EDUCAC

Programas Avançados:

Adenovírus **novos**

Alimentos/Microbiologia

Análise Físico Química de Água

Auto-Imunidade

Chikungunya IgG / IgM **novos**

Cistatina C

Citometria de Fluxo

Coagulação

D-Dímero

Dengue

Dengue NS1

Drogas de Abuso em Cabelo

Drogas de Abuso em Urina

Drogas Imunossupressoras

Drogas Terapêuticas

Eletroforese de Hemoglobina

Eletroforese de Proteínas

Espermograma

Fatores da Coagulação

Gasometria

Glicose TLR/POCT

Hematologia II

Hemoglobina Glicosilada

Hemoparasitologia

Hormônios

Imuno-Hematologia

Imunologia Especial

Imunologia 1 Avançada

Leishmaniose Visceral **novos**

Leptospirose

Líquido Cefalorraquidiano – LCR

Líquidos Cavitários

Marcadores Cardíacos

Marcadores Tumorais

Medicina Ortomolecular

Micologia

Micologia Virtual (Micológico Direto)

Microalbuminúria

Microbiologia de Água

Microbiologia de Água (Abastecimento)

Microbiologia de Água para Diálise

Microbiologia de Cosméticos

Rotavírus

Sangue Oculto

Toxicologia/Medicina do Trabalho

Triagem Neonatal

Urinálise II Avançada

Velocidade de Hemossedimentação (VHS)

Vitamina D

Zika vírus **novos**

Biologia Molecular

Citopatologia

Bancos de Sangue e Serviços de Hemoterapia



PNCQ[®]

Programa Nacional
de Controle de Qualidade

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Acesse o **CATÁLOGO DE PRODUTOS** em nosso site.



Nossas Certificações:



Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a ABNT NBR ISO 9001:2008 sob o número 23.008/04



Rua Vicente Licínio, 193 - Tijuca
Rio de Janeiro | RJ | CEP: 20270-340
Tel/Fax: 55 (21) 2569 - 6867
e-mail: pncq@pncq.org.br
Site: www.pncq.org.br