

Boletim do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Bol. Inst. Adolfo Lutz, ano 16, nº 1, p. 1 - 48, 2006



EXPEDIENTE

Dr. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro

Diretor-Geral do Instituto Adolfo Lutz

Cecília Cristina Marques dos Santos

Coordenadora Geral

Therezinha Travassos Ribeiro de Carvalho

Coordenadora Assistente

COORDENADORES DE ÁREAS:

Marilena Oshiro (até junho de 2006)

Neuza Kasumi Shirata (a partir de junho de 2006)

Therezinha Travassos Ribeiro de Carvalho

Área de Vigilância Epidemiológica

Márcia Regina Pennacino do Amaral (até junho de 2006)

Márcia Bittar Atui (até junho de 2006)

Christiane Asturiano Ristori (a partir de junho de 2006)

Maria Anita Scorsafava (a partir de junho de 2006)

Área de Vigilância Sanitária

Cecília Cristina Marques dos Santos

Divani Maria Capuano

Área de ações Básicas de Saúde

Rocely A. de Souza Bueno

Setor de Publicações da Biblioteca do I.A.L.

Sumário

Parasitoses intestinais oportunistas em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil	5
A atuação da microscopia na identificação da radícula de malte – Estudo de caso	7
Histórico do Microscópio Eletrônico (M.E.) EM-200 Phillips do Instituto Adolfo Lutz	9
Elucidação de surtos de doenças de veiculação hídrica ocorridos no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2004	10
Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga (STEC) em amostras de carne crua moída comercializadas no município de São Paulo	12
Elucidação de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos, no Estado de São Paulo, no período de julho de 2002 a dezembro de 2004	14
Sorologias reagentes para sarampo no período de 1997 a 2005 na área de abrangência do IAL de Ribeirão Preto-SP, Brasil	16
Coliformes, turbidez e cloro: parâmetros de importância epidemiológica na análise de águas de abastecimento público na região do Vale do Paraíba/SP	18
Implementação de banco de dados na Seção de Vírus Entéricos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.	20
Bioflavonóides e Quercetina: procedimento analítico por cromatografia em camada delgada para determinação de aflatoxinas	22
Máscara mortuária desinfecção e conservação	24
Avaliação Físico Química das Soluções Alternativas da Região de Abrangência do Instituto Adolfo Lutz Laboratório I Santo André (Proágua – 2002 a 2005)	25
Contagem de linfócitos T - CD4+ / CD8+ realizadas no Laboratório Regional de Rio Claro, em amostras de pacientes portadores do vírus HIV.	27
Avaliação laboratorial da Tuberculose Pulmonar em amostras analisadas pelo Laboratório Regional de Rio Claro – 2004 / 2005	29
Incidência das eritroenzimopatias na rotina da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz Central	32
Frequência de anemia microcítica-hipocrômica na rotina da Seção de Hematologia do IAL Central	34
Estudo da correlação cito-histológica realizado no Setor de Citologia Oncótica - Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz	36
Controle de material reciclado de embalagens plásticas de agrotóxicos, vazias	38

Reação de amplificação de ácidos nucleicos em <i>Cryptosporidium</i> sp: inibição, prevenção e controle	40
Influência da Modulação Imunológica Induzida pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) na Infecção Cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV)	44
Venenos de Anfíbios como Ferramentas de Novos Fármacos para Leishmaniose	46

Parasitoses intestinais oportunistas em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil

Fernando Rogério PAVAN, Madalena H. T. OKINO, Jandira Olimpia Francelino DA SILVA, Divani Maria CAPUANO

Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Ribeirão Preto, Setor de Parasitologia.

Os parasitas intestinais *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* têm sido apontados como agentes etiológicos de diarreia em pacientes com AIDS. No entanto, vários autores vêm demonstrando uma redução de doenças oportunistas associadas à AIDS desde a introdução da terapia antiretroviral combinada altamente eficaz (HAART)^{1,2}. Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência destes coccídeos em pacientes soropositivos para o HIV, atendidos nos Ambulatórios de DST/AIDS de Ribeirão Preto e região, e avaliar o comportamento da infecção parasitária após a introdução da HAART. Entre julho de 1990 a abril de 2005, foram examinadas fezes de 2878 pacientes (1812 homens e 1066 mulheres), diarreicas ou não, através do método do formol-éter³ com posterior coloração das lâminas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada⁴. Constatou-se 156 (5,4%) casos de criptosporidiose, 117 (4,1%) de isosporíase e 12 (0,4%)

de infecções mistas. Do total de pacientes investigados (n = 2878), quando comparamos os períodos 1990-1996 e 1997-2005, pré e pós-utilização da HAART, observa-se uma redução 1716 para 1162. Em relação à frequência de infecções parasitárias, houve uma diminuição na ocorrência de *Cryptosporidium* sp, de 6,4% para 4% e de infecções mistas de 0,6% para 0,2%, com aumento de 3,7% para 4,6% nas infecções por *I. belli* (Figura 1). Nota-se na Tabela 1 que comparando-se os períodos pré e pós-HAART, a elevação das infecções por *I. belli* ocorreu apenas no sexo feminino, de 1,8% para 5,1%. O Laboratório de Saúde Pública além de identificar a etiologia da diarreia em pacientes com AIDS, pode contribuir no esclarecimento de aspectos epidemiológicos dos agentes envolvidos na mesma, orientando tanto os clínicos na adoção de terapias eficazes, como os órgãos de vigilância na promoção de ações preventivas.

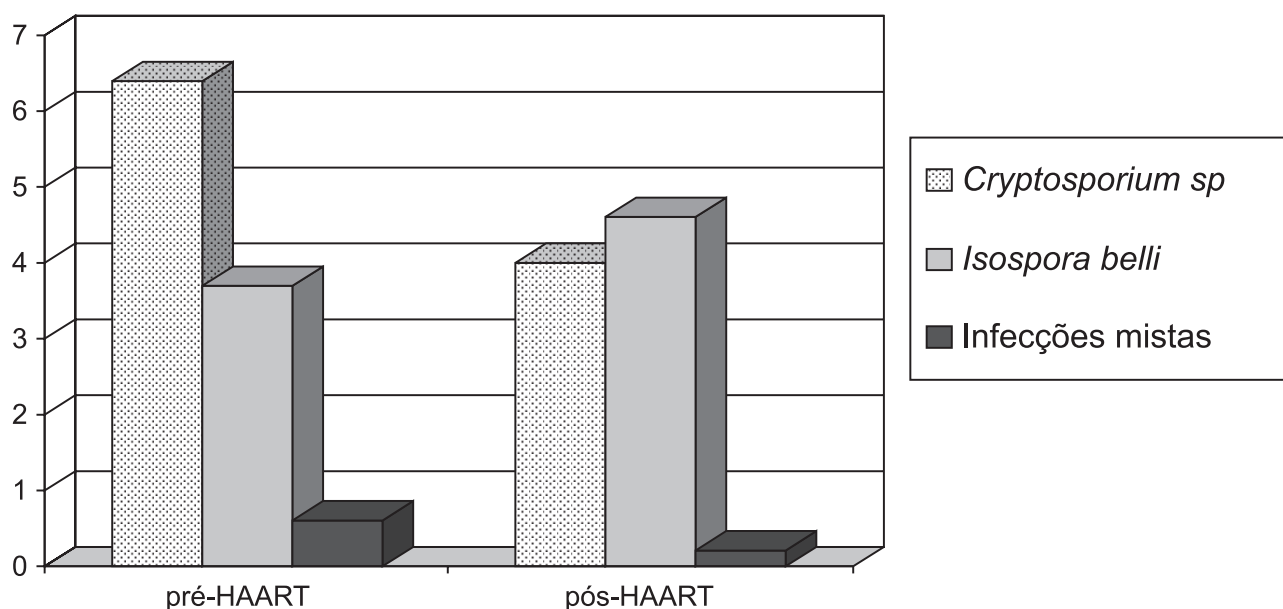


Figura 1. Presença de infecção parasitária entre pacientes soropositivos para o HIV, de acordo com os períodos pré e pós-HAART. Região de Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Tabela 1.– Comparação entre os períodos pré e pós-HAART quanto a presença de infecções parasitárias em pacientes soropositivos para o HIV, segundo o sexo. Região de Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Período	Sexo							
	Masculino				Feminino			
	Pré- HAART N =1117		Pós-HAART N = 695		Pré-HAART N = 599		Pós-HAART N = 467	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Cryptosporidium</i> sp	82	7,3	25	3,6	28	4,7	21	4,5
<i>Isospora belli</i>	53	4,7	29	4,2	11	1,8	24	5,1
Infecções Mistas	07	0,6	-	-	03	05	02	0,4

REFERÊNCIAS

1. Cimerman S. et al. Perfil das Enteroparasitoses diagnosticadas em pacientes com infecção pelo vírus HIV na era da terapia antiretroviral potente em um centro de referência em São Paulo, Brasil. **Parasitol. latinoam.**, 57:111-19, 2002.
2. Guimarães, M.D.C. Estudo temporal das doenças associadas à AIDS no Brasil, 1980-1999. **Cad. Saúde públ. (Rio de J.)**, 16: 21-36, 2000.
3. Dias, R.M.D.S. et al. Cryptosporidiasis among patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in the county of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 30(4): 310-12, 1988.
4. De Hovitz, J.A. et al. Clinical manifestation and therapy of *Isospora belli* infection in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **New England J. Med.**, 315(2): 87-90, 1986.

A atuação da microscopia na identificação da radícula de malte – Estudo de caso

Regina Maria Morelli Silva RODRIGUES, Augusta Mendes da SILVA, Laís Fernanda Callado de PAULI.

Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microscopia Alimentar

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) foi uma das primeiras plantas utilizadas para consumo humano, sendo atualmente uma das espécies de maior distribuição geográfica, assumindo a posição de quinto grão em ordem de importância econômica e social no mundo¹. O grão é utilizado na industrialização de bebidas (cerveja e destilados), composição de farinhas ou flocos para panificação, produção de medicamentos, formulação de produtos dietéticos e de sucedâneos de café. A cevada é ainda empregada na alimentação animal como forragem e na fabricação de rações, que constitui o principal uso em escala mundial (68% da produção)¹.

No Brasil a cevada é produzida em escala comercial desde 1930⁴. Diferente dos demais países, a malteação tem sido a principal aplicação econômica da cevada (85%), já que o país produz apenas 30% da demanda da indústria cervejeira¹. A produção está concentrada na Região Sul, onde a cevada é cultura de inverno importante para o sistema de exploração agrícola, devido à existência de indústria local de malte a cevada passando a ter igual importância a cultura do trigo⁶.

Há também registros de cultivo nos estados de Goiás e Minas Gerais. Atualmente, são mais de 140 mil hectares, numa produção 380 mil toneladas, destinadas a três maltarias instaladas no RS, PR e SP¹.

Para a indústria de cervejas é utilizada apenas a cevada padrão malte. Os grãos que não atingiram o padrão são comercializados a preços inferiores para a alimentação animal e correspondem a 8% da produção da cevada^{1,4}.

Em virtude da integração entre os segmentos do agronegócio, a cultura de cevada está em expansão, apresentando competitividade para continuar crescendo de forma sustentada, em tempos de globalização e intensa competição por mercados¹.

O consumo anual do malte pela indústria cervejeira brasileira está estimado em um milhão de toneladas, sendo que 70% dessa demanda provém de importação¹.

A malteação consiste na germinação do grão da cevada sob condições ambientais controladas, cujo objetivo principal é a obtenção de enzimas, que provocam

modificações nas substâncias armazenadas no grão sob condições ambientais controladas⁴. Dos resíduos de cervejaria são gerados alguns subprodutos que têm se tornado alternativas interessantes de alimentação animal, quando os custos dos concentrados encontram-se elevados. Estão entre eles a cevada úmida, a radícula de malte e o resíduo seco da fermentação, com boas características nutritivas, como fonte de proteína e energia².

A radícula de malte, apesar de possuir boas características nutritivas em sua composição química, tem pouca oferta no mercado, e sua disponibilidade está relacionada à proximidade de indústrias de malte².

O presente estudo objetivou identificar se um produto, enviado para análise na Seção de Microscopia Alimentar do IAL – Central, tratava-se de “radícula de malte”. Juntamente com esta foram enviados outros quatro produtos com as seguintes designações: cevada, malte germinado, radícula de malte e bagaço de cevada seco.

As interpretações foram atingidas através do aprofundamento teórico e prático, envolvendo a anatomia (fisiologia e morfologia) da cevada, com auxílio da microscopia e da literatura disponível.

Segundo a literatura, o grão de cevada é formado pelo tegumento, endosperma e embrião, sendo na realidade um fruto, e não uma semente como é conhecido³.

O tegumento é o revestimento do fruto, constituído por camadas celulares originadas dos integumentos ovulares. É resistente a água, essencial a germinação e a produção de açúcar, regulando a velocidade de hidratação da semente, além de promover a proteção das partes internas do grão^{3,5}.

O endosperma é a área de armazenamento, tecido de reserva de amido/malte, recoberto por uma camada de aleurona, constituída de células que armazenam proteína em abundância. Ele nutre o embrião durante seu desenvolvimento, podendo ou não ser completamente absorvido^{3,5}.

O embrião tem função reprodutiva e é formado por três partes: cotilédone, epicótilo (escutelo) e radícula. O cotilédone é o órgão de armazenamento de reservas alimentícias e fornecedor de compostos orgânicos, susten-

tando o crescimento do embrião durante a germinação. O epicótilo e a radícula compõem o eixo embrionário, com crescimento para duas direções, para as raízes e para o caule. O epicótilo, situado na extremidade superior do eixo embrionário é revestido por uma bainha protetora, coleótilo, e dá origem ao primórdio foliar. A radícula, envolvida pela coleoriza, é encontrada na extremidade inferior do eixo, da qual se originam as raízes^{3,5}.

Na germinação, processo fisiológico em que os órgãos do embrião se desenvolvem em função dos nutrientes armazenados, ocorre o rompimento das bainhas protetoras da radícula e do primórdio foliar, coleoriza e coleótilo, respectivamente, para a liberação da raiz jovem e o surgimento das primeiras folhas³.

As amostras foram codificadas conforme Tabela 1.

Tabela 1. Codificação dos produtos

Produto	Codificação
“Radícula de malte”	Amostra teste
Cevada	P1 – padrão 1
Malte germinado	P2 – padrão 2
Radícula de malte	P3 – padrão 3
Bagaço de cevada	P4 – padrão 4

Dessa forma, as amostras padrões foram analisadas, identificadas e caracterizadas como: P1- cevada: constituída de grãos inteiros e quebrados; P2- malte germinado: grãos de cevada em processo de germinação, apresentando os primórdios radiculares; P3- radícula de malte: constituída por primórdios radiculares, foliares e fragmentos de tecidos da semente; P4- bagaço de cevada: identificado como sendo cascas (tegumento, designado de pericarpo) com resíduos da cevada.

Em relação às amostras padrões foi possível observar na amostra teste a presença de estruturas que não contemplavam exclusivamente o padrão P3 - radícula de malte, apresentando além da radícula outras estruturas da

cevada como grãos inteiros e quebrados, cascas e pedaços da inflorescência, sendo possível constatar que a amostra teste era constituída por grande quantidade de bagaço de cevada, e em pequena proporção encontravam-se a cevada, malte germinado e radícula de malte. Na análise da amostra teste também foi constatada a presença de matérias estranhas não encontradas nas amostras padrões, como: insetos e larvas vivos e mortos, seus fragmentos, dejeções e ácaros vivos e mortos.

Como resultado dessa investigação verifica-se a contribuição da análise microscópica, pelo diagnóstico de identificação, na elucidação do problema apresentado e na prevenção de prejuízos nutricionais e econômicos do produto.

REFERÊNCIAS

1. Antunes, J.M. Novas opções de cevada para o sul. Embrapa Trigo, [http://www21.sede.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2005]. Set/2005
2. Bellaver, C. et al. Radícula de malte na alimentação de suínos em crescimento e terminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 20(8): 969-74, 1985.
3. Mercier, H. Germinação de sementes. Modelo: Cevada, [http://felix.ib.usp.br/bib131/texto1/pag3.htm]. Fev/2005
4. Minella, E. Cevada brasileira: situação & perspectivas. Embrapa Trigo, 1999. Comunicado Técnico Online, 23[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co24.htm]. Set/2005
5. Popinigis, F. Formação e conceito funcional da semente; In: **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura; 1977. p.1-17.
6. Santos, H.P. et al. Sistemas de rotação de culturas com cevada para região sul do Brasil, sob sistema de plantio direto. Embrapa Trigo, 1999. Comunicado Técnico Online, 5, [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co05.htm]. Set/2005

Histórico do Microscópio Eletrônico (M.E.) EM-200 Phillips do Instituto Adolfo Lutz

Adelino POLI NETO¹, Jonas J. KISIELIUS¹, Marli UEDA¹, Áquila Maria Lourenço GOMES¹, André CASTILHO¹, Paulo Celso PARDI²

¹Instituto Adolfo Lutz, ²Universidade Bandeirantes de São Paulo

Grande parte do progresso em Ciência Biológica, nos últimos cem anos, está associada ao aperfeiçoamento no campo da microscopia. A descoberta e estudo de bactérias, fungos, protozoários, identificação de células como constituintes fundamentais de animais e vegetais e o estudo das anormalidades estruturais de células e tecidos; avanços no diagnóstico de patologias, que enlutaram com o mundo, evoluções devidas à microscopia de luz e posteriormente ao microscópio eletrônico. Em 1955, quando o Dr. Roberto de Almeida Moura, médico do laboratório de Vírus neurotrópicos do Instituto Adolfo Lutz, isolou e tipou pela primeira vez no Brasil em cultura de tecido o vírus da poliomielite (paralisia infantil), doença já conhecida mas até então não identificados os tipos existentes, não imaginaria que seis anos após seu feito, um microscópio eletrônico seria adquirido pelo Instituto Adolfo Lutz marcando uma nova era nos estudos dos vírus patogênicos.

O Microscópio EM-200 Philips do IAL foi adquirido pelo Governo do Estado de São Paulo em 1961, com a finalidade de atender a todas as seções do IAL nas pesquisas que necessitassem de estudos a nível ultra-estrutural. Em pouco tempo, esta finalidade foi superada e este microscópio passou a atender também outras instituições de pesquisas, hospitais e universidades do estado e fora dele.

A Seção de Microscopia Eletrônica iniciou suas atividades na mesma época e local em que o Serviço de Virologia foi implantado no IAL; por isso a virologia exerceu uma grande influência nos trabalhos da Seção. Contribuiu entre inúmeros outros, no estudo do vírus da poliomielite causadora da paralisia infantil e vírus da influenza (gripe Hong Kong) na década de 60; do vírus Rocio causador de uma grave epidemia de encefalite hu-

mana e também iniciou os estudos dos vírus das gastroenterites identificando os Rotavírus, Adenovírus e os “small round vírus particles - SRPV” na década de 70 e início de 80. Convém citar que envolvida nos trabalhos realizados pelo IAL, a Seção de Microscopia Eletrônica se destaca no diagnóstico rápido de Vírus e vem ampliando o seu campo de atuação. Há evidenciação de Vírus com o uso de uma solução de metais pesados, como acetato de uranila ou fosfotungstato de sódio, conhecida como contrastação negativa é um dos métodos mais utilizados em M.E. para tal tipo de diagnóstico. Utilizando a recém descrita técnica de coloração negativa (“negative staining”), acima citada, o Dr. Dalton Ramalho Weigl, chefe da Seção no período de 1962 a 1987, foi o pioneiro na utilização do ME no diagnóstico de vírus, onde teve um papel importante durante a campanha da Erradicação da Varíola, nos anos 60 até final dos anos 70, realizando o diagnóstico diferencial entre os vírus da varíola e da varicela. Esse diagnóstico foi ampliado a muitos outros vírus e continua sendo realizado pelo IAL até os dias de hoje com um outro aparelho, o EM-400TT adquirido no início da década de 80.

Características do aparelho:

O EM-200 Philips é um microscópio eletrônico de transmissão, ou seja, o elétron atravessa a amostra a ser examinada. Trata-se de um aparelho cujo projeto é dos anos 50, com circuitos eletrônicos à válvula e possui seis lentes eletromagnéticas: duas lentes condensadoras, lente objetiva, intermediária, de difração e projetora. Os elétrons podem ser acelerados com uma diferença de potencial de 40 a 100 kV. Dependendo do potencial a resolução máxima pode chegar, em condições ideais, a seis angstroms (6x10⁻¹⁰ metros). O aumento máximo é de 180.000x no “écran” (anteparo) fluorescente.

Elucidação de surtos de doenças de veiculação hídrica ocorridos no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2004

Harumi SAKUMA, Ruth Estela Gravato ROWLANDS, Christiane Asturiano RISTORI, Ana Maria Ramalho de PAULA, Giselle Ibette Lopez LOPES, Miyoko JAKABI
Instituto Adolfo Lutz Central, Seção de Microbiologia Alimentar

A qualidade da água tem grande influência sobre a saúde da população. As doenças de veiculação hídrica são causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica tais como *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, vírus, protozoários e parasitas intestinais, transmitidos por via fecal-oral.

No período de junho de 1999 a dezembro de 2004, a Seção de Microbiologia Alimentar do IAL recebeu 181 amostras de água para elucidação de casos ou surtos de doenças de veiculação hídrica, sendo 81 de abastecimento público, 49 minerais, 28 de poços, 8 de fontes e 15 de origem não especificada.

No presente trabalho foram pesquisadas as bactérias: *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *E. coli* O157:H7 e *Shigella* spp., segundo metodologia descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001) e as dos grupos coliformes totais e termotolerantes, de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998). As amostras de água foram filtradas em alíquotas de 100 mL para contagem de coliformes totais. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* foram pesquisadas em no mínimo 500 mL e as demais bactérias em no mínimo 1.000 mL de amostra.

A maioria das amostras analisadas (96,7%) não vieram acompanhadas de ficha de investigação do caso/surto com respectivo histórico. Do total das 181 amostras de água, em 12 (6,6%) foram isoladas bactérias. As *Aeromonas* spp. foram isoladas em 11 amostras principalmente de fontes alternativas, *Plesiomonas shigelloides* em 1 amostra e em 2 amostras detectou-se a presença de *Salmonella* (Tabela 1).

A presença de *Salmonella* spp. em amostras de água para o consumo humano representa um risco à saúde. A contaminação por *Salmonella* em água de abastecimento público pode ter ocorrido no local do surto, considerando que este patógeno não sobreviveria aos tratamentos aplicados nos sistemas de rede pública.

As espécies de *Aeromonas*, por outro lado, são ubíquas de ambientes aquáticos e podem apresentar variação sazonal, com uma população maior nos meses quentes. Fatores como a presença de biofilmes, baixa concentração de cloro residual livre e temperatura elevada (>14°C) favorecem a proliferação de *Aeromonas* nos sistemas de distribuição.

Plesiomonas shigelloides pode ser isolada de água e peixes de água doce, moluscos e de diversos animais. Supõe-se que a maioria das infecções humanas por este microrganismo ocorram por meio de veiculação hídrica. A bactéria pode estar presente em água não potável utilizada para consumo humano ou lavagem de alimentos que serão consumidos crus e em água para recreação.

Embora espécies de *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides* tenham sido detectadas em amostras de água envolvidas nos surtos, até o momento não há dados na literatura que possam considerá-las como causas definitivas de doenças, uma vez que estas bactérias são encontradas em fezes humanas de indivíduos com e sem diarreia.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a importância da pesquisa de bactérias patogênicas em casos de toxi-infecção, já que nem todas as amostras que tiveram o agente isolado, foram positivas para os coliformes termotolerantes, que são indicadores da presença de microrganismos patogênicos em água.

Tabela 1. Bactérias isoladas dos casos/surtos elucidados, por origem da água

Origem da água	Bactérias isoladas	Coliformes totais (UFC/100 mL)	Coliformes termotolerantes	Sintomas relatados
Abastecimento público	<i>A. hydrophila</i>	<1	–	-----
Abastecimento público	<i>A. caviae</i>	>80	+	-----
Abastecimento público	<i>S. Infantis</i>	>80	+	Cólica abdominal, náusea e diarreia
Fonte	<i>A. caviae, P.shigelloides</i>	>80	+	-----
Fonte	<i>Aeromonas spp.</i>	>80	+	Infecção intestinal ocasional
Mineral	<i>Aeromonas spp.</i>	>80	NR	-----
Poço	<i>A. caviae</i>	>80	+	Febre, diarreia e vômito
Poço	<i>A. caviae, S. Panama</i>	>80	–	-----
Poço	<i>Aeromonas spp.</i>	>80	–	Gastrenterite
Poço	<i>A. caviae</i>	<1	–	Diarreia
Poço	<i>A. caviae</i>	>80	–	Diarreia
Desconhecida	<i>A. hydrophila</i>	>80	NR	-----

<1 – ausência

>80 - incontável

NR – não realizado

Pesquisa de *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC) em amostras de carne crua moída comercializadas no município de São Paulo

Christiane Asturiano RISTORI¹, Ruth Estela Gravato ROWLANDS¹, Miyoko JAKABI¹, Tânia Aparecida Tardelli GOMES², Beatriz Ernestina Cabilio GUTH², Kinue IRINO³

¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar

²Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

³Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Bacteriologia

Escherichia coli produtoras da toxina Shiga (STEC) são causas frequentes de um amplo espectro de doenças, variando desde uma diarreia branda até colite hemorrágica severa, podendo evoluir para complicações extra-intestinais graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT).

Embora *E. coli* O157:H7 seja o patógeno mais conhecido desta categoria, mais de 400 diferentes sorotipos de STEC, designados de STEC não-O157¹ já foram associados com a infecção no homem. Estes microrganismos são encontrados no trato intestinal de diferentes espécies de animais domésticos e selvagens, sendo os ruminantes os principais reservatórios. O consumo de alimentos contaminados, contato direto/indireto com animais e a disseminação pessoa-pessoa constituem as principais vias de transmissão das STEC.

Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos, causados pela STEC, têm sido relatados em todo o mundo. No Brasil, já foram descritos casos esporádicos de diarreia e de SHU ocasionados pelas STEC^{2,3}.

As baixas concentrações de STEC, cocção ou processamento tecnológico, bem como a flora competitiva dos alimentos são fatores que dificultam a detecção desses microrganismos. A utilização da técnica de separação imunomagnética e de meios de enriquecimento seletivo podem aumentar a sensibilidade de detecção desses patógenos em alimentos.

Na técnica de separação imunomagnética, as células alvo são capturadas em partículas magnéticas revestidas com anticorpos específicos anti-LPS. Após lavagens sucessivas no campo magnético, o imunocomplexo

(bactéria/partículas magnéticas) é separado de outros microrganismos e debris, sendo em seguida semeado em placas com ágar seletivo.

O objetivo deste estudo foi pesquisar cepas de STEC em amostras de carne crua moída comercializadas no município de São Paulo. Foram analisadas 100 amostras, adquiridas no período de maio a agosto de 2004, em diferentes pontos comerciais do município de São Paulo. As amostras foram processadas segundo metodologia descrita no “Compendium of methods for the microbiological examination of foods”⁴ e simultaneamente submetidas à técnica da separação imunomagnética, para o enriquecimento de O157, utilizando o kit IMS-O157 (Denka Seiken Co. LTD, Japan). Os dois procedimentos seguiram isolamento em placas de ágar MacConkey Sorbitol incubadas a 35°C/24h. De cada placa, 5 a 10 colônias de *E. coli* (sorbitol positivas/negativas), foram repicadas em meio de identificação presuntiva de enterobactérias - IAL. As cepas sorbitol negativas foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina, utilizando anti-soro O157.

Todas as cepas com identificação presuntiva de *E. coli* foram submetidas à técnica de hibridização de colônia utilizando sondas específicas *stx1*, *stx2* e *eae* segundo Gonçalves et al., 1997.⁵

No presente estudo não houve detecção de STEC nas amostras analisadas. Entretanto, considerando que o gado bovino é apontado como o principal reservatório de STEC e que no Brasil, há relatos do isolamento destas cepas em carne crua moída⁶, bovinos⁷ e de casos clínicos de diarreia e SHU^{2,3}, é de fundamental importância o monitoramento deste patógeno nesta classe de produto.

REFERÊNCIAS

1. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Dhahi G, Coira MA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 311-9, 2004.
2. Irino K, Vaz TMI, Kato MAMF, Naves ZVF, Lara RR, Marco MEC et al. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brasil. **Emerg. Infect. Dis.**, 8: 446-7, 2002.
3. Guth BEC, Souza RL, Vaz TMI, Irino K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, 8: 535-6, 2002.
4. Hitchins AD, Hartman PA, Todd ECD. Coliforms - *Escherichia coli* and its toxins. In: Vanderzant, C.; Splittstroesser, D.F. (Eds), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3rd. Washington, DC: APHA; 1992. p. 325-69.
5. Gonçalves AG, Campos LC, Gomes TAT, Rodrigues J, Sperandio V, Whittam TS et al. Virulence properties and clonal structure of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. **Infect. Immun.**, 65: 2034-40, 1997.
6. Bergamini AMM, Oliveira MA, Ribeiro EGA, Pisani B, Simões M, Prandi MA et al. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em amostras de carne coletadas nas regiões de Ribeirão Preto e Campinas, São Paulo. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, 14: 30, 2004.
7. Irino K, Kato MAMF, Vaz TMI, Ramos II, Souza MAC, Cruz AS et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, 105(1): 29-36, 2005.

Elucidação de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos, no Estado de São Paulo, no período de julho de 2002 a dezembro de 2004

Christiane Asturiano RISTORI¹, Harumi SAKUMA¹, Ana Maria Ramalho de PAULA¹, Ruth Estela G. ROWLANDS¹, Giselle I. Lopez LOPES¹, Beatriz PISANI², Jussara da Silva FAUSTINO², Aracelis Moreno FREITAS², Jaqueline T. Macruz PERESI², Luci Ochi FERREIRA², Alzira Maria M. BERGAMINI², Yara Solange K. FONSECA², Maria Aparecida G. SUAIKEN², Fátima Regina de M. Abreu VILLELA², Silene Maria NUNES², Aparecida de Fátima MICHELIN², Sueli Aparecida FERNANDES¹, Miyoko JAKABI¹

¹Instituto Adolfo Lutz Central – São Paulo

²Instituto Adolfo Lutz – Laboratórios Regionais

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) representam um crescente problema de Saúde Pública. A maioria dos casos não são notificados e a real dimensão do problema ainda é desconhecida, dificultando a identificação e implementação de soluções adequadas. A análise bacteriológica de alimentos envolvidos em surtos é de fundamental importância na determinação dos agentes e/ou seus metabólitos e das espécies envolvidas para subsidiar as medidas sanitárias de controle destas doenças.

Este estudo teve como objetivo a elucidação dos surtos de DTAs ocorridos no Estado de São Paulo, no período de julho de 2002 a dezembro de 2004.

As análises bacteriológicas seguiram metodologias descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001) e foram realizadas pelos Laboratórios de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz Central e Laboratórios Regionais de: Campinas, Sorocaba, Santos, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto, Bauru, Marília, Taubaté, Presidente Prudente, Araçatuba e Santo André. Foram analisadas amostras de alimentos, de 459 surtos, enviadas pelas Vigilâncias Sanitárias, Epidemiológicas e por particulares. Os alimentos pertenciam às seguintes categorias: pratos prontos para o consumo, produtos de confeitaria, leite e derivados, gelados e outros. As bactérias isoladas em número igual ou superior a 10^4 UFC/g dos alimentos foram consideradas como responsáveis pelos surtos, com exceção da *Salmonella* em que a presença em 25 g do alimento era suficiente para se considerar o patógeno como agente causal.

Do total de 459 surtos, 133 (29%) foram elucidados sendo isolados os seguintes patógenos: *S. aureus* (45%), *B. cereus* (24%), Clostridio sulfito redutor (14%),

Cl. perfringens (1%) e *Salmonella* spp. (16%). Dos surtos elucidados, em 17 foram isolados mais de um agente, sendo que em três surtos foram isolados Clostridio sulfito redutor e *B. cereus*, em cinco Clostridio sulfito redutor e *S. aureus*, em sete *B. cereus* e *S. aureus*, em um surto *Salmonella* e *B. cereus* e, um surto *Salmonella* e *S. aureus*.

O *S. aureus* foi o agente isolado com maior frequência, como relatado nos levantamentos de anos anteriores. A presença desse microrganismo em alimentos indica contaminação pós-cocção e armazenamento inadequado.

Dentre os sorovares isolados de *Salmonella*, *S. Enteritidis* foi o mais frequente, sendo que seu aumento vem ocorrendo desde 1993 no Estado de São Paulo.

Os pratos prontos para o consumo e os produtos de confeitaria, categorias mais envolvidas nos surtos (TABELA 1), requerem maior manipulação durante seu preparo e, frequentemente são armazenados em temperaturas inadequadas, favorecendo a multiplicação e/ou produção de toxinas pelos microrganismos.

O número de surtos não elucidados permanece elevado, revelando a importância do inquérito epidemiológico e pesquisa de outros microrganismos. Além disso, nem sempre o alimento veiculador de patógeno é enviado para análise laboratorial.

O controle das DTAs deve ser baseado no conhecimento de sua incidência e em informações sobre os perigos biológicos de origem alimentar. A elucidação do patógeno e do alimento envolvido no surto depende, portanto, da atuação integrada entre Vigilância Epidemiológica, Sanitária e dos Laboratórios de Saúde Pública. A ausência de dados epidemiológicos e laboratoriais dificulta a adoção de medidas corretivas e preventivas adequadas.

Tabela 1. Microrganismos isolados dos surtos por classe de alimentos, no período de julho/2002 a dezembro/2004.

	Produtos confeitaria	Pratos prontos	Leite e derivados	Gelados	Outros	TOTAL
<i>S. aureus</i>	18	29	2	3	1	53
<i>B. cereus</i>	4	20	2			26
<i>Clostridio sulfito redutor</i>		14				14
<i>Cl. perfringens</i>		2				2
<i>Salmonella spp.</i>	1	1				2
<i>S. Enteritidis</i>	7	10		1	1	19
<i>S. aureus e B. cereus</i>	4	3				7
<i>S. Enteritidis e S. aureus</i>	1					1
<i>Salmonella spp. e B. cereus</i>	1					1
<i>B. cereus e Clostridio</i>		3				3
<i>S. aureus e Clostridio</i>	3	2				5
TOTAL	39	84	4	4	2	133

Sorologias reagentes para sarampo no período de 1997 a 2005 na área de abrangência do IAL de Ribeirão Preto-SP, Brasil

Suely Maia GERACE, Lilia Adriana CARNEIRO, Lia Carmen M. S. ZERBINI, Natalia Tais SARDELLA, Madalena H. T. OKINO, Carlos Alberto N. PEREIRA, Juvenal O. CAMPOS, Ângela L. C. BRACSHI, Angélica M. S. PEREIRA, Eloísa F. Del TEDESCO
Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto, laboratório de Imunologia

O sarampo é uma doença de notificação compulsória no Brasil desde 1968, apresentando distribuição universal e variação sazonal. É freqüente na infância, afetando igualmente ambos os sexos, sendo uma das principais causas de morbi-mortalidade entre as crianças menores de cinco anos, principalmente as desnutridas e as que vivem em países subdesenvolvidos¹. A incidência, a evolução clínica e a letalidade são influenciadas pelas condições sócio-econômicas, estado nutricional e imunitário do doente; favorecidas pela aglomeração em lugares públicos e em pequenas residências com grupos familiares maiores que sua capacidade¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as sorologias para sarampo realizadas no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, no período de 1997 a 2005. Nos casos suspeitos de sarampo foi colhida uma amostra de sangue de cada paciente a partir do início dos sintomas até o vigésimo oitavo dia. As amostras foram provenientes de municípios da área de abrangência da Direção Regional de Saúde (DIRs), “Ribeirão Preto, Barretos, Franca e Araraquara”. Para o diagnóstico de Sarampo utilizou-se

a técnica de ELISA para detecção de anticorpos da classe IgM. Foram também realizadas sorologias para sarampo de casos suspeitos de rubéola, com resultado não reagente, conforme preconizado pela Secretaria da Saúde e Instituto Adolfo Lutz.

Do total de 2.651 amostras suspeitas de sarampo, 582 (22,7%) foram reagentes (Tabela 1), enquanto que das 5.314 amostras suspeitas de rubéola, 140 (2,6%) foram reagentes (Tabela 2). Em 1997 ocorreu uma epidemia de sarampo em praticamente todo país, sobretudo no Estado de São Paulo e algumas cidades do nordeste, com mais de 53 mil casos confirmados¹. A partir de 1998 essa situação voltou a ser controlada, sendo que o sarampo foi praticamente erradicado em virtude das intensificações das campanhas de vacinas realizadas.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Plano Nacional de Erradicação do Sarampo**. 1 ed Brasília, 2000. p 01 – 17.

Tabela–1 Resultados de Sorologias para Sarampo realizadas no I.AL.-Ribeirão Preto de 1997 a 2005

ANO	AMOSTRAS REAGENTES		AMOSTRAS NÃO REAGENTES		TOTAL DE AMOSTRAS
	N	%	N	%	N
1997	526	34	1018	66	1544
1998	42	13	274	87	316
1999	02	1,6	121	98,4	123
2000	00	00	137	100	137
2001	02	1,2	164	98,8	166
2002	00	00	99	100	99
2003	02	2,2	88	97,8	90
2004	02	2,7	70	97,3	72
2005	06	5,7	98	94,3	104
TOTAL	582	22	2.069	78	2.651

Tabela–2 Resultados de Sorologias para Rubéola realizadas no I.AI.-Ribeirão Preto de 1997 a 2005

ANO	AMOSTRAS REAGENTES		AMOSTRAS NÃO REAGENTES		TOTAL DE AMOSTRAS
	N	%	N	%	N
1997	105	09	983	91	1.088
1998	09	1,3	670	98,7	679
1999	05	0,8	610	98,2	615
2000	07	1,2	598	98,8	605
2001	08	01	788	99	796
2002	02	0,5	416	99,5	418
2003	01	0,5	228	99,5	229
2004	03	0,6	538	99,4	541
2005	00	00	343	100	343
TOTAL	140	2,6	5174	97,4	5.314

Coliformes, turbidez e cloro: parâmetros de importância epidemiológica na análise de águas de abastecimento público na região do Vale do Paraíba/SP

Fátima Regina de Moura Abreu VILLELA, Kátia Regina Marton de Freitas MARTINS, Dirce Aparecida FEITOSA, Simone Ribeiro Campos BENEDETTI, Sandra Irene Sprogis dos SANTOS, Heloisa Maria Fileni MENDES, Paula Cristina Siqueira Leite MONTEIRO, Andreia Rezende LEITE
Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Taubaté

A questão da potabilidade da água é de importância fundamental para prevenir as doenças de veiculação hídrica e a Portaria nº 518 de 25/03/2004 do Ministério da Saúde², determina valores para turbidez e cloro a fim de garantir a qualidade microbiológica da água. Por outro lado, o melhor método de assegurar a qualidade da água para consumo humano, consiste na adoção de medidas de proteção no sentido de evitar a sua contaminação por dejetos humanos ou animais, que por sua vez, são veículos ricos em organismos patogênicos de diferentes natureza que podem causar uma gama variável de agravos ao homem^{3, 5}.

O objetivo do trabalho foi de avaliar os resultados laboratoriais de análise de água de abastecimento público, correlacionando a presença de coliformes totais e/ou *Escherichia coli* com parâmetros físico-químicos de turbidez e teor de cloro residual livre (CRL).

O estudo foi realizado com dados obtidos do

PROÁGUA no ano de 2004, referentes aos resultados de análises bacteriológicas quanto ao número mais provável de coliformes totais e/ ou *Escherichia coli* (COLI) e análises físico-químicas, quanto ao índice de turbidez (T), e os resultados da dosagem do teor de cloro residual livre (CRL) fornecidos pelos órgãos de Vigilância Sanitária Municipais. Os ensaios bacteriológicos e físico-químicos foram realizados no Instituto Adolfo Lutz-Laboratório I de Taubaté, os quais, seguiram, respectivamente, as técnicas descritas no *Standart Methods for Examination of Water and Wastewater*¹ e os Métodos físico-químicos para análise de alimentos⁴.

Verificou-se que 208/1439 (14,5%) das amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação e destas, considerando-se os parâmetros individualmente 29,8%; 12,5%; 43,3% foram reprovadas quanto aos parâmetros COLI, T e CRL, respectivamente (Figura 1). Quanto ao índice de CRL, os resultados evidenciaram que

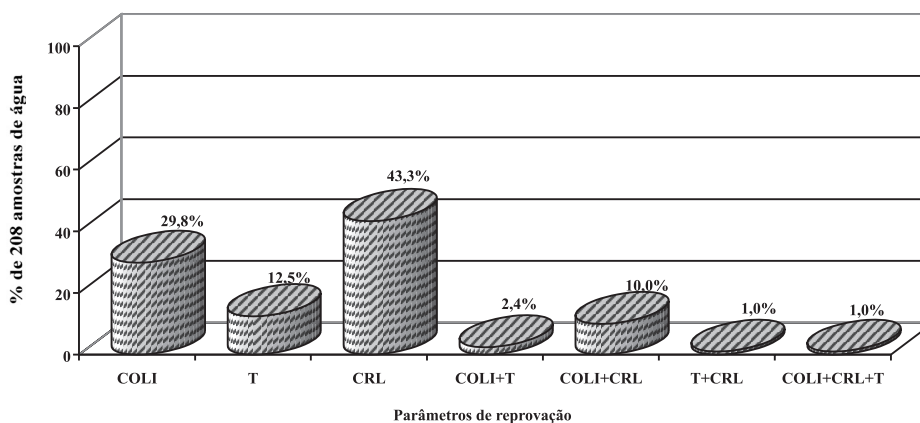


Figura 1. Percentuais de 208 amostras de água em desacordo com a legislação segundo os resultados dos ensaios: coliformes totais e/ou *Escherichia coli* (COLI); cloro residual livre (CRL) e turbidez (T) e/ ou associações.

1198/1439 (83,2%) das amostras de água analisadas estavam de acordo com a legislação; 115/1439 (7,9%) das amostras avaliadas, apresentaram concentrações inferiores a 0,2 mg/L, estando em desacordo com a legislação. Ressalta-se que em 83 (5,7%) das amostras não havia informação, quanto à dosagem de cloro (Figura 2).

O presente estudo evidencia que alguns sistemas de abastecimento se encontram vulneráveis quanto ao teor

de CRL, que é fundamental para um processo eficiente de desinfecção. Por outro lado, a turbidez é causada por partículas em suspensão que podem abrigar microrganismos patogênicos, os quais não serão eliminados no momento da desinfecção. Infere-se portanto, a necessidade de melhor planejamento de ações pelos órgãos públicos responsáveis pela vigilância e monitoramento da qualidade da água, visando a preservação da saúde da população.

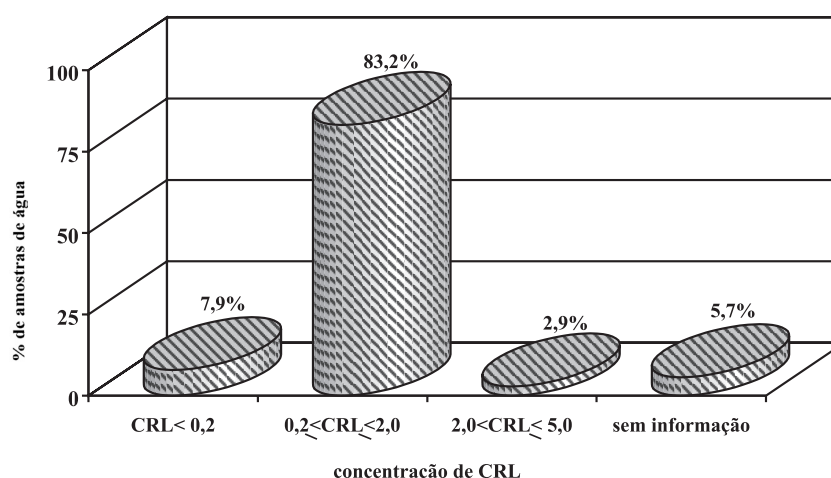


Figura 2. Distribuição do percentual de 1439 amostras de água segundo a dosagem dos teores de CRL residual, fornecidos pelas Vigilância Sanitária Municipais.

REFERÊNCIAS

1. American Public Health Association (APHA). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**, 20th ed. Washington, 1998.
2. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de março de 2004, Seção 1, pág. 266 -70.
3. D'Aguila, P. S.; Roque, O. C.C.; Miranda, C.A.; Ferreira, A. P. Avaliação da qualidade da água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. **Cad. Saúde Pública**, 16 (3): 791-8, 2000.
4. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a ed, Brasília, ANVISA: 2005, 1018p.
5. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Programa Estadual de Vigilância da Qualidade da Água, PROÁGUA. Centro de Vigilância Sanitária. **Padrões de potabilidade da água**. São Paulo, 1998, v2, 23p.

Implementação de banco de dados na Seção de Vírus Entéricos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Fernanda Faria COSTA, Adriana LUCHS, Leovaldo Gonçalves de Oliveira JUNIOR, Audrey CILLI, Simone Guadagnucci MORILLO, Rita de Cássia Compagnoli CARMONA, Maria do Carmo Sampaio Tavares TIMENETSKY

Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Serviço de Virologia, Seção de Vírus Entéricos, São Paulo, SP, Brasil

O desenvolvimento de novas tecnologias, nas últimas décadas, vem afetando todos os setores da atividade humana, proporcionando maior agilidade de comunicação, reduzindo esforços nas rotinas diárias, implementando a precisão dos resultados obtidos e, sobretudo, ampliando as possibilidades de acesso à informação em todo mundo. Os estudos e fórum de discussão na área da ciência da informação têm levado a considerar, sob uma nova óptica, a questão da manutenção de acervos e o acesso à informação, surgindo, como consequência, propostas de bibliotecas eletrônicas ou banco de dados digitais, entre outras, e que já pressupõe todo o trabalho prévio de automação de catálogos e acesso “on-line” a bancos de dados³.

O Instituto Adolfo Lutz (IAL), integrante do sistema de vigilância epidemiológica e sanitária, tem como finalidade contribuir para a promoção da saúde da população, através da geração e divulgação do conhecimento, produção de bens e serviços nas áreas de laboratório de Saúde Pública, atuando como referência nessa área¹. O Laboratório de Vírus Entéricos (LVE) atua na elaboração do diagnóstico laboratorial dos vírus associados às meningites assépticas, miocardites, conjuntivites, paralisias, exantemas e gastroenterites, desempenhando papel de referência macro regional na elucidação de epidemias e surtos dentro de programas e projetos de vigilância ou monitoração das doenças de notificação compulsória estadual e nacional.

O trabalho de cadastramento de amostras clínicas, de pacientes atendidos na rede pública e encaminhados ao LVE, é uma das atividades do laboratório. O cadastro proporciona o registro de diversas informações, tais como: nome do paciente, sexo, idade, suspeita clínica, data do início de sintomas, data de coleta, entre outros dados importantes para o diagnóstico laboratorial.

O desenvolvimento tecnológico exige novas formas de armazenar documentos, redefinindo os paradigmas atuais sobre informações, comunicação e o próprio âmbito de trabalho dos profissionais da área.

Frente a essa problemática, surge a necessidade de repensar os modelos éticos, legais, estéticos, culturais, profissionais e outros, estabelecidos pelo suporte impresso². O presente trabalho teve como objetivos estruturar e implementar um Banco de Dados no LVE, facilitando a interpretação e difusão das informações e, colocando-o à disposição de órgãos públicos interessados. Adicionalmente, a ausência de um banco de dados informatizado e de um processo automatizado para pesquisa de informações também motivou o projeto. A implementação desse projeto facilitou a pesquisa, interpretação e difusão de todos os dados produzidos e ou coletados, relativos às doenças causadas por vírus entéricos. Segundo Silva-da-Rocha⁴, a existência de uma base de dados fornece ainda, informações de forma ágil e abrangente para elaboração de trabalhos científicos futuros.

O Banco de Dados implantado no LVE foi confeccionado em formato MS-Access. Esta linguagem permitiu o rápido desenvolvimento do trabalho, além de proporcionar praticidade na manutenção do mesmo. Possui módulos Tabelas, para armazenamento dos dados, onde se pode encontrar desde nome, sexo e idade do paciente, até data do início dos sintomas, data das coletas de amostras e demais dados relevantes. Utilizando os módulos Consulta aliados aos módulos Relatórios é possível gerar relatórios para os mais variados fins, tornando possível a montagem personalizada de cada consulta. É interessante ressaltar que devido à natureza da linguagem utilizada na montagem, o Banco de Dados pode ser remodelado facilmente sempre que necessário, evitando maiores complicações. Os registros podem ser encontrados pelo nome do paciente ou pelo número dado pelo laboratório para codificar as amostras (registro do laboratório). O módulo de impressão dos resultados possibilita de maneira simples e rápida a emissão de laudos, referentes a: rotavírus, adenovírus, isolamentos e sorologia para enterovírus. Para garantir a confidencialidade das informações dos pacientes, os laudos são lacrados e enviados à Seção de Recepção e Coleta do IAL.

O desenvolvimento e estabelecimento de um banco de dados promoverão um modelo de integração entre áreas distintas, gerando um produto de qualidade e abrindo perspectivas de pesquisa multidisciplinar. Cabe destacar que o projeto, além de cumprir o objetivo de registrar e armazenar diversas informações irá proporcionar maior qualidade à pesquisa. Os avanços tecnológicos trazem benefícios incalculáveis ao acesso à informação, mas exigem capacitação profissional e decisões acertadas para o sucesso das iniciativas levadas a efeito. Cada vez mais, torna-se imprescindível o trabalho cooperativo e compartilhado, no estabelecimento de programas e projetos interinstitucionais, na planificação e manutenção de bases de dados, na participação em redes e sistemas de informação e no aperfeiçoamento dos profissionais envolvidos nessas atividades.

A utilização de um Banco de Dados permanente e vinculado ao relato de impressão de resultados, reduz significativamente a incidência de erros ocorridos durante a re-digitação dos dados pessoais do paciente. É interessante ressaltar que o relatório de resultados é elaborado de forma personalizada pelo LVE, reduzindo a ocorrência de falsificação, garantindo a originalidade. A par-

tir do registro sistemático de sua produção intelectual pelo banco de dados, o LVE passou a contar com dados valiosos para processos de avaliação institucional e para a divulgação de suas atividades de ensino, pesquisa bem como um possível instrumento de planejamento para a implementação de políticas públicas associadas à Vigilância Epidemiológica.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Adolfo Lutz. História. [<http://www.ial.sp.gov.br>]. 20 de fevereiro de 2006.
2. Levacov, M. Bibliotecas virtuais: (r) Evolução? **Ci Inf** 26(2), 1997.
3. Krzyzanowski, R.F.; Imperatriz, I.M.M.; Rosetto, M.; et al. Implementação do banco de dados DEDALUS, do sistema integrado de bibliotecas da Universidade de São Paulo. **Ci Inf** 26:168-176, 1997.
4. Silva-da-Rocha, L.F. Criação, estruturação e implementação de um banco de dados georeferenciado das cavidades subterrâneas do Estado do Paraná. **XXVII Congresso Brasileiro de Espeliologia. Januária, Abstract, 04-14 julho, 2003.**

Bioflavonóides e Quercetina: procedimento analítico por cromatografia em camada delgada para determinação de aflatoxinas

Leda Conceição Antonia LAMARDO, Luzia SHUNDO, Sandra Aparecida NAVAS, Myrna SABINO

Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica

As aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente as espécies *flavus*, *parasiticus* e, eventualmente o *nomius*. *Aspergillus flavus* e *parasiticus* são os fungos economicamente mais importantes em áreas tropicais e subtropicais como o Brasil, pois as melhores condições para a proliferação dos fungos e, conseqüentemente para a produção das aflatoxinas são encontradas em áreas com temperaturas entre 25 a 30°C e umidade relativa entre 83-85%³.

A descoberta das aflatoxinas e suas propriedades carcinogênicas alertaram para inúmeras conseqüências tanto econômicas quanto para a saúde humana e animal, ocasionadas pela ocorrência natural dessas toxinas nos alimentos e rações. A partir desta descoberta, foram realizadas extensivas investigações no desenvolvimento de métodos analíticos para detectar e determinar micotoxinas em produtos agrícolas e fluídos biológicos. Pelo fato dessas substâncias ocorrerem em matrizes complexas, em níveis de ng/g, as etapas de extração, remoção de interferentes, bem como a separação desses analitos de substâncias análogas e sua identificação, tornaram-se procedimentos importantes numa técnica analítica. Diferentes matrizes requerem diferentes métodos e procedimentos para extração, limpeza, separação, quantificação e confirmação do analito que são descritos na literatura.

Geralmente, as micotoxinas são extraídas por diferentes misturas de água com solventes orgânicos, tais como o clorofórmio, metanol, acetonitrila e acetona. A limpeza pode ser realizada por extração em fase sólida, partição líquido-líquido e precipitação. As técnicas tradicionais de cromatografia, como a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são muito utilizadas para a separação e quantificação².

O desenvolvimento de métodos imunoquímicos, também conhecidos como métodos baseados em imunoafinidade, utilizam anticorpos micotoxinas específicas para a extração e limpeza da toxina dos extratos das

amostras. Os mais utilizados são o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e a coluna de imunoafinidade².

Vários tipos de matrizes são encaminhadas para a seção de Química Biológica para a avaliação da presença ou não das aflatoxinas. Por se tratar de um contaminante natural, esta toxina pode estar presente em diversos produtos, sendo que para alguns deles, existem poucas informações disponíveis quanto ao procedimento analítico, havendo a necessidade de adequar uma metodologia para a detecção e quantificação desta micotoxina e também avaliar sua eficiência.

Dentre estas matrizes podemos citar os bioflavonóides e a quercetina recentemente analisados neste laboratório. Os bioflavonóides são compostos naturais encontrados numa variedade de alimentos de origem vegetal, como por exemplo frutas e chás (principalmente em erva mate). Estudos demonstram apresentar atividades antioxidantes, sendo capazes de reduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares e câncer¹.

A metodologia empregada consistiu na extração com água e clorofórmio, seguida de agitação e filtração. Para a quercetina (Figura 1), a separação e determinação foi realizada por CCD-bidimensional e quantificação visual. Para os bioflavonóides (Figura 2) foi introduzido uma etapa adicional de limpeza e extração por coluna de imunoafinidade, seguido de separação por CCD-bidimensional e quantificação visual. Para ambos, a confirmação da aflatoxina foi utilizada a reação com o Ácido Trifluoroacético (TFA).

O limite de detecção (LD) foi de 0,5 ng/g para aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂, considerando a concentração mínima visualizada em CCD. Foi realizada uma recuperação para o nível de 2 ng/g para cada aflatoxina. Para a quercetina, a recuperação média foi de 80,0%, 103,0%, 82,0% e 84,5% e para os Bioflavonóides, a recuperação foi de 85,0%, 60,0%, 62,5% e 73,5% para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente.

Quercetina	Bioflavonóides
•extração: Pesar 5 g amostra Adicionar: 10 mL de água aquecida 50 mL de clorofórmio Agitar por 30 minutos no shaker Filtrar em papel de filtro qualitativo Recolher toda a fase clorofórmica e secar até resíduo para CCD •separação e determinação: CCD bidimensional (10x10 cm) 1ª fase móvel: clorofórmio/acetona (90:10) 2ª fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60:30:10) Eluir o extrato com 200 µL de clorofórmio Cromatografar 40 µL •confirmação: solução de ácido trifluoroacético (TFA) em hexano (1+3) Figura 1. Representação esquemática do procedimento analítico para determinação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em Quercetina	•extração: Pesar 5 g amostra Adicionar: 10 mL de água aquecida 50 mL de clorofórmio Agitar por 30 minutos no shaker Filtrar em papel de filtro qualitativo Recolher toda a fase clorofórmica e secar até resíduo Ressuspender com 5 mL de metanol Adicionar 25 mL de tampão PBS Centrifugar e filtrar, caso ocorra turvação Passar pela coluna de imunoafinidade Lavar a coluna com água (10 mL x2) Eluir com 2 mL de metanol Secar até resíduo para CCD •separação e determinação: CCD bidimensional (10x10 cm) 1ª fase móvel: clorofórmio/acetona (90:10) 2ª fase móvel: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60:30:10) Eluir o extrato com 100 µL de clorofórmio Cromatografar 30 µL •confirmação: solução de ácido trifluoroacético (TFA) em hexano (1+3) Figura 2. Representação esquemática do procedimento analítico para determinação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em Bioflavonóides

REFERÊNCIAS

1. Fiander, H., Scheneider, H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. **Cancer Lett.**, 156:17-24, 2000.
2. Trucksess, M.W. Rapid Analysis (Thin Layer Chromatographic and Immunochemical Methods) for Mycotoxins in Foods and Feeds. In: De Koe, W.J., Samsom, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M. ed. **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium**, Wageningen, The Netherlands, 2001, p.29-40.
3. WHO – World Health Organization – **Mycotoxins**, Geneve, [Environmental Health Criteria 11]. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme and the World Health Organization, Printed in the United Kingdom, 1979, p.21-85.

Máscara mortuária desinfecção e conservação

Adelino POLI NETO¹, Dulcilena de MATOS¹, Áquila Maria Lourenço GOMES¹, Antonio Roberto de Souza PEREIRA¹, Paulo Celso PARDI², Esen Pereira CERQUEIRA³

¹Instituto Adolfo Lutz

²Universidade Bandeirante

³Museu de Anatomia Humana Prof. Alfonso Bovero – USP

No acervo do Museu do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo contamos com um molde positivo confeccionado em cera como sendo a provável Máscara Mortuária do Cientista Adolfo Lutz (1855 – 1940). Nosso objetivo é informar a experiência na desinfecção e conservação da Máscara Mortuária do acervo. A mesma encontra-se acondicionada em caixa de vidro vedada com silicone, tendo como suporte interno uma base de madeira previamente desinfetada e recoberta por tinta a óleo; como preenchimento interno, algodão hidrófobo e como forramento, tecido tipo tule. Em novembro de 2005, a máscara mortuária apresentou uma contaminação fúngica maciça em sua superfície externa. Como providência primeiramente solicitamos análises qualitativas do material para Seção de Micologia do IAL, obtendo-se os seguintes resultados: Fungos isolados na região da “Órbita Ocular” esquerda, o *Aspergillus crysogenum*; na região da “Maxila”, *Aspergillus crysogenum* e *Penicillium* spp; no apoio de madeira, *A.crysogenum*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp; no algodão hidrófobo, *Aspergillus* spp e no tecido de forro, *Penicillium* spp. Como fungicida aplicamos primeiramente três banhos de formaldeído 10%, em seguida apli-

camos dois banhos de fenol 5,3% e posteriormente para conservação aplicamos solução de sorbato de potássio 10% p/p cuja fórmula molecular é C₆H₇KO₂ indicado na literatura como fungicida. Esta operação foi executada na máscara e na face interna da caixa de vidro. Até a presente data não evidenciamos crescimento dos fungos isolados, e nem de *Paecilomyces* spp, citado nas literaturas especializadas. Portanto, os procedimentos aplicados mostraram ser eficientes para conservação deste tipo de peça para exposições em museus.

REFERÊNCIAS

1. G.S.de Hoog, J.Gene & M.J.Figueras - **Atlas of Clinical Fungi** — Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili. 2000.
2. Ikram, S. & Dodson, A.. **The Mummy in Ancient Egypt. Equipping the dead for eternity**. London: Thames and Hudson, 1998.
3. Rodrigues, H. **Técnicas Anatômicas** 222p.; il.- Vitória – 1998.

Avaliação Físico Química das Soluções Alternativas da Região de Abrangência do Instituto Adolfo Lutz Laboratório I Santo André (Proágua – 2002 a 2005)

Rute DAL COL, Vilma dos Santos Menezes Gaiotto DAROS, Lucia Vannucci SAVIGNANO

Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Santo André, Seção de Bromatologia e Química, Área de Físico Química

Soluções alternativas de abastecimento de água para consumo humano são todas modalidades distintas do sistema público de água, incluindo entre outras, fontes, poços comunitários, distribuição por veículo transportador, instalações condominiais horizontal e vertical¹.

A Portaria nº 36/GM de 19 de janeiro de 1990 do Ministério da Saúde, contemplava as normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano apenas para o sistema público de abastecimento de água². Porém com o crescimento desordenado das cidades, deficiência no saneamento básico e intensa urbanização, a utilização das soluções alternativas tem aumentado constantemente.

Com a preocupação em ofertar água de qualidade adequada em âmbito nacional, a fiscalização das soluções alternativas foi incluída na Portaria nº 1469/GM de 29 de dezembro de 2000 do Ministério da Saúde, e mantido o monitoramento sobre procedimentos e responsabilidades inerentes ao controle e à vigilância da qualidade da água na atual Portaria nº 518/GM de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde³. O Proágua (Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano) do Estado de São Paulo em ação conjunta com as VISAS municipais e o Instituto Adolfo Lutz realiza análises de vigilância dos parâmetros básicos de rotina. O monitoramento tem início no ato da coleta com as análises em campo de cloro residual livre, pH e temperatura, realizadas por profissionais das VISA municipais (coletores) devidamente capacitados. As amostras são enviadas ao laboratório onde são processadas as análises físico químicas dos parâmetros cor, turbidez e flúor e a análise bacteriológica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar no âmbito laboratorial a qualidade físico química da água de poços e minas na Região do Grande ABC no período de 2002 a 2005.

Foram coletadas no período 6.360 amostras de água, sendo 851 (13,4%) de soluções alternativas. As amostras foram enviadas ao laboratório logo após a coleta, em frascos de polietileno com capacidade de 250 mL devidamente identificadas pelas VISAs municipais, acompanhadas por fichas contendo as informações correspondentes aos pontos de coleta e os resultados das análises realizadas em campo (temperatura, pH e cloro). Os parâmetros físico químicos de cor, turbidez e flúor foram analisados segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985)⁴.

Das 851 amostras analisadas 590 (69,3%) foram de poços e 261 (30,7%) de minas (Figura 1). Os poços avaliados revelaram 133 resultados insatisfatórios sendo o parâmetro cor o de maior condenação 74 (55%), seguido pelo flúor 34 (26%), cor/turbidez 24 (18%) e turbidez 1 (1%) (Figura 2). As minas apresentaram 21 amostras condenadas sendo que 16 (76%) para o parâmetro cor e 5 (24%) para cor e turbidez.

Com este estudo, observou-se que os poços e minas estão sendo monitorados constantemente pelas Vigilâncias Municipais, resultado da grande procura por parte da população. As amostras condenadas por cor e turbidez podem indicar a presença de substâncias metálicas como o ferro ou manganês, matérias húmicas e algas, influenciando apenas no aspecto estético de aceitação ou rejeição da água e indicando pouco significado sanitário. Porém amostras com íons fluoreto acima do limite estabelecido pela Portaria nº 518/GM de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde presente naturalmente, indicam formação rochosa rica deste mineral, sendo necessária a constante desfluoretação destes pontos de consumo para que no futuro a população não venha a ter a fluorose.

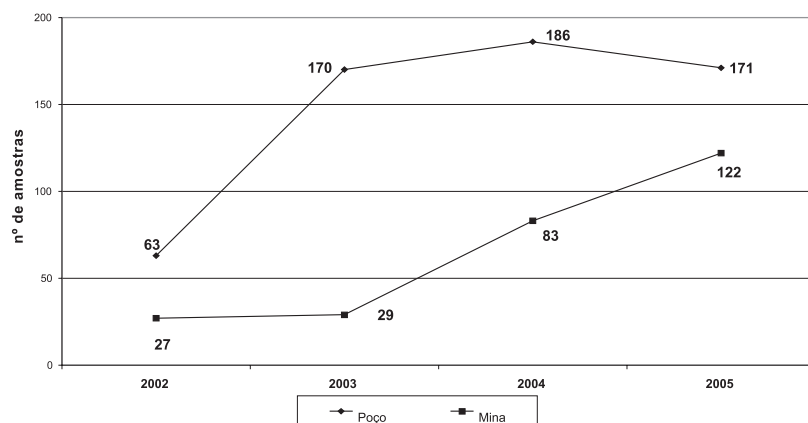


Figura 1. Número de amostras de soluções alternativas coletadas no período de 2002 a 2005.

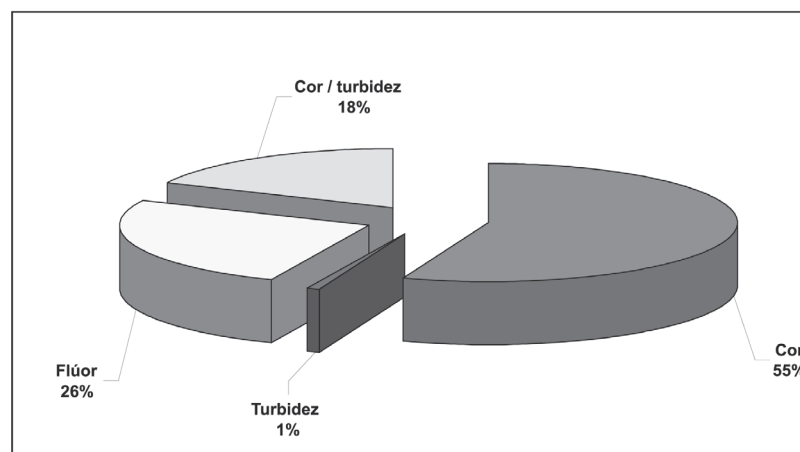


Figura 2. Distribuição percentual das amostras insatisfatórias de poços analisadas no período de 2002 a 2005.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Leis, decretos, etc. Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília: Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev 2001, Seção1, pág. 39.
2. Brasil, Leis, decretos, etc. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990 do Ministério da Saúde. Aprova normas e padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano, a serem observados em todo o território nacional. Brasília: Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jan 1990, Seção 1, pág. 1051.
3. Brasil, Leis, decretos, etc. Portaria nº518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília: Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan 2001, Seção1, pág. 26-8.
4. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3ª ed., São Paulo, 1995, v.1.

Contagem de linfócitos T - CD4+ / CD8+ realizadas no Laboratório Regional de Rio Claro, em amostras de pacientes portadores do vírus HIV

José Antonio Pistarini BERRA & Liliana Brancacio BACETTI

Laboratório Regional de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz – Rio Claro-SP

Os linfócitos desempenham importante função no sistema imunológico humano e são classificados em três populações: os Linfócitos T, os linfócitos B e o linfócito Natural Killer (NK).

Os linfócitos T, por sua vez, são classificados de acordo com seus receptores de membrana (Cluster of Differentiation) em duas sub-populações funcionalmente distintas: linfócitos T CD4+ (Helper/Indutor) e linfócitos T CD8 (Supressor/ citotóxico) ⁵.

Na infecção pelo vírus HIV, o linfócito T CD4+ é o principal alvo e local de replicação, resultando na destruição destes que, juntamente com outras alterações do sistema imunológico, leva à imunodeficiência e, em sua forma mais grave à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

A quantificação dos linfócitos T CD4+/CD8+ é utilizada para monitorar a evolução clínica de indivíduos infectados pelo HIV, orientar o início do tratamento com anti-retrovirais em novos pacientes, trocar medicamentos e adotar medidas preventivas relacionadas com as infecções oportunistas em pacientes que não estão respondendo ao tratamento ^{2,3,6}.

A terapia anti-retroviral é recomendado para todos os pacientes sintomáticos infectados pelo vírus HIV, independente da contagem de linfócitos T CD4+/CD8+; e para os assintomáticos que apresentam contagem abaixo de 200 células/mm³. Para pacientes assintomáticos com contagem entre 200 e 350 células/mm³, recomenda-se avaliar a necessidade do início da terapia ^{2,6}.

Em 1997, o Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de DST e Aids, iniciou a implantação da Rede Nacional de Laboratórios, para contagem de linfócitos T CD4+/ CD8+ e determinação da carga viral⁴.

A Portaria 1.015, de 27 de maio de 2004, do Ministério da Saúde, estabelece que: “a contagem de

linfócitos T CD4+ seja realizada, em cada paciente com HIV/Aids em acompanhamento terapêutico, com uma frequência média de três exames / ano, bem como para auxiliar o diagnóstico da infecção pelo HIV em crianças com até 24 meses de idade”¹.

Em pacientes que apresentam contagem entre 200 e 350 células / mm³, a monitorização clínico-laboratorial e a reavaliação da necessidade do início da terapia anti-retroviral devem ser mais frequentes, pois a diminuição do número de linfócitos T-CD4+ para menos de 200/mm³ pode estar associada a aumento acentuado na incidência de infecções oportunistas e a resposta terapêutica menos duradoura³.

O Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Rio Claro, realiza a contagem de linfócitos T-CD4+ / CD8+ desde o ano 2000, atendendo a demanda dos municípios pertencentes à Direção Regional de Saúde de Piracicaba (DIR - XV - Piracicaba).

A metodologia utilizada para contagem de linfócitos T-CD4+ / CD8+, é a Citometria de Fluxo, que utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos (substâncias fluorescentes), dirigidas contra os antígenos de superfície CD4+, CD8+ e CD3+.

No período de 24/03/2005 a 25/04/2006, foram realizadas 3.706 contagens de linfócitos T CD4+ / CD8+ (Tabela 1) em 1.918 pacientes portadores do vírus HIV. A média de exames/paciente/ano realizada no IAL Rio Claro foi de 1,93, valor este inferior ao recomendado pela Portaria 1.015/2004, que preconiza uma frequência média de 3 exames/ paciente/ ano. Consideramos importante uma avaliação destes dados pelos serviços de saúde dos municípios, tendo em vista a importância da quantificação de linfócitos T CD4+ na avaliação do início da terapia anti-retroviral, da monitorização da evolução clínica da doença e do controle de possíveis falhas terapêuticas.

Tabela 1. Contagem de linfócitos T-CD4⁺/ CD8⁺ realizados no Laboratório Regional de Rio Claro – IAL, no período de 24/03/2005 a 24/04/2006.

	Nº de Pacientes	Nº de Exames	Média de exames pacientes / ano
Ambulatório de DST/Aids de Leme	133	321	2,41
Ambulatório de DST/Aids de Araras	342	680	1.098
Ambulatório de DST/Aids de Limeira	272	479	1,76
Ambulatório de DST/Aids de Pirassununga	102	347	3,40
SAE – Rio Claro	328	687	2,09
CEDIC – Piracicaba	670	1058	1,58
Penitenciária I	24	34	1,41
Penitenciária II	47	100	2,10
TOTAL	1.918	3.706	1,93

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Leis, decretos, etc. **Portaria nº 1.015, 27 de maio de 2004**. Diário Oficial da União, 31 de maio de 2004, Seção 1 . p.57.
2. Brasil. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**, Brasília, 2006, 85p. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm> . [Acesso em: 10/08/2006]
3. Brasil. Ministério da Saúde. **Contagem de células T CD4⁺ e testes de carga viral: Principais marcadores laboratoriais para indicação e monitorização do tratamento anti-retroviral**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/assistencia/Textom.html>. Acesso em: 8/8/2006
4. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional DST e Aids. **Rede Nacional de Laboratórios de CD4⁺/CD8⁺ . Diagnóstico e Acompanhamento**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/LUMIS47A3618FPTBRIE.htm>. Acesso em: 8/8/2006.
5. CRIESP. Central de Radioimunoensaio de São Paulo. CD4/CD8. Disponível em: http://criesp.com.br/Criesp/eventos/html_conteudo-eventos-informativo-cd4cd8.html. Acesso em 15/08/2006.
6. Department of Health and Human Services. **Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-I-infected adults and adolescents**. Abril 7, 2005. Disponível em: <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandadolescentGL.pdf>. Acesso em: 14/08/2006.

Avaliação laboratorial da Tuberculose Pulmonar em amostras analisadas pelo Laboratório Regional de Rio Claro – 2004 / 2005

Dalva Cristina Girello AILY, Liliana Brancacio BACETTI, Daniela Folli MARRACH, Maria do Carmo Gervasio TALANI e Carmem Silvia GRACIANI.
Laboratório Regional de Rio Claro-Instituto Adolfo Lutz

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que, apesar dos avanços tecnológicos na área diagnóstica e a existência de drogas efetivas para o tratamento, ainda persiste como um grave problema de Saúde Pública. Vários fatores contribuíram para o agravamento deste quadro, entre eles: a crise sócio - econômica e o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS).

O diagnóstico laboratorial é de grande importância para o controle da TB pois, além de confirmar a presença do bacilo, permite a avaliação do tratamento, a identificação das cepas circulantes e sua susceptibilidade às drogas.

O objetivo desta avaliação foi analisar a incidência de novos casos de TB e delinear um perfil de susceptibilidade das cepas identificadas frente aos quimioterápicos, a partir dos resultados dos exames laboratoriais realizados no Laboratório Regional de Rio Claro, do Instituto Adolfo Lutz (baciloscopias e culturas) e nos laboratórios municipais da região (baciloscopias).

Para a realização do diagnóstico laboratorial foram utilizadas as seguintes metodologias preconizadas pelo Ministério da Saúde:

- **Baciloscopia:** pesquisa direta dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) utilizando coloração pelo método de Ziehl-Nielsen.
- **Cultura:** descontaminação das amostras de escarro pelo método Swab (NaOH 4%) e semeados em meio de Ogawa-Kudoh (OK) e acrescido de ácido p.nitrobenzóico.
- **Identificação:** provas fenotípicas realizadas pelo IAL-Central;
- **Perfil de sensibilidade:** as cepas são submetidas às drogas utilizadas no esquema terapêutico através do método da Razão de Resistência realizados pelo IAL-Central.

No período de janeiro/2004 a dezembro/2005, fo-

ram realizadas 12.159 baciloscopias (6279 em 2004 e 5880 em 2005) e 1.176 culturas em amostras de escarro (398 em 2004 e 778 em 2005).

Entre as baciloscopias realizadas, 11.003 (90%) foram relativas ao diagnóstico e 1.156 (10%) ao controle do tratamento, com positivities de 8,1% e 13,3 %, respectivamente (Tabela 1).

Nas amostras encaminhadas para cultura (1176), foram isoladas micobactérias em 143 (12,2%) e identificadas 131 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (91,6%) e 12 de outras espécies de micobactérias (8,4%) (Tabela 2). Foram submetidas ao teste de sensibilidade 120 cepas, entre as quais 106 demonstraram sensibilidade às drogas do esquema terapêutico preconizado e 14 apresentaram resistência à pelo menos uma das drogas (Tabela 3).

O Programa de Controle da Tuberculose – PCT recomenda que sejam realizadas baciloscopias em 1 % da população, o que significaria aproximadamente 16.800 baciloscopias/ano, considerando a população da região (1.680.000 habitantes). Os resultados apresentados demonstram que foram realizadas cerca de 37,4% e 35,0%, respectivamente em 2004 e 2005, do total de exames (baciloscopias) esperado. Estes dados sugerem a necessidade da implementação da busca ativa nos serviços de saúde dos municípios da região.

O aumento do número de culturas realizadas no ano de 2005, foi possível devido à ampliação e adequação da área física do Laboratório de Micobactérias do Laboratório Regional de Rio Claro, Instituto Adolfo Lutz, bem como aquisição dos equipamentos necessários, aumentando a cobertura diagnóstica na região.

Os dados obtidos demonstraram a ocorrência de novos casos de TB e a existência de TB multiresistente nos municípios da região. Estes resultados podem contribuir na implementação das ações do PCT nestes municípios.

REFERÊNCIAS

1. Aily, D.C.G. *et al.* Perfil Bacteriológico da Tuberculose Pulmonar na Região de Campinas e das DIRs XII, XV e XX – 1999/2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 62(1): 5-10, 2003.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Profº Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3ªed., Rio de Janeiro, 2005.
- Credidio, R. A. et al. Tuberculose e Micobactérias: Situação dos últimos anos. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, 13(1): 8-9, 2003.

Tabela 1- Baciloscopias realizadas no Laboratório Regional de Rio Claro – Instituto Adolfo Lutz e nos laboratórios municipais da região, em 2004 e 2005.

BACILOSCOPIAS							
Laboratório/Município	Ano	Diagnóstico			Controle do tratamento		
		N	Positivas	%	N	Positivas	%
IAL - Rio Claro	2004	1.498	77	5,1	104	-	
	2005	1.176	75	6,4	89	08	9,0
Araras	2004	362	45	12,4	-	-	
	2005	325	40	12,3	02	02	100,0
Capivari	2004	217	15	6,9	44	08	18,2
	2005	159	04	2,5	28	03	10,7
Conchal	2004	154	14	9,1	09	02	22,2
	2005	192	11	5,7	01	-	
Leme	2004	211	14	6,6	02	02	100,0
	2005	270	22	8,1	07	07	85,7
Limeira	2004	303	29	9,6	282	21	7,4
	2005	279	18	6,4	197	-	
Santa Casa-Limeira	2004	374	68	18,2	-	-	
	2005	309	62	20,1	-	-	
Piracicaba	2004	2.135	187	8,7	170	50	29,4
	2005	2.277	141	6,2	197	44	22,3
Pirassununga	2004	318	13	6,0	10	04	40,0
	2005	195	17	8,7	14	04	28,6
Laborcenter -Rio Claro	2004	186	28	15,1	-	-	
	2005	163	07	4,3	-	-	
	2004	5.658	490	8,7	621	87	14,0
	2005	5.345	397	7,4	535	67	12,5
Total	12159	11.003	887	8,1	1.156	154	13,3

N – Total de amostras analisadas

Tabela 2 – Resultado da Identificação das cepas em amostras positivas

Cepas Identificadas	Número de amostras
<i>M.tuberculosis</i>	131
<i>M.abscessus</i>	3
<i>M.fortuitum</i>	1
<i>M.gordonae</i>	2
<i>M.kansasii</i>	2
<i>M.malmoense</i>	1
<i>M.intracellulare</i>	1
<i>M.peregrinum</i>	1
Cultura mista*	1
Total	143
<i>*Cepa não identificada</i>	

Tabela 3. Perfil de resistência às drogas em cepas de *M. tuberculosis* identificadas no Setor de Micobactérias do IAL – Central, em 2004 e 2005.

Perfil de Resistência	2004	2005	Total
Resistentes	6	8	14
Isoniazida	2	2	4
Estreptomicina	1	1	2
Isoniazina-Rifampicina	1	1	2
Isoniazina-Etambutol	-	1	1
Isoniazina- Rifampicina-Estreptomicina	1	1	2
Isoniazina- Rifampicina-Pirazinamida	1	1	2
Isoniazina- Rifampicina-Pirazinamida-Estreptomicina	-	1	1
Sensíveis	38	68	106

Incidência das eritroenzimopatias na rotina da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz Central

Gisele Rodrigues GOUVEIA, Marilena OSHIRO, Karen MIGUITA
Divisão de Patologia - Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz Central

As eritroenzimopatias são anemias causadas por alterações em genes que codificam as enzimas do ciclo metabólico dos eritrócitos. Estas alterações levam ao comprometimento do rendimento energético dessas células, da sua capacidade redutora para evitar agressões oxidativas e na manutenção da hemoglobina em seu estado funcional, podendo levar o paciente a quadros hemolíticos significativos.³

Por serem células anucleadas e desprovidas de organelas (mitocôndrias, ribossomos, centríolos, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi), os eritrócitos apresentam particularidades metabólicas, uma vez que não são capazes de obter energia, sintetizar proteínas e ácidos nucleicos como as demais células do organismo. Utilizam-se da degradação de glicose como meio para obter energia e manter seu potencial redutor, necessários para permanecer na circulação por 120 dias, cumprindo suas funções celulares.² Cerca de 90% da glicose que penetra na célula é metabolizada por uma via principal (Via Glicolítica) que gera Lactato, Adenosina Trifosfato (ATP) e Nicotinamida Dinucleotídeo Reduzido (NADH) e os 10% restantes, por uma segunda via denominada de Ciclo das Pentoses, que gera Ribose e Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo Reduzido (NADPH).⁵

A Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G-6-PD) é uma enzima que atua na primeira etapa do Ciclo das Pentoses, oxidando a Glicose-6-Fosfato a 6-Fosfogluconato e reduzindo a molécula de Nicotinamida Dinucleotídeo (NAD) a NADPH.¹ Indivíduos com deficiência de G-6-PD, quando expostos a agressões oxidantes mais intensas, como o uso de algumas drogas (sulfa, derivados de primaquina, ácido acetilsalicílico, chumbo, entre outros), estados de acidose diabética, infecções bacterianas ou viróticas, não são capazes de gerar um potencial redutor suficiente, ocorrendo a oxidação de diversos compostos essenciais à sobrevivência dos eritrócitos, sendo facilmente destruídos (hemólise).^{3,5}

A deficiência de G-6-PD trata-se do defeito enzimático mais comum da espécie humana⁴, com inci-

dência bastante elevada em negros, italianos, gregos e judeus³. A herança está ligada ao sexo, sendo a enzima controlada por um gene no locus do cromossomo X. A grande maioria das mulheres heterozigotas são assintomáticas, podendo a atividade enzimática média variar entre normal, moderada ou reduzida, conforme a distribuição da população celular. As manifestações clínicas e sua gravidade dependem da variante da enzima da qual o paciente é portador.⁵

A Piruvatoquinase (PK) é uma das últimas enzimas da Via Glicolítica. Sua deficiência provoca queda no ganho energético do eritrócito, resultando na diminuição do seu tempo de vida na circulação, além do acúmulo anormal de intermediários da glicose, em especial do Difosfoglicerato (2,3-DPG). Trata-se de uma herança autossômica recessiva, sendo, portanto, ambos os sexos igualmente atingidos. As manifestações clínicas estão relacionadas com a intensidade e efeitos da hemólise e intensidade da anemia. Esta pode ser bastante intensa, sendo necessárias transfusões repetidas para garantir a sobrevivência. Os heterozigotos, geralmente são assintomáticos.⁴

O diagnóstico diferencial das eritroenzimopatias é feito pela determinação quantitativa da atividade enzimática do eritrócito.

Com o objetivo de verificar a incidência das eritroenzimopatias na rotina da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz Central, fez-se um levantamento das amostras analisadas no período de Junho de 2004 a Maio de 2006.

Foram realizadas 406 análises, sendo 371 para G-6-PD, 20 para PK e 15 para outras enzimas eritrocitárias: Adenosina Diaminase (ADA), Glutamina Redutase (GR), Aspartato Aminotransferase (AST), Hexoquinase (HX), Fosfoglicoseisomerase (PGI) e Fosfogliconato Desidrogenase (6PGD). Destas, 15,1% (n=56) apresentaram deficiência na atividade de G-6-PD, 25,0% (n=5) de PK, e 6,6% (n=1) de ADA (Gráfico 1).

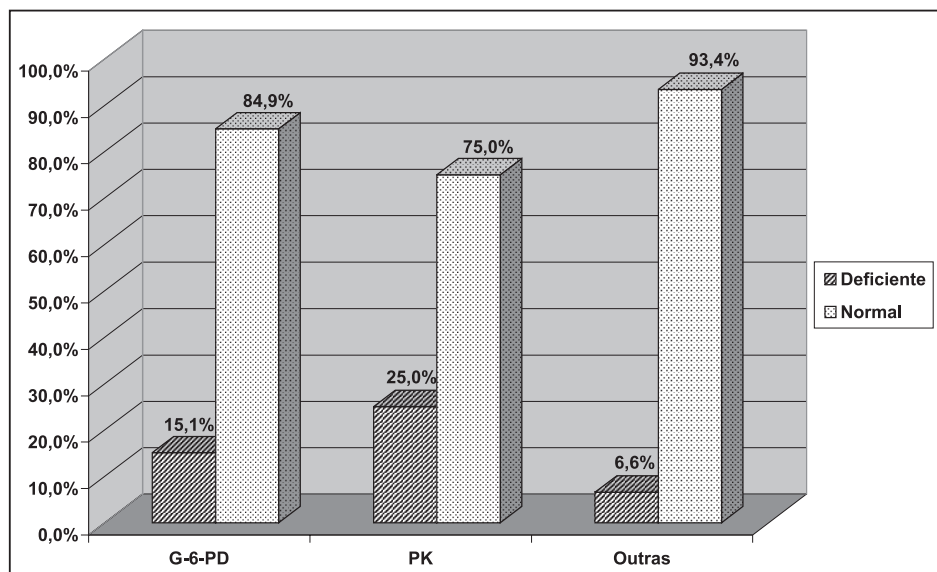


Gráfico 1 – Porcentagem de indivíduos normais e deficientes analisados na rotina do Setor de Eritroenzimopatias da Seção de Hematologia do IAL Central.

Estes dados corroboram a literatura disponível, demonstrando que as deficiências de G-6-PD e PK são as mais comuns e importantes na população.³ Porém, é importante salientar que os dados aqui apresentados não podem ser avaliados como porcentagens representativas de estudos epidemiológicos, uma vez que se tratam de pacientes com suspeita clínica, cujas análises foram realizadas para confirmação do diagnóstico.

Em geral, a suspeita clínica em recém-nascidos surge quando estes apresentam icterícia neonatal muito prolongada e anemia hemolítica não-esferocítica. A maioria das amostras recebidas e das deficiências detectadas em nosso setor, é de recém-nascidos (RN). Já nos adultos, a suspeita ocorre devido a quadros de hemólise intravascular em pacientes aparentemente normais, induzidos por infecções, fármacos (drogas oxidantes) ou favismo (hemólise aguda que se desenvolve após a ingestão de favas frescas).

Devido à grande miscigenação de raças, diversos genes variantes para a G-6PD têm sido detectados. Os efeitos clínicos são bastante variados, podendo os pacientes ser assintomáticos ou apresentarem manifestações de intensidade variada. Assim, o diagnóstico diferencial para as eritroenzimopatias é de extrema importância para garantir um tratamento adequado aos portadores destas doenças.

REFERÊNCIAS

1. Dacie, S.J.V.; Lewis, S.M. - Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. In: Dacie, S.J.V.; Lewis, S.M. - **Practical Haematology**. 8 ed. New York: Churchill Livingstone; 1995, p.215-47.
2. Naoum, P.C. – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G-6-PD). In: Naoum, P.C. - **Eletroforese**. 2ed. São Paulo: Santos; 1999, p.125-9.
3. Oliveira, R.A.G.; Poli Neto, A.; Oshiro, M. - Fisiopatologia e quadro laboratorial das principais anemias. In: Oliveira, R.A.G.; Poli Neto, A. - **Anemias e Leucemias - Conceitos básicos e diagnósticos por técnicas laboratoriais**. São Paulo: Roca; 2004, p.51-83.
4. Valentine, W. N. – Deficiência de Piruvatoquinase. In: Willians, W. J. et al. **Hematologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976, p. 325-7.
5. Zago, M.A. - Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase. In: Zago, M.A.; Falcão, R.P.; Pasquini, R. **Hematologia - Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Atheneu; 2001, p.265-8.

Frequência de anemia microcítica-hipocrômica na rotina da Seção de Hematologia do IAL Central

Regiane de FREITAS, Karen MIGUITA, Israel Tadeu de Jesus ZANELLA
Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, Seção de Hematologia

Anemia é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue está abaixo do normal como resultado da carência de um ou mais nutrientes essenciais, seja qual for a causa dessa deficiência⁵.

De maneira geral, a anemia pode ser desencadeada por vários fatores:

- Baixa ingestão de alimentos ricos em nutrientes necessários para a produção dos eritrócitos e da hemoglobina, como: ferro, vitamina B12 e ácido fólico;
- Perda excessiva de sangue: por hemorragia, menstruação intensa ou verminose;
- Anormalidades genéticas;
- Aumento das necessidades de nutrientes em determinadas fases, como: infância e adolescência (em função do crescimento e desenvolvimento corporal), gestação e amamentação.

Doença de maior incidência no mundo, a anemia, chega a atingir cerca de dois bilhões de pessoas, constituindo um sério problema em saúde pública, pois pode resultar em prejuízos no desenvolvimento mental e psicomotor das crianças, em aumento da morbimortalidade materna e infantil, em queda do desempenho do indivíduo no trabalho e na redução da resistência às infecções⁵.

As anemias microcíticas/hipocrômicas são as formas mais comuns de anemias identificadas em análises clínicas. São caracterizadas pela presença de eritrócitos de pequeno tamanho ($VCM < 80 \text{ fL}$) e pouca concentração de hemoglobina ($CHCM < 32 \text{ g/dL}$) não obrigatoriamente com baixo número de eritrócitos circulantes (eritrócitos normais ou diminuídos)⁴.

Para que um estado anêmico seja diagnosticado com segurança, uma abordagem apenas morfológica muitas vezes se faz insuficiente. Na verdade, a melhor forma de classificar as anemias é correlacionar causa-efeito. Deste modo, uma abordagem fisiopatológica associada ao diagnóstico laboratorial torna-se indispensável.

Em países desenvolvidos a anemia atinge cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva devido a fatores peculiares como menstruação, gravidez e lactação. Nos países em desenvolvimento há uma alta prevalência, princi-

palmente em crianças e gestantes. No Brasil, a prevalência é de 20% em adolescentes, de 15 a 30% em gestantes e de até 50% em crianças de seis a sessenta meses de idade, admitindo-se que a causa principal da enfermidade na infância seja uma dieta com pouca quantidade de ferro ou com ferro de baixa biodisponibilidade^{2,3}.

Visando minimizar a ocorrência da anemia, em 1999, o governo brasileiro, a sociedade civil e científica, organizações internacionais e as indústrias brasileiras firmaram o Compromisso Social para a redução da anemia no Brasil. Este compromisso, que foi corroborado pela Política Nacional de Alimentação e Nutrição neste mesmo ano, explicitou a necessidade de implementação das seguintes estratégias de intervenção em nível nacional: fortificação das farinhas de trigo e de milho com ferro, suplementação medicamentosa de ferro para grupos vulneráveis e orientação alimentar e nutricional¹. Esta é uma medida de baixo custo, de rápida aplicação e de alta efetividade e flexibilidade, sendo socialmente aceita, uma vez que não interfere no modelo alimentar da população, pois utiliza alimentos de uso corrente. Além disso, com pequenas doses de fortificante adicionadas aos alimentos, os riscos de efeitos colaterais e toxicidade são mínimos⁵.

No ano de 2001, o Ministério da Saúde determinou obrigatoriedade na adição de ferro (30% IDR ou $4,2 \text{ mg/100g}$) e ácido fólico (70% IDR ou $150 \mu\text{g}$) nas farinhas de milho e trigo. A fortificação deixa de ser facultativa e passa a ser obrigatória. Esta medida tem como objetivo aumentar a disponibilidade de alimentos ricos em ferro e ácido fólico para a população brasileira e assim contribuir para redução da anemia e defeitos do tubo neural no Brasil¹. No entanto, o sucesso deste programa dependerá também de uma ampla campanha de educação nutricional, para que a população conheça a gravidade da doença e adquira o hábito de consumir, com frequência, alimentos naturalmente ricos em ferro e os enriquecidos ou fortificados.

Devido a alta incidência de anemia na população geral, foi feito um levantamento dos hemogramas realizados no período de 2003 a 2004 na Seção de Hematologia do IAL Central onde constatou-se que dos 3.829 hemogramas realizados, 5,1% apresentaram quadro

de anemia, e destes 60,2% foram sugestivos de anemia microcítica/hipocrômica, com maior prevalência em mulheres (71,2%). Estes dados corroboram os achados na literatura atual, que mostram alta incidência de anemia apesar dos programas de controle e prevenção.

REFERÊNCIAS

1. Coordenação geral da Política de Alimentação e Nutrição - CGPAN; [http://www.dtr2004.saude.gov.br/nutricao]. 1 de julho de 2006.
2. Corrêa, M. Baldessar, M. Z.; Fissmer, L.E.W.; Fissmer, J.F.W. Prevalência das anemias em pacientes hospitalizados. **Revista On-line da Associação Catarinense de medicina**, 33 (1): 36-41, 2004.
3. Costa, R.B.L.; Monteiro, C.A. Consumo de leite de vaca e anemia na infância no município de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, 38 (6): 797-803, 2004.
4. Oliveira, R.A.G.; Neto, A.P. Anemias. In: Oliveira, R.A.G. In: Neto, A.P. **Anemias e Leucemias: Conceitos básicos e diagnósticos por técnicas laboratoriais**; 1ª Ed., São Paulo: Rocca: 2004; p. 26-38.
5. Tuma, R.B.; Yuyama, L.K.O.; Aguiar, J.P.L.A. et al. Impact of cassava flour fortified with iron amino acid chelate on the hemoglobin level in pre-schools. **Rev. Nutr.**, 16 (1): 29-39, 2003.

Estudo da correlação cito-histológica realizado no Setor de Citologia Oncótica - Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Andréia Neves COMODO, Giovanna Candiotti VIEIRA, Fabio Eiji NAKANO, Celina Lie FUKUE, Neuza Kasumi SHIRATA, Sonia Maria Miranda PEREIRA, Celso DI LORETO.
Instituto Adolfo Lutz – Divisão de Patologia - Seção de Citologia Oncótica -São Paulo

O exame citológico de amostras cérvico-vaginais é descrito como um dos instrumentos mais eficientes para detecção das lesões precursoras do câncer de colo uterino em grandes populações⁶. A sua correlação com o exame histológico tem sido apontada como um dos mais eficazes parâmetros para se obter confiabilidade diagnóstica e garantia de uma conduta adequada à paciente¹. Além disso, o diagnóstico histológico é reconhecido como padrão-ouro na avaliação de lesões teciduais, sendo utilizado como preceito confirmatório dos achados citopatológicos⁶.

No entanto, estas duas ferramentas apresentam limitações que levam a discordâncias diagnósticas entre a citologia e a histologia. Ambos métodos possuem limitações relacionadas a erros de interpretação e amostragem. Tais limitações podem ser explicadas pela considerável subjetividade na análise morfológica e também pela alta porcentagem de amostras não representativas causadas pela coleta inadequada do material^{1,2}.

Como estratégias para melhoria da qualidade dos diagnósticos citológicos, novas metodologias de revisão sistemáticas foram desenvolvidas, como a revisão aleatória de 10% e revisão rápida de 100% dos exames citológicos negativos da rotina diária, com objetivo de reduzir os diagnósticos falsos negativos e padronização dos diagnósticos morfológicos⁵.

O presente estudo teve como objetivo correlacionar os resultados cito-histopatológicos das amostras cérvico-vaginais.

Foi realizado levantamento de 424 casos consecutivos de citologia cérvico- vaginal examinados no Setor de Citologia Oncótica – Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, no período de Janeiro de 2001 a Outubro de 2004, com alterações morfológicas e classificados pelo Sistema de Bethesda 2001⁴ como: ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), AGUS (células glandulares atípicas de significado indeterminado), LSIL (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau), carcinoma invasor e adenocarcinoma de colo uterino. Os exames histológicos foram classificados de

acordo com a terminologia da OMS³: cervicite, NIC 1 (neoplasia intraepitelial cervical grau 1); NIC 2 (neoplasia intraepitelial cervical grau 2, NIC 3 (neoplasia intraepitelial cervical grau 3); carcinoma invasor e adenocarcinoma.

A fim de permitir a comparação dos dados para a realização do estudo estatístico, a terminologia histológica NIC1 e NIC 2/3 foi equiparada com a classificação de Bethesda LSIL e HSIL respectivamente.

A correlação cito-histológica foi categorizada como concordante (quando os dois diagnósticos foram coincidentes) e discordantes (para os diagnósticos com um ou mais graus de diferença). As categorias ASCUS e AGUS foram analisadas separadamente por não apresentarem correlação com a interpretação histológica.

Dos 424 casos selecionados, 178 (42,0%) foram integralmente concordantes, 106 (25,0%) discordantes e 140 (33,0 %) pertenciam as categorias ASCUS/AGUS que foram analisadas separadamente. A Tabela 1 mostra a distribuição da correlação cito-histológica dos casos estudados.

Foi observado neste estudo uma alta porcentagem de concordância de 50% (74/148) nos casos de LSIL/NIC 1; 77 % (98/127) nos casos de HSIL/NIC2 e NIC 3; 62,5 % (05/08) de carcinoma invasor e 100% (1/1) de adenocarcinoma.

Em nosso estudo, dos 136/424 (32%) casos de ASCUS diagnosticados na citologia, foi observado na biópsia 56,6 % (77/136) de cervicite, 25% (34/136) de NIC 1, 6,6% (09/136) de NIC 2, 10,3% (14/136) de NIC 3 e 1,5% (02/136) de carcinoma invasor. Dentre os 4 casos de AGUS, 75% (03/04) foram cervicites e 25% (01/04) de NIC 3.

Segundo alguns autores cerca de 10 a 15% dos pacientes com ASCUS apresentam na verdade lesão de alto grau ou câncer. Além disso, o diagnóstico citológico de ASCUS e AGUS precede em mais de 50% das vezes uma lesão de alto grau².

Observando os nossos resultados, onde encontramos 16,9 % de NIC 2/3), 1,5 % de carcinoma invasor e 25% de NIC 3, nas biópsias das pacientes com diagnósti-

co citológico de ASCUS e AGUS respectivamente, recomendamos o acompanhamento mais detalhado destas pacientes com seguimento de 6 em 6 meses.

Nossos resultados demonstraram a grande importância da realização da correlação cito-histopatológica na detecção das falhas diagnósticas para melhoria e garantia de qualidade dos diagnósticos cito-histopatológicos.

A discordância diagnóstica entre a citologia e a histologia está relacionada, principalmente, a erros de interpretação e amostragem. Apesar dos rigorosos parâmetros morfológicos, a subjetividade na análise também pode justificar as tendências de sub ou superestimar o diagnóstico.

REFERÊNCIAS

1. Di Loreto C.; Utagawa M.L.; Longatto Filho A.; Alves V.A F. Garantia de qualidade em citopatologia: aspectos da correlação cito-histopatológica. **Rev Ass Med Brasil**. 43: 195-8, 1997.
2. Gupta, S; Sodhani, P. Why is high grade squamous intraepithelial neoplasia under-diagnosed on cytology in a quarter of cases? Analysis of smear characteristics in discrepant cases. **Indian J Cancer**. 41(3):104-8, 2004.
3. Scully,R.E.; Bonfiglio, T.A.; Kurman, R.J.; Silverberg, S.G.; Wilkins E.J. Histological typing of female genital tract tumors. World Health Organization International histological classification of tumors, 2th ed. Berlin: Springer- Verlag; 1994.
4. Solomon, D.; Davey D.; Kurman R.; Moriarty, A.; O'Connor, D.; Prey, M.; Raab, S.; Shermann, M.; Wilbur, D.; Wright, T JR.; Young, N. FORUM GROUP MEMBERS; BETHESDA 2001 WORKSHOP. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**. 24;287(16):2114-9, 2002.
5. Mattosinho de Castro Ferraz, MG.; Dall'Agnol, M.; di Loreto, C.; Pirani, W.M.; Utagawa, M.L.; Pereira, S.M.M. et al. 100% rapid rescreening for quality assurance in a quality control program in a Public Health Cytologic Laboratory. **Acta Cytol** 49(6):639-43,2005.
6. Pinto, A. P.; Guedes, G.B.; Tuon, F.F.; Maia, H.F.; Collaço, L.M. Cervical Câncer screening program of Paraná: Cost-effective model in a developing country. **Diagn Cytopathol**. 33 (4):279-83, 2005.

Tabela 1. Distribuição da correlação dos diagnósticos cito-histológicos dos 424 casos estudados no Setor de Citologia Oncótica - IAL, no período de Janeiro de 2001 a Outubro de 2004.

Histo / Cito	Cervicite	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor	Adenoca	Total
ASCUS	77	34	09	14	02	-	136
AGUS	03	-	-	01	-	-	04
LSIL	53	74*	14	06	01	-	148
HSIL	15	13	28*	70*	01	-	127
Ca invasor	-	-	03	-	05*	-	08
Adenoca	-	-	-	-	-	01*	01
Total	148	121	54	91	09	01	424

* Casos concordantes

Controle de material reciclado de embalagens plásticas de agrotóxicos, vazias

Heloisa H.B. de TOLEDO¹, Áurea S. CRUZ², Sonia B. ROCHA¹, Tamiko I. IKEDA², Elaine C. D. LOIOLA¹, Eduardo M. A. PEIXOTO³

¹ Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais, do Instituto Adolfo Lutz

² Seção de Culturas Celulares, do Instituto Adolfo Lutz

³ Consultor do Instituto Nacional de Processamento Embalagens Vazias (INPEV)

O solo, enquanto não havia preocupação com a contaminação ambiental, foi, por muito tempo, considerado como local seguro para o depósito de resíduos e de embalagens de agrotóxicos.

Entretanto as embalagens vazias de agrotóxicos como resíduos sólidos, provocam grandes danos ao ambiente, tais como, impacto visual, entupimento de canais de drenagem, atrapalham o preparo do solo, entre outros.

Segundo Sethunathan ⁴, as embalagens e/ou resíduos, em contato com o solo ou com a água, podem originar três tipos de reação: degradação completa sem a formação de metabólitos; degradação incompleta com acúmulo de metabólitos não degradáveis; e, pequenas alterações levando ao acúmulo e a alta persistência dos produtos em função de deposições sucessivas.

Nos últimos 30 anos, a quantidade de dejetos triplicou, principalmente por causa dos restos de embalagens, sendo o aumento e a intensidade de industrialização, considerados as principais causas de sua origem e produção. Aliado ao fato de se estar produzindo mais detritos, sem que tenham um devido tratamento, ocorre uma exploração dos recursos naturais não renováveis⁵.

Sendo assim, a reciclagem é a forma mais racional de eliminação de embalagens usadas, pois, após uso, o material volta para o ciclo de produção, o que soluciona ao mesmo tempo, a superlotação nos aterros sanitários. Ao longo dos anos, o Brasil tornou-se um grande reciclador de materiais como o alumínio e o papelão, mas continua reciclando pouco plástico cujo valor de mercado da sucata é muito baixo. Um dos entraves, é que acabam sendo mais negociados os materiais que tem melhor relação de valor no item peso e outro é que a percepção da necessidade de preservação ambiental, ainda é incipiente na sociedade brasileira.

A lei federal nº 9.974, complementada pela resolução 334^{1,2} trouxe uma solução viável para o meio ambiente relacionado com o descarte de embalagens vazias de agrotóxicos. As embalagens após triplice lavagem são encaminhadas para estocagem temporária em postos e centrais de recolhimento distribuídos em todo o país, de onde poderão ser transportadas para reciclagem.

Com a possibilidade de serem encontrados resíduos de agrotóxicos (2,4'DDD, 2,4'DDE, 2,4'DDT, 4,4'DDD, 4,4'DDE, 4,4'DDT, Acefato, Aldicarb (sulfona), Aldicarb (sulfóxido) Aldicarb, Aldrim, Aletrina, Difenconazole, Atrazina, Azinfós metílico, Azoxistrobina, Betacipermetrina, Bifentrina, Bioaletrina, Captana, Carbaril, Carbofenotiona, Carbofurano Ciflutrina, Cipermetrina, Ciproconazol, Clorotalonil, Clorpirifós etílico, Clorpirifós metílico, Deltametrina, Diazinona, Dicofol, Dieldrin, Difenconazole, Dimetoato, Disulfotona, Endosulfam (alfa), Endosulfam (beta), Endosulfam (sulfato), Endrin, Esfenvalerato, Etoprofós, Fenamifós, Fenpropatrina, Fentiona, Fentoato, Fenvalerato, HCH (alfa), HCH (beta), HCH (delta), Heptacloro, Heptacloro-epóxido, Hexaclorobenzeno, Iprodione, Lambda-cialotrina, Lindana, Metamidofós, Metidationa, Mevinfós, Mirex, Monocrotofos, Permetrina, Pirimifós etílico, Pirimifós metílico, Profenofós, Pirazofós, Tebuconazol, Terbufós, Tetradifona, Triazofós, Triclorfom e Trifuralina) e substâncias citotóxicas em seu estado original, amostras provenientes de material reciclado (Garrafa Plástica para óleo Motor, Embalagem 100% virgem, Plástico granulado Corda Preta (Parte Branca), Corda Preta (Parte Preta), Corda Azul, Tampas Virgens, Tampas 50% Reciclado, Flakes Coex MBP, Pellets Coex MBP) foram encaminhadas pelo Instituto Nacional de Embalagens Vazias (INPEV) para serem analisadas. Dois tipos de análises foram utilizadas:

• Resíduos de agrotóxicos por cromatografia

Realizada após corte em pedaços pequenos do material enviado, extração com solventes orgânicos (monitorado através de um pesticida marcador, clorpirifós etílico) e injeção em cromatógrafos (GC/ECD, GC/FPD, GC/MSD, HPLC/UV) fazendo uso de um injetor automático. Para cada agrotóxico foi preparada uma curva de calibração (área do pico x concentração) e o cálculo do resíduo foi realizado usando-se a regressão linear obtida. As condições de operação dos aparelhos foram previamente determinadas.

• Citotoxicidade *in vitro*

Realizada pelo método de difusão em Agar, cujo parâmetro de avaliação é viabilidade celular. A toxicidade quando presente é detectada por alterações de morfologia celular e pela presença de halo claro, correspondente às células mortas sob ou ao redor das amostras. Estes halos, após serem quantificados são graduados em índices de zonas (IZ), segundo a Farmacopéia Americana 25⁵.

Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 1 que mostra que das sete amostras analisadas três apresentaram resíduos de pesticidas pesquisados em níveis superiores a 0,1mg/kg. No entanto, na avaliação de citotoxicidade *in vitro*, Tabela 2, nenhuma das amostras analisadas pelo método de difusão em agar apresentou efeito tóxico para a linhagem celular NCTC clone 929, não tendo sido observado (Figura 1 e 2) alterações celulares ou zonas claras correspondente às células mortas não impregnadas pelo corante vital (vermelho neutro) sob ou ao redor da amostra.

Tabela 1: Resultados dos resíduos de agrotóxicos no material reciclado

Material	Resíduo*(mg/kg)
Corda Preta (Parte Branca)	< 0,1
Corda Preta (Parte Preta)	< 0,1
Corda Azul	< 0,1
Tampas Virgens	< 0,1
Tampas 50% Reciclado	1,1 (Clorpirifós etílico)
Flakes Coex MBP	4,0 (Clorpirifós etílico)
Pellets Coex MBP	2,0 (Clorpirifós etílico)

*Para cada ingrediente ativo analisado dentro da lista de pesticidas citada

Tabela 2: Resultados do teste de citotoxicidade *in vitro* apresentando a medida dos halos de toxicidade (cm) e sua graduação em índice de zona (IZ) na linhagem celular NCTC clone 929

Material	Halo de toxicidade(cm)	IZ*
Corda (Parte Branca)	0,0	0
Corda (Parte Preta)	0,0	0
Corda Azul	0,0	0
Tampas Virgens	0,0	0
Tampas 50% Recicladas	0,0	0
Flakes Coex MBP	0,0	0
Pellets Coex MBP	0,0	0
Controle negativo	0,0	0
Controle positivo	1,0	4
Clorpirifós etílico 0,01%	sob	1

*IZ= 0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra

IZ = 1 alteração ou degeneração celular sob a amostra

IZ = 2 halo claro limitado sob a amostra

IZ = 3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra

IZ = 4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

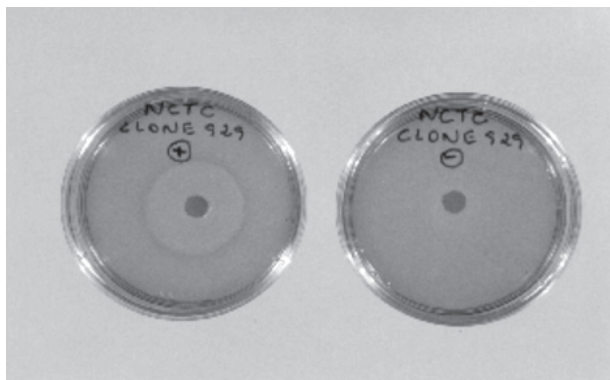


Figura 1 - Placas da linhagem celular NCTC clone 929 utilizadas no método de difusão em ágar, apresentando halo claro ao redor do controle positivo e ausência de halo ao redor ou sob o controle negativo

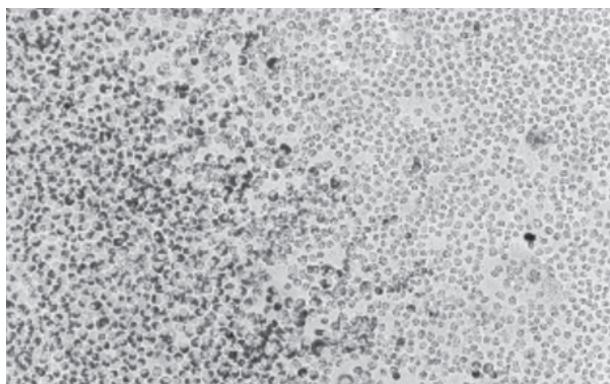


Figura 2 - Fotomicrografia da monocamada da linhagem celular NCTC clone 929 no método de difusão em ágar apresentando as células coradas e as células claras e lisadas caracterizadas pela presença do efeito tóxico – 100x

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde, ANVISA. Lei9974 de 6 de junho de 2000. **DOU**, Brasília, 12 de julho de 2000
2. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 334 de 3 de abril de 2003.
3. RYGAARD, C. Lixo. Problemas, alternativas e oportunidades. Informativo. Instituto Ecológico Aqualung. Rio de Janeiro, RJ. N. 44, Ano VIII, pp.4-8, jul./ago., 2002.
4. SETHUNATHAN, N. Microbial degradation of insecticides in flood soil in anaerobic culture. *Residue Reviews*, New York, v.47, p.143-65, 1973.
5. UNITED States Pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.1893-5.

Reação de Amplificação de Ácidos Nucléicos em *Cryptosporidium* sp: inibição, prevenção e controle

Therezinha Travassos Ribeiro de CARVALHO

Instituto Adolfo Lutz - Serviço de Parasitologia - Seção de Enteroparasitoses

O protozoário parasita *Cryptosporidium* sp tem sido reconhecido como um importante patógeno emergente. Na década de 1980, com a epidemia da Aids, a criptosporidiose emergiu como doença sem cura nessa população, e em 1993 alcançou conhecimento público com o surto de veiculação hídrica em Milwaukee, EUA, acometendo aproximadamente 403.000 pessoas, com 100 óbitos, sendo 69 indivíduos com Aids.

O fator limitante das técnicas convencionais de diagnóstico de parasitas, a microscopia, que ainda é o padrão ouro, e os testes imunológicos, é que nenhuma é específica para *Cryptosporidium hominis* ou *C. parvum* e requerem grande quantidade de oocistos para sua detecção. Além dessas duas espécies, outras seis espécies de *Cryptosporidium* já foram identificadas como causadoras de infecção humana, tanto em indivíduos imunodeprimidos quanto em imunocompetentes. Uma vez que as espécies de *Cryptosporidium* são muito pequenas, medindo de 4,5 a 6,0 µm de diâmetro, e morfologicamente semelhantes, difíceis de corar e de serem detectadas, não é possível a identificação específica pela microscopia óptica. Cada espécie possui ciclo de transmissão e hospedeiros diferentes, tornando necessário lançarmos mão do uso de uma ferramenta mais potente visando conhecer a epidemiologia de cada uma.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) descrita por Saiki e cols. (1985) e Mullis e Fallona (1986) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de uma região específica do ácido desoxirribonucleico (DNA) que fica compreendida entre duas regiões de uma sequência conhecida do DNA. É uma técnica potencialmente sensível, possibilitando detectar até uma única molécula de ácido nucleico, pois o método amplifica milhares de vezes o trecho do DNA alvo, com o uso de uma enzima termoestável⁴. A PCR e a tecnologia relacionada tornaram-se uma ferramenta muito rápida e confiável para o diagnóstico de grande variedade de doenças infecciosas. Tem sido utilizada para detecção de microorganismos em culturas microbiológicas, em tecidos e diretamente de amostras clínicas e ambientais e em alimentos.

Um dos problemas centrais encarados pelos microbiologistas que usam PCR é determinar o método mais eficiente - rápido e sensível - para isolar pequenas quantidades de DNA a partir de um número limitado de células.

As principais vantagens do uso dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos para muitos microorganismos são a alta especificidade e sensibilidade das reações. Porém, para os coccídios, há que se atentar para a fidelidade dos resultados, uma vez que os problemas reportados são os resultados falso-positivos, devido à reação cruzada ou os resultados falso-negativos, devido à inibição da reação, por diversas fontes de contaminação.

A maneira de controlar os resultados falso-positivos é incluir em cada ensaio, reações-controle com amostras negativas, amostras positivas e amostras brancas (utilizando apenas os reagentes da PCR). O uso desses controles assegura a fidelidade dos resultados. A inibição pode ser consequência do controle inadequado das condições da reação, da própria amostra, de contaminantes nos reagentes ou nos frascos ou de eventual contaminação durante o preparo da reação.

Já existem várias metodologias para extração de DNA de microorganismos, com pequenas modificações de uma para outra, visando resolver problemas específicos para cada espécie em estudo.

Novos métodos de detecção de *Cryptosporidium* sp têm sido desenvolvidos com finalidade diagnóstica, para uso em estudos epidemiológicos ou experimentais, e para monitoramento da água e avaliação da viabilidade dos oocistos. Os oocistos persistem no ambiente podendo permanecer viáveis na água por mais de três meses e são resistentes aos processos usuais de tratamento da água para consumo humano.

Os parasitos protozoários, em particular os coccídios, apresentam como desafio fornecer, consistentemente, amostras de DNA limpas e confiáveis. Isto está diretamente relacionado à natureza do organismo, sua resistência ao rompimento e lise e a matriz onde o parasito está presente. Um procedimento eficiente para extração de DNA dos espécimes fecais deve liberar o DNA do parasito dos esporos, dos oocistos ou dos cistos; prevenir a adsorção do DNA aos constituintes fecais e remover os inibidores da PCR. Outro fator que dificulta todos os procedimentos de extração do DNA é a não uniformidade dos espécimes fecais, que podem variar grandemente em sua composição dependendo da dieta, das condições de saúde e da flora intestinal do paciente.

Numerosas pesquisas demonstram que as amostras orgânicas, como fezes, água e solo podem ter a sensibilidade da PCR muito reduzida devido à presença dessas substâncias inibidoras. Abordagens básicas que têm sido usadas para eliminar esses inibidores incluem a remoção e purificação dos oocistos de *Cryptosporidium* sp antes da extração do DNA, empregando-se métodos de concentração e de purificação através do uso de gradientes de densidade de sacarose ou de Percoll, da tecnologia de pérolas imunomagnéticas e a remoção dos inibidores durante a extração direta do DNA, como por exemplo, *spin columns*. No exterior, a maioria dos pesquisadores faz uso de vários kits para concentração, extração e purificação do DNA de *Cryptosporidium* sp, o que não é viável para os laboratórios brasileiros.

Vários autores citam problemas no isolamento e purificação de DNA de *Cryptosporidium* sp, tanto em amostras fecais como em amostras ambientais (água bruta, água tratada, lodo de esgoto, solo) e amostras de alimentos (verduras e frutas).

Os protocolos de extração utilizam a quebra física, mecânica ou enzimática da parede – dupla e muito resistente – do oocisto de *Cryptosporidium* sp. Em amostras fecais ou ambientais, o isolamento de DNA requer mecanismos que possam eliminar os problemas gerados durante a extração. O DNA alvo deve ser puro suficiente para não interferir nos tratamentos enzimáticos ou causar problemas durante a eletroforese.

A extração de DNA de células eucariontes consta fundamentalmente de três etapas: ruptura das células para liberação dos núcleos; desmembramento dos cromossomos em seus componentes básicos, DNA e proteínas e separação do DNA dos demais componentes.

As membranas celulares devem ser rompidas para liberação do DNA. Essa etapa é realizada pela ação de um detergente como o SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Para oocistos de *Cryptosporidium* sp a solução de lise contendo TrisHCl, EDTA, SDS, β -mercaptoetanol e proteinase K, incubada a 65°C por três horas tem sido utilizada para amostras clínicas e ambientais, com bons resultados^{1,2,3}.

O SDS é um tenso ativo utilizado para permeabilizar a membrana celular, dissolvendo os lipídeos (moléculas de gordura) e proteínas da célula, além de quebrar as ligações que mantêm a membrana celular intacta. A proteinase K é eficiente em remover proteínas adicionais do DNA durante a extração.

Deve-se evitar a ação de DNases, que podem degradar o DNA. Por isso, os tampões de extração devem ter o pH por volta de 8,0. A adição de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) ao tampão de extração inibe a ação de DNases.

Para proteger o DNA da ação dos compostos fenólicos que oxidam o DNA irreversivelmente, tornando-o inacessível às enzimas de restrição, deve ser adicionado agentes anti-oxidantes, como o PVP (polivinilpirrolidona), BSA (albumina de soro bovino) ou β -mercaptoetanol ao tampão de extração. A adição desses facilitadores tem sido reportada como aumento na especificidade da PCR permitindo a amplificação de seqüências de DNA ricas em G-C, como é o caso de *Cryptosporidium* sp.

Os ácidos nucleicos precisam ser separados das proteínas e para isso acontecer realiza-se a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), que desnaturam as proteínas. Este é o protocolo padrão para diferentes tipos de espécimes biológicos incluindo tecidos animais e vegetais, material forense e arqueológico e fluidos do corpo.

O fenol é usado para desnaturar e remover proteínas e outros contaminantes da solução aquosa que contém os ácidos nucleicos. O clorofórmio ajuda a desnaturar proteínas e a remover o fenol residual. O álcool isoamílico é geralmente adicionado ao clorofórmio para reduzir espuma.

O álcool isopropanol gelado faz com que as moléculas de DNA se aglutinem (precipitem) formando uma massa filamentosa e esbranquiçada. Após uma lavagem com álcool etanol gelado, o DNA precisa ser seco para evaporar completamente o álcool e depois ser eluído com 50 μ l de tampão TEII (Tris-EDTA) e armazenado a 4°C até o momento de ser utilizado na amplificação pela reação em cadeia da polimerase.

A extração de DNA baseada na utilização de fenol, apesar de bastante eficiente pode, no entanto, comprometer a qualidade do DNA caso resíduos de fenol permaneçam na amostra. O fenol pode inibir a ação da enzima Taq DNA polimerase impedindo o processo de amplificação do DNA.

Os espécimes fecais estão entre os mais complexos espécimes para detecção por PCR direto devido à presença de inibidores de PCR que freqüentemente são co-extraídos com o DNA do microorganismo alvo. Os inibidores potenciais encontrados nas fezes incluem sais biliares, complexos de carboidratos e complexos de polissacarídeos, possivelmente de origem vegetal.

A falta de uniformidade das amostras fecais em termos de matéria física, organismos alvos, e flora fecal associadas torna a extração de DNA de espécimes fecais altamente variável. Resultados de PCR falso-negativos podem ser devido à presença de pequeno número de organismos alvo no volume de amostra fecal examinada e da decrescente estabilidade das células estocadas.

Os fatores que inibem a amplificação dos ácidos nucleicos pela PCR estão presentes nos DNA alvos em diferentes tipos de amostras. Os inibidores geralmente atu-

am em um ou mais dos três pontos cruciais da reação. As substâncias inibidoras interferem na lise da célula, necessária para extração do DNA; interferem na degradação ou captura do ácido nucléico e inibem a atividade da polimerase para a amplificação do DNA alvo. Esses efeitos adversos têm implicações importantes nas investigações clínicas e de Saúde Pública, principalmente se as investigações envolvem triagem de alimentos ou de amostras ambientais. Inibidores comuns incluem vários componentes dos fluidos do corpo (hemoglobina, uréia, heparina), constituintes de alimentos (compostos orgânicos e fenólicos, glicogênio, gorduras) e compostos ambientais (compostos fenólicos, ácido húmico, metais pesados). Outros inibidores mais amplamente disseminados incluem constituintes de células bacterianas, DNA de outros organismos presentes na amostra, itens de laboratório como talco da luva, utensílios plásticos, celulose e pólen. É recomendável o uso de luvas sem talco ou a lavagem das luvas com talco antes de iniciar os procedimentos.

Contaminação e outros fatores intimamente ligados à reação, até mesmo componentes inertes podem causar inibição, ainda que seus mecanismos de ação não sejam compreendidos. A contaminação pode ser endógena (amostra, enzima, tubos) ou exógena (bactéria, poeira, pólen) aos componentes da reação.

A origem mais óbvia de contaminação endógena são os compostos presentes na amostra de DNA não purificado devidamente. Outros fatores incluem a qualidade da enzima e dos microtubos utilizados.

Um procedimento para diminuir o efeito dos inibidores da PCR, é diluir a amostra, potencialmente, sem mascarar o DNA pela diluição das substâncias inibidoras. Porém, ao mesmo tempo, a sensibilidade do teste pode ser comprometida por causa dos efeitos da diluição do DNA.

Um aspecto elementar na amplificação do DNA é a falha da exposição dos ácidos nucléicos como alvo de amplificação que resulta na falha da reação. A perda da integridade da parede celular às vezes não é suficiente para liberar o DNA e a degradação enzimática dos detritos celulares geralmente é necessária.

Para a amplificação do ácido nucléico usa-se uma mistura de PCR, a *master mix*, que já é comercializada pronta ou pode ser preparada pelo pesquisador.

A concentração ótima da dNTP - deoxinucleosídeo trifosfato – depende da concentração do $MgCl_2$, da estringência da reação, da concentração do *primer*, do comprimento do produto a ser amplificado e do número de ciclos da PCR.

Condições de reação subótimas devem-se principalmente a seleção imprópria dos iniciadores (*primers*), tempo e temperaturas impróprias, variação da qualidade da polimerase e concentração incorreta de $MgCl_2$. Esses

fatores podem ser otimizados fazendo-se vários perfis de temperatura baseados no cálculo do *melting point* dos iniciadores e de diluições seriadas de $MgCl_2$. Os íons Mg^{2+} são um co-fator vital para a *Taq*-polimerase e sua concentração afeta a especificidade da amplificação.

Autores sugerem que a adição de DMSO (dimetil sulfoxido) à mistura de PCR melhora o resultado porque elimina amplificação inespecífica ou porque o DMSO poderia aumentar a eficiência de anelamento dos iniciadores pela desestabilização das estruturas secundárias dentro do *template* (DNA molde).

Compostos húmicos são os inibidores mais comumente relatados em amostras ambientais. A adição de polivinilpirrolidona (PVP) ou polivinilpolipirrolidona (PVPP) supera a inibição e permite a separação dos compostos húmicos do DNA durante a eletroforese em gel de agarose. Alguns autores identificaram que a causa da inibição dos compostos húmicos é a sua interferência com as enzimas líticas, se ligando com o DNA e as proteínas e interferindo com a ligação entre o DNA alvo e a polimerase. Os compostos fenólicos das amostras ou carregados pelos procedimentos de purificação orgânica do DNA podem inibir a reação pela ligação ou desnaturação da polimerase. Proteinases e desnaturantes usados para a lise celular podem ser carregados e inativar a polimerase se a purificação do DNA for inadequada.

Resumidamente, as seguintes precauções devem ser tomadas a fim de otimizar as reações de PCR: utilizar material descartável livre de DNA e/ou RNA; utilizar reagentes previamente distribuídos em alíquotas e em lotes submetidos a um controle de qualidade; utilizar pipetas automáticas; analisar os produtos da amplificação em uma área fisicamente separada da área onde reagentes e amostras são preparadas; determinar empiricamente a concentração de $MgCl_2$ ótima para cada reação, pois com pouca quantidade a *Taq* DNA-polimerase é inativa e o excesso de Mg^{2+} livre causa redução da fidelidade enzimática e aumento de produtos não específicos; é recomendado 1,25 U da *Taq* DNA-polimerase em 50 μ l de reação (A adição de mais enzima não altera o produto da PCR. Rastros de DNA em gel (*smearing*) de agarose significam um tempo de extensão muito longo e excesso de enzima); os *primers* (iniciadores) devem ter o tamanho de 15 - 30 nucleotídeos e conter aproximadamente de 40 - 60% de G+C; determinar corretamente a temperatura e o tempo de anelamento dos *primers*; usar reagentes protetores da molécula de DNA como PVP e β -mercaptoetanol.

Observando-se esses preceitos, desenvolveu-se uma metodologia *in house* para extração de DNA genômico de oocistos de *Cryptosporidium* sp, presente em amostras clínicas e ambientais, eficiente, reprodutível, com preços acessíveis e compatível com a realidade brasileira ^{1,2,3}.

REFERÊNCIAS

1. Almeida TTC de. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase).** São Paulo; 2004.[Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
2. Araújo, RS., Carvalho-Almeida TT., Matté GR., Rojas MVR., Pereira, A., Matté, MH. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água salobra. **BIAL** 2005; 15(2):
3. Carvalho-Almeida, TT., Casimiro, AM., Matté, GR., Matté MH. An improved method for extracting *Cryptosporidium* sp. DNA from preserved faeces and potential application for Cryptosporidiosis surveillance. **REVISA** 2005; 1(3): 208-14.
4. Newton CR., Graham A. **PCR**. 1997. 2nd ed. BIOS Scientific Publishers Limited, UK.

Influência da Modulação Imunológica Induzida pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) na Infecção Cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV)

Carolina Nigro STELLA

Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, Seção de Citologia Oncótica.

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus não-envelopado, com capsídeo icosaédrico e uma única molécula circular de DNA dupla-fita. Sua principal via de transmissão se dá através do contato sexual. Existem cerca de 200 tipos de HPV identificados e classificados de acordo com pequenas alterações em seu genoma.

O HPV está associado a uma grande diversidade de condições clínicas que variam desde verrugas comuns até câncer. A maioria das lesões causadas pelo HPV é benigna. No entanto, durante a infecção pelo HPV, a integração anômala do DNA viral aos cromossomos das células epiteliais hospedeiras pode originar crescimento neoplásico. A infecção pelo HPV na mucosa cervical, através deste processo oncogênico, pode gerar o carcinoma cervical ou câncer do colo do útero. O potencial carcinogênico do HPV está relacionado às proteínas virais E6 e E7, que são capazes de interferir no ciclo celular ao interagir com proteínas celulares que atuam como supressoras de tumor como p53 e pRb. Este processo culmina na imortalização celular, e como consequências, a formação de neoplasias. Os tipos de HPV já identificados podem ser divididos em dois grupos principais: baixo risco (representado principalmente pelos tipos 6 e 11) e alto risco oncogênico (representado principalmente pelos tipos 16 e 18).

Através da observação da alta incidência e persistência prolongada de lesões escamosas intra-epiteliais em mulheres imunossuprimidas, concluiu-se que o sistema imune exerce um importante papel no controle das infecções por HPV. Existe ainda evidência de resposta humoral e celular contra antígenos do HPV durante o curso de regressão das lesões⁶.

A partir destas descobertas, o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) se tornou um importante fator de risco para infecções persistentes por HPV e suas lesões associadas. O HIV-1 pode, inclusive, aumentar a oncogenicidade dos HPV de alto risco, bem como ativar os tipos de baixo risco⁴. Múltiplos estudos relataram que a infecção por HPV de alto risco ou por múltiplos tipos possui uma frequência significativamente mais alta em mulheres infectadas pelo HIV^{2,3}.

Os primeiros estudos sobre a epidemia do HIV em mulheres já evidenciavam uma maior incidência de displasia cervical entre as pacientes infectadas pelo HIV. Por essa razão, já em 1993 o Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) incluiu a neoplasia cervical na lista de condições sintomáticas do HIV e o câncer cervical invasivo na definição para vigilância de casos de AIDS, destacando a associação de lesões cervicais malignas e imunodeficiência causada pelo HIV.

Como HIV e HPV compartilham uma mesma importante via de transmissão, através do contato sexual, não são raros os casos de mulheres infectadas pelos dois vírus concomitantemente.

Em mulheres saudáveis, a resposta imune local exerce papel crítico no controle da infecção pelo HPV, através de células apresentadoras de antígeno, citocinas e expressão de moléculas MHC. Condições normais de resposta imune celular podem levar a uma regressão espontânea das lesões cervicais, e mesmo que ocorra uma progressão, esta será lenta, já que há infiltrado celular constituído por linfócitos T CD_4^+ , CD_8^+ , macrófagos e granulócitos no local da lesão.

Os fragmentos antigênicos provenientes das proteínas virais (tais como E6, E7, L1) que são capturados pelas células apresentadoras de antígeno, estimulam os linfócitos T periféricos. Alguns autores observaram que uma resposta linfoproliferativa de células CD_4^+ está associada com uma alta probabilidade de eliminação da infecção pelo HPV. Infiltração celular composta essencialmente por células CD_4^+ e macrófagos é frequentemente encontrada nos condilomas em regressão espontânea¹.

Ao reduzir o número absoluto de células CD_4^+ no sangue periférico, o HIV compromete um importante mecanismo de combate ao HPV, aumentando a prevalência das lesões associadas e sua progressão para lesões pré-invasivas. Mulheres com o número absoluto de células CD_4^+ possuem índices de recorrência e progressão das lesões cervicais induzidas por HPV significativamente maiores⁵, portanto o uso de anti-retrovirais que restauram a imunocompetência da paciente podem ser considerados

aliados na prevenção do câncer do colo do útero em mulheres infectadas pelo HIV. Mulheres submetidas a terapia anti-retroviral, apresentaram uma redução significativa da prevalência das lesões cervicais, assim como uma regressão das lesões presentes, apesar da infecção persistente por HPV².

Alguns resultados, no entanto, sugerem que as lesões cervicais por HPV persistem em uma grande parcela das mulheres que fazem uso da terapia anti-retroviral no controle da infecção por HIV, já que esta terapia tem seu principal efeito no controle da replicação viral do HIV, não interferindo na história natural da infecção pelo HPV³.

Apesar dos resultados controversos em relação à terapia anti-retroviral, todos os estudos concordam que a contagem de linfócitos CD₄⁺ é um fator importante que deve ser considerado, e que todas as mulheres infectadas por HIV devem ser constantemente rastreadas, sob rigoroso controle, quanto ao desenvolvimento de lesões malignas induzidas por HPV.

Diante dos resultados apresentados por diversos autores ao longo dos anos, foi possível concluir que diversos fatores interferem no processo compreendido entre a infecção genital pelo HPV e o desenvolvimento da neoplasia, dentre eles a condição imunológica em que a mulher se encontra. Mulheres infectadas pelo HIV apresentam maiores níveis de replicação do HPV e, como consequência, uma chance em média cinco vezes maior de desenvolver neoplasias em relação às mulheres soronegativas para HIV.

REFERÊNCIAS

1. Gonçalves MAG, Donadi EA. Immune Cellular Response to HPV: Current Concepts. **Braz J Infect Dis** 2004; 8(1):1-9.
2. Heard I, Schmitz V, Costagliola O, Orth G, Kazatchkine MO. Early regression of cervical lesions in HIV-seropositive women receiving highly active antiretroviral therapy. **AIDS**. 1998;12(12):1459--64.
3. Lillo FB, Ferrari O, Veglia F, Origoni M, Grasso MA, Lodini S, Mastrorilli E, Taccagni G, Lazzarin A, Uberti Foppa C. Human papillomavirus infection and associated cervical disease in human immunodeficiency virus-infected women: effect of highly active antiretroviral therapy. **J Infect Dis**. 2001;184(5):547-51.
4. Nicol AF, Fernandes ATG, Almeida MGB. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection – Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2005; 100(1): 1-12.
5. Taylor G, Wolff T, Khanna N, Furth P, Langenberg P. Genital Dysplasia in Women Infected with Human Immunodeficiency Virus. **J Am Board Fam Pract**. 2004; 17(2):108-13.
6. zur Hausen H. Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application. **Nature**, 2002; 2: 342-350.

Venenos de Anfíbios como Ferramentas de Novos Fármacos para Leishmaniose

André Gustavo TEMPONE

Laboratório de Toxinologia Aplicada, Serviço de Parasitologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz

As doenças infecciosas parasitárias causam um grande sofrimento a milhões de pessoas em todo mundo, principalmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, incluindo um forte impacto na economia e problemas à Saúde Pública. Dentre as principais doenças tropicais, as causadas por protozoários apresentam alta morbidade e mortalidade, sendo representadas principalmente pelas Leishmanioses. Afetam grandes populações marginais ao processo econômico globalizado, e desta forma, não são vistas como mercados potenciais para indústrias farmacêuticas, sendo assim, denominadas Doenças Negligenciadas⁶. A Leishmaniose é uma doença parasitária que inclui variados graus de severidade, ocasionando desde uma lesão cutânea de cura espontânea à uma progressiva infecção visceral fatal. Afeta um grande contingente populacional e atualmente, cerca de 12 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, com relatos de 2 milhões de novos casos por ano. Apesar da elevada toxicidade dos antimoniais, descobertos em 1912 por Gaspar Vianna, os antimoniais têm sido os fármacos de escolha para o tratamento das Leishmanioses durante os últimos 60 anos. Fármacos como a anfotericina B e a pentamidina são considerados, na maioria das vezes, como escolha terapêutica de segunda linha, incluindo severos efeitos adversos¹.

Atualmente, um dos importantes métodos de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos, vem se baseando na busca de novos protótipos farmacêuticos encontrados principalmente em produtos de origem natural. Estudos recentes demonstram que 61% dos medicamentos desenvolvidos no período de 1981 a 2002, apresentavam substâncias naturais como protótipos. A pesquisa com venenos animais para obtenção de novos fármacos, é realizada através de estudos biomonitorados, realizando-se estudos celulares *in vitro* e fracionamentos cromatográficos para o isolamento do composto ativo. Venenos são substâncias comuns na natureza, encontrados em plantas e animais, representando uma extraordinária defesa química contra predadores. São importantes ferramentas de estudos para o desenvolvimento de protótipos farmacêuticos. Diversos peptídeos, entre outros metabólitos secundários extraídos de venenos animais,

vêm sendo utilizados como protótipos para inúmeras classes de medicamentos, como: antihipertensivos: captopril – Capoten® (inibidor da ACE); agentes antitrombóticos: eptifibatide - Integrilin®/Aggrastat® (antagonista competitivo de integrinas); antihemorrágicos em fase de estudos pré-clínicos: textilinin Q70033; diabetes: exendin-4 - Exenatide® em fase III de estudo clínico (para o controle da glicose)⁴.

A pele de anfíbios caracteriza-se pela presença de glândulas mucosas e granulosas, que secretam inúmeras substâncias utilizadas na defesa contra predadores e microorganismos. Venenos de anfíbios são considerados uma importante fonte de moléculas biologicamente ativas, onde na maioria delas, encontram-se alcalóides, peptídeos e proteínas, esteróides e aminas biogênicas. Dentre as muitas atividades farmacológicas descritas na literatura, verificamos principalmente as antimicrobianas e recentemente, antiparasitárias. Em Leishmaniose, estudos recentes destes venenos vêm demonstrando um grande potencial farmacológico. Como exemplos, verificamos o veneno do anfíbio *Rana temporaria*, do qual se isolou peptídeos denominados temporinas, com marcante atividade contra *Leishmania* sp. e baixa citotoxicidade⁵. Peptídeos hidrofóbicos com importante atividade contra *Leishmania* sp vêm sendo isolados de diferentes espécies, como as bombininas, provenientes do anfíbio *Bombina variegata* e as magaininas, de *Xenopus laevis*³. Do gênero *Phyllomedusa* sp., vários peptídeos catiônicos de 28-34 resíduos denominados dermaseptinas, vêm se mostrando ativos contra *Leishmania*². Esta nova classe de polipeptídeos, com grande potencial farmacológico, ainda apresenta atividade contra leveduras, bactérias e outros protozoários de interesse em Saúde Pública. Metabólitos secundários, como muitos alcalóides, encontrados nos venenos de anfíbios, vêm demonstrando também grande potencial farmacológico. Modificações químicas na estrutura do protótipo natural isolado podem servir como base para novos estudos experimentais e posteriormente clínicos, potencializando suas atividades farmacológicas ou mesmo, reduzindo seus efeitos tóxicos.

Com base na dificuldade terapêutica das Leishmanioses, devido aos longos períodos de medicações

injetáveis administradas, restrito arsenal terapêutico, toxicidade elevada, além de relatos de resistência, constatou-se que a pesquisa por novos medicamentos é imprescindível. Mesmo com as elevadas taxas de mortalidade da doença nos países endêmicos, a Leishmaniose continua a ser negligenciada pelos setores privados da economia, sendo delegada ao setor público a tarefa de pesquisa e desenvolvimento de novas terapias.

REFERÊNCIAS

1. Balaña-Fouce, R., Reguera, R.M., Cubría, C., Ordóñez, D. The pharmacology of Leishmaniasis. **Gen. Pharmac.**, 30: 435-43, 1998.
2. Brand, G.D., Leite, J.R., de Sa Mandel, S.M., Mesquita, D.A., Silva, L.P., Prates, M.V., Barbosa, E.A., Vinecky, F., Martins, G.R., Galasso, J.H., Kuckelhaus, S.A., Sampaio, R.N., Furtado, J.R., Jr Andrade, A.C., Bloch, C. Jr. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 347: 739-46, 2006.
3. Guerrero, E., Saugar, J.M., Matsuzaki, K., Rivas, L. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 2980-6, 2004.
4. Lewis, R.J., Garcia, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 2: 790-802, 2003.
5. Mangoni, M.L., Saugar, J.M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M., Rivas, L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **J. Biol. Chem.**, 280: 984-90, 2005.
6. Remme, J.H., De Raadt, P., Godal, T. The burden of tropical diseases. **Med. J. Aust.**, 5: 465-9, 1993.

Instrução para Publicação

- 1 - A matéria para publicação deverá apresentar a seguinte estrutura:
 - ✓ Título
 - ✓ Nome do(s) autor(es) completo por extenso, último sobrenome em caixa alta. Filiação científica completa. Texto: **deve** ser apresentado em um único texto, podendo conter introdução, métodos, dados experimentais e outros
 - ✓ Referências: quando necessária e no máximo 6
- 2 - O texto deverá ser digitado em fonte Times New Roman, tamanho 12 e com espaço duplo, ocupando no máximo 3 (três) laudas de tamanho A4;
- 3 - Deverá ser redigido em língua portuguesa;
- 4 - Uso de tabelas e figuras somente quando necessárias devendo ser auto explicativas e numeradas, tabela com o título acima e figura com o título abaixo;
- 5 - A referência bibliográfica, quando necessária, deverá ser citada no texto por meio de número índice, sobrescrito sem espaçamento, correspondente ao da lista de referência.
 - ✓ Para um autor: "Taunay³¹ verificou..."
 - ✓ Até dois autores deverá ser mencionado: "Pereira e Maia¹⁹, pesquisando..." Mais de dois autores usar a expressão et al: "Tsunoda et al.⁶ verificaram..."
- 6 - A relação da lista de referência deverá ser numerada e colocada em ordem alfabética dos sobrenomes dos autores.
 - ✓ Artigo: sobrenome do autor (ou dos autores) seguido das iniciais; Título do artigo; Título do periódico em negrito; Volume; N° do volume; N° página inicial; N° da página final; Ano da publicação. Ex.: Morley, A. et al. A primary stem-cell lesion in experimental chronic hypoplastic marrow failure. **Blood**, 45:681-8, 1975. Yamada, K. & Tsuji, M. Transport of vitamin B6 in human erythrocytes. **J.Vitam.**, 14:282-94, 1978.
 - ✓ Livro no todo: Sobrenome do autor (ou dos autores) seguido das iniciais; Título do livro(negrito); Edição; Local de publicação; Editora: Ano; N° de páginas ou volumes. Ex.: Naoum, P.C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. 1º Ed., São Paulo: Sarvier: 1997, 171p.
 - ✓ Capítulo de Livro: Sobrenome do autor (ou dos autores) do capítulo, seguido das iniciais; Título do capítulo; sobrenome do autor (ou autores) do Livro (precedido por In) seguido das iniciais; Título do livro (negrito); Edição; Local de publicação; Editora: Ano; Página inicial e final do capítulo e ou volume. Ex.: Mansfield, J.M. Non pathogenic trypanosomes of mammals.

- In: Kreir, J.P. **Parasitic protozoa taxonomy, kinetoplastids and flagellates of fish**. New York: Academic Press; 1977. p.297-327.
- ✓ Legislação: os elementos essenciais para referencial legislação são: jurisdição (ou cabeçalho da entidade no caso de se tratar de normas). título, numeração, data e demais dados da publicação. Ex: BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico da Atribuição de função de aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8. carne e produtos cárneos. **Diário Oficial**, Brasília, DF. n.239. 14 dez. 1998, Seção 1. p. 28-32.
 - ✓ Texto obtido ou consultado na Web: Sobrenome do autor (ou dos autores) do "site" seguido das iniciais: Título do artigo; Título do periódico (se for o caso), em negrito; nome do "site" entre colchetes. Data da consulta. Ex: Trucksess, M. W. et al. Determination and survey of ochratoxin A in barley, green coffee and roasted coffee. **FDA Science Fórum Póster Abstract**, [http://Vn.cfsan.fda.gov/~frf/forum97/97A30.html]. 5 de maio 1997.
- 7 - A matéria deverá ser enviada em uma cópia impressa e em disquete 3 1/2.
 - 8 - Toda informação contida na matéria é de total responsabilidade do(s) autor(es).
 - 9 - A publicação de qualquer matéria estará condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz.
 - 10 - Enviar o material ao Coordenadores das respectivas áreas:
 - ✓ Área de Vigilância Epidemiológica
Marilena Oshiro - maoshiro@ial.sp.gov.br - Ramal 2878
Therezinha Travassos C. de Almeida
travassos@ial.sp.gov.br - Ramal 2889
 - ✓ Área de Vigilância Sanitária
Márcia Regina P. do Amaral Mello - mrmello@ial.sp.gov.br
Ramal 2936
Márcia Bittar Atuí - marcatui@hotmail.com - Ramal 2934
 - ✓ Área de ações Básicas de Saúde
Divani Capuano - dcapuano@ial.sp.gov.br
Tel.(xx16) 3625-5046
Cecília Cristina M. dos Santos - ccmsantos@hotmail.com
Tel. (xx17)224-2602

Fica autorizada a reprodução das matérias publicadas neste Boletim, desde que citada a fonte.

Finalidade

Divulgação de informações técnicas e assuntos de interesse em Saúde Pública originária de atividades desenvolvidas pelo Instituto Adolfo Lutz.

Carta ao Editor

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - CEP 01246-902
E-mail: bial@ial.sp.gov.br
Caixa Postal 1783 - CEP 01059-970
São Paulo, SP- Brasil
Telefone: (0XX11) 3068-2800 - Telex 1136327
Fax: (11) 3082-9939 (Biblioteca)

Regulamento

O BIAL publica as **matérias de interesse em Saúde Pública** enquadradas num dos itens abaixo:

- 1 - Relatos sucintos de investigação com ênfase a aspectos relativos ao apoio laboratorial.
- 2 - Informações sobre dados levantados a partir de registros existentes nos laboratórios do Instituto.
- 3 - Notas e informações relativas a temas de atualidades.
- 4 - Nótulas de literatura: comentários críticos sobre livros e artigos científicos.