

RESENHA BIBLIOGRÁFICA

Rim e Drogas - Baseado em Princípios Farmacocinéticos. E. Barsanulfo Pereira, Editado pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, 1986.

Este manual aborda, baseando-se nos princípios farmacocinéticos, os principais tópicos da interação entre drogas e rim. Faz, inicialmente, considerações sobre a farmacocinética aplicada à clínica e discute seus princípios gerais, desde absorção, níveis plasmáticos, até mecanismos de excreção de drogas.

Em capítulos subsequentes fornece as principais regras do ajuste de drogas na insuficiência renal, dando ênfase à anestesia, uso de antidiabéticos e digitalização.

Aborda ainda aspectos de nefrotoxicidade e depuração de drogas e tóxicos apontando mecanismos extracorpóreos de remoção (diálise e hemoperfusão).

Utilizando-se de figuras e tabelas adequadamente construídas o autor fornece um guia prático para uso em "beira de leito", na adequação de doses de diferentes fármacos aos diferentes graus de função renal.

Este manual é recomendado para todos os que se interessam pela terapêutica clínica nas diferentes especialidades médicas, principalmente internistas e nefrologistas.

Joel Paulo R. Veiga

em face do alto custo e tempo de preparação de meios de cultura e, de necessidade de pessoal treinado no seu preparo e, muitas vezes, na manutenção de animais de laboratório infectados experimentalmente.

Se um antígeno utilizado é comprado ou preparado no próprio laboratório é importante assegurar-se a qualidade e reprodutibilidade do antígeno em pauta, antes de ser usado na rotina.

A qualidade do antígeno deve ser testada tanto por métodos químicos, p. ex.: - seu teor em constituintes químicos (proteínas, polissacarídeos, glicoproteínas, etc.), por métodos imunológicos (imunodifusão, imunoeletroforese) se aplicáveis e, por seu comportamento na reação sorológica em que é utilizado (titulação do antígeno para estabelecer sua reatividade ótima) frente a soro padrão positivo e descartar reações inespecíficas por reação com soros padrão negativos.

Neste caso, especialmente se tratando de reações de hemaglutinação passiva, é importante que os antígenos sejam testados por soros padrões negativos (como foi exposto anteriormente) e por padrões positivos de altos, médios e baixos títulos. Os soros padrões positivos de título médio e baixo são especialmente capazes de detectar diferenças na composição de um antígeno que ocorrem na preparação de partidas sucessivas.

F) TÉCNICAS

Além das recomendações relativas à pureza, concentração do pH dos sais referidos na seção C, todos os reagentes biológicos empregados em reações sorológicas devem ser avaliados quanto à sua atividade para serem usados em proporções ótimas.

a) - técnica de anticorpos marcados

1. *antígenos* em reações de imunofluorescência usa-se como convenção 20 a 25 parasitas por campo de 400 x. Nas reações que empregam cortes de vermes eles devem ter 4 micrômetros de espessura;

- em enzima - imunoenensaio a quantidade ótima de antígeno para sensibilizar os orifícios de placa deve ser determinada por meio de titulações que empreguem concentrações decrescentes de antígeno, diluições crescentes de soros padrões positivos e negativos, e diluição ótima de conjugado (diluição de uso);

2. *conjugado* - em reações de imunofluorescência o conjugado deve ser usado em diluições que assegurem estar-se trabalhando em zona de reatividade máxima e com relações fluoresceína-proteína (relação F/P) compatível com o sistema antígeno-anticorpo usado. A determinação de zona de reatividade máxima, que determinará a diluição de uso do conjugado, é feita utilizando-se quantidade fixa de antígeno, diluições crescentes de soros padrões positivos e negativos e diluições crescentes de conjugado;

em reações de enzima - imunoenensaio devem ser determinadas a concentração proteína do conjugado, a concentração em enzima do conjugado e a reatividade máxima do conjugado imunoenzimático que definirá a diluição de uso do conjugado, nos moldes citados acima para o conjugado fluorescente;

3. *controles* - em todas as reações de imunofluorescência devem ser incluídos controles positivos e negativos (como foi referido);

- em enzima - imunoenensaio, além dos controles de soros padrão positivos devem ser incluídos controles do antígeno e do conjugado. Os controles do soro padrão negativo podem ser utilizados de duas maneiras:

a) incluem-se na placa dez soros sabidamente negativos, em diluições crescentes. Após a reação, de cada diluição determina-se a média e 2 desvios padrões de cada diluição. Os valores a serem tomados como significantes serão aqueles maiores que o obtido da soma de média e dos 2 DP, para cada diluição ($\bar{X} + 2 DP$);

b) constituem-se 3 pools de soros contendo cada um dez soros negativos;

- cada pool de soro é diluído seqüencialmente. Após a reação, extrai-se a média e 2 desvios padrões. Os valores significantes serão aqueles que excederem os obtidos para os pools de soro. ($\bar{X} + 2 DP$);

b) - reações de hemaglutinação

1. *antígeno* - a quantidade ótima de antígeno para sensibilizar as hemácias deve ser aferida por reação entre hemácias sensibilizadas e quantidades decrescentes de antígeno e soros padrões positivos e negativos;

2. *controles* - devem ser incluídos controles de hemácias, de hemácias sensibilizadas, de soro padrão positivo e soro padrão negativo em contato com hemácias não sensibilizadas;

c) - reações de fixação do complemento

Todos os reagentes biológicos empregados em reações de fixação de complemento devem ser avaliados quanto à sua atividade biológica e usados em concentrações ótimas ou em níveis de reatividade máxima: hemácias de carneiro, hemolisina, antígeno, complemento de cobaia de acordo com as direções constantes dos livros de texto.

Os controles a serem incluídos em cada teste são: controle de hemácias, controle de hemácias e complemento, controle de hemácias, soro e complemento, controle de hemácias, antígeno e complemento, controle do sistema hemolítico (hemácias, hemolisina e complemento) em doses crescentes de complemento que assegurem o grau de hemólise em que está trabalhando (CH_{50} , CH_{100}).

G) CONTROLE DE QUALIDADE

Todas as etapas que envolvem a realização de uma reação sorológica devem ser testadas para se assegurar a qualidade ótima do produto.

Assim, todos os reagentes químicos devem ser p.a. (como já referido) e pesados com a necessária precisão, e as soluções preparadas com eles devem ter o pH aferido em potenciômetro. Os reagentes biológicos (para o preparo de meio de cultura, p. ex.) devem ser manipulados e diluídos com o devido cuidado e se necessário testados posteriormente para assegurar-se a devida esterilidade. As soluções, as misturas e os produtos finais devem ser colocados em frascos de preferência de vidro, com rótulos onde constem o nome do produto, a concentração, o pH (se aplicável), a data do preparo, o lote do sal. Devem constar também as indicações quanto à temperatura necessária para o armazenamento, diferente daquele ambiente.

Os equipamentos de laboratório devem sofrer revisões periódicas para assegurar seu perfeito funcionamento e serem usados em conformidade com as indicações do fabricante.

Todos estes cuidados prévios, ao lado dos cuidados anteriormente mencionados para as reações sorológicas "sensu strictu", assegurarão a qualidade do produto final e acima de tudo a exatidão do diagnóstico sorológico, subsídio ao bem-estar do indivíduo ou da população.

H) AVALIAÇÃO

Após a realização da sorologia é necessário calcular-se índices que atestem da validade dos resultados obtidos.

A inclusão destas categorias permite a avaliação independente "cega" dos resultados e o cálculo dos parâmetros.

A inclusão de soros de pessoas sabidamente portadoras dos anticorpos que se quer demonstrar pressupõe a evidencição de diagnóstico conclusivo, como sejam a demonstração do parasita ou a realização de provas que dêem tais indicações, antes mesmo da constituição da série de soros. Como em algumas doenças parasitárias pode ser difícil encontrar-se o parasita em algumas das suas fases (ex: na toxoplasmose ou na leishmaniose mucocutânea) aceita-se também como diagnóstico de certeza a positividade em reações de hipersensibilidade retardada que sejam diagnósticas da infecção (ex: a reação de Montenegro).

Para a adequada constituição da série é necessário que haja soros de indivíduos chamados "controles normais", ou seja, indivíduos nos quais o diagnóstico de certeza foi excluído mediante a realização das mesmas provas diagnósticas mencionadas acima e cujo resultado mostrou-se negativo. Se houver a inclusão de soros provenientes de patologias outras é necessário que as mesmas provas diagnósticas de certeza sejam realizadas nos pacientes.

Realizados os testes, os resultados irão se agrupar em 4 categorias de acordo com a existência ou não da doença e a positividade ou não do teste a saber: 1 - soros com resultado positivo ao teste e que provinham de pacientes nos quais o diagnóstico de certeza era positivo, aos quais chamamos VERDADEIROS POSITIVOS (VP); 2 - soros com resultado negativo ao teste e que provinham de controles normais aos quais chamamos VERDADEIROS NEGATIVOS (VN); 3 - soros com resultado negativo ao teste mas que provinham de pacientes com diagnóstico de certeza positivo e que são denominados de FALSOS NEGATIVOS (FN); 4 - soros com resultado positivo ao teste e que provinham de controles normais que são denominados de FALSOS POSITIVOS (FP).

Determinadas estas 4 categorias pode-se calcular o ÍNDICE de SENSIBILIDADE do teste que significa a capacidade do teste em detectar a doença quando presente e que corresponde ao quociente: $S = VP/VP + FN$. O ÍNDICE de ESPECIFICIDADE do teste ou seja a capacidade do teste em detectar a ausência da doença corresponde ao quociente: $E = VN/VN + FP$.

Os ÍNDICES de SENSIBILIDADE e ESPECIFICIDADE são propriedades estáveis do teste pois não mudam quando proporções diferentes de sadios e doentes são testado, ou seja, não mudam com a alteração da PREVALÊNCIA da doença. Em relação à prevalência de uma doença é necessário ter-se em mente que ela varia amplamente entre diferentes regiões de um mesmo país e que os valores obtidos para um teste durante a sua padronização podem apresentar

índices de sensibilidade e especificidade diferentes dos obtidos durante a sua aplicação posterior pois durante a padronização a maioria dos testes é avaliada entre o número igual de participantes com e sem a doença ou seja com prevalência igual a 50%.

Como não existe o teste ideal, ou seja, aquele que ao ser empregado só revele resultados verdadeiros positivos ou negativos (VP e VN), é necessário que se calculem índices para a aferição dos resultados falso positivo e falso negativo. Tais índices denominam-se VALOR de PREDIÇÃO POSITIVO (VP+) e VALOR de PREDIÇÃO NEGATIVO (VP-). O primeiro indica quantos dentre os positivos ao teste são verdadeiramente doentes e se expressa pelo quociente: $VP+ = VP/VP + FP$ e o segundo indica quantos dentre os negativos ao teste são verdadeiramente negativos e se expressa pelo quociente $VP- = VN/VN + FN$.

Finalmente, pode-se ainda calcular o índice de CONCORDÂNCIA de um teste sorológico que se expressa pelo quociente: $concordância = VP + VN/VP + FN + VN + FP$, ou seja, o denominador contém o total de soros testados.

Os índices de valor de predição positivo, do valor de predição negativo e de concordância são propriedades ditas instáveis do teste pois variam com a proporção de sadios e doentes testados, ou seja, da prevalência da doença.

No quadro abaixo estão indicados os índices apontados anteriormente segundo os atributos de presença ou ausência de doença e positividade ou negatividade ao teste:

	Teste positivo	Teste negativo	Total
Doente	a	b	a+b
Sadio	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

a = Verdadeiros positivos

b = Falsos negativos

c = Falsos positivos

d = Verdadeiros negativos

SENSIBILIDADE = $a/(a+b)$

ESPECIFICIDADE = $d/(c+d)$

VALOR de PREDIÇÃO POSITIVO = $a/(a+c)$

VALOR de PREDIÇÃO NEGATIVO = $d/(b+d)$

CONCORDÂNCIA = $a+d/(a+b+c+d)$

PREVALÊNCIA = $a+b/(a+b+c+d)$

Freqüentemente em sorologia trabalha-se com séries de soros nos quais o diagnóstico de positividade ou negatividade foi estabelecido por comparação do seu comportamento face a um teste considerado como de referência para a doença em questão e não com diagnósticos de certeza da presença ou ausência da doença ou infecção. Assim, ao índice resultante do quociente entre positivos a ambos os testes/soma dos positivos a ambos os testes e negativos ao teste que se quer aferir porém positivos ao teste de referência, chamamos CO-POSITIVIDADE e não sensibilidade. Da mesma maneira, ao índice obtido do quociente entre soros negativos para ambos os testes/a soma dos negativos para ambos os testes mais os soros positivos para o novo teste porém negativos para o teste de referência chamamos CO-NEGATIVIDADE e não especificidade.

Há uma precaução que se deve ter na realização e interpretação dos resultados dos testes, qual seja, que sejam efetuados às "cegas" sem que se saiba se o soro que está sendo avaliado provém de um doente ou sadio; de maneira semelhante, o diagnóstico de certeza deve ser aplicado ignorando-se o resultado dos testes.

Na padronização de testes é de muita importância a inclusão de soros com o mais amplo espectro da doença, desde os mais leves ou iniciais até os mais avançados para se poder avaliar com precisão a capacidade discriminatória do teste na evidência dos anticorpos sintetizados contra epítomos do parasita.

Durante a fase de padronização de um teste assim como durante o seu emprego rotineiro deve-se tomar todos os cuidados para assegurar que os resultados obtidos sejam reprodutíveis. Além dos cuidados com a adequada titulação dos reagentes imunológicos usados no início da padronização devem eles ser novamente analisados quanto ao seu título sempre que forem substituídos por outros. Assim, cada vez que se preparar nova partida de antígeno este deve ser titulado, o mesmo acontecendo com conjugados ou quaisquer outros imunobiológicos. Outros possíveis fatores de variação dos resultados obtidos, como sejam a variação "intra-dia" e "inter-dia" são eliminados, ou pelo menos minimizados, pela inclusão de soros-controle positivos em cada teste realizado. Além destes cuidados que pertencem ao campo estrito do trabalho sorológico, os resultados obtidos devem ser analisados por métodos estatísticos que atestem da veracidade ou da confiabilidade dos resultados obtidos.

Como referido anteriormente, não existe o teste ideal e em consequência uma parte dos soros pertencentes a pessoas sabidamente doentes dará resultados negativos ao teste. Esta falsa negatividade constitui um dos tipos de erro inerentes ao

trabalho em sorologia e se denomina ALFA. Outra parcela dos soros que pertencem a pessoas sabidamente sadias dará resultados positivos ao teste. Esta falsa positividade constitui um outro dos erros inerentes ao trabalho em sorologia e se denomina BETA. Com a melhoria do trabalho sorológico, representado por purificações de antígenos, especificidade de conjugados, etc., se pode diminuir porém, não anular os tipos de erros referidos.

Ao se padronizar um teste sorológico, se estabelece um limiar de reatividade dos soros ao qual se denomina DILUIÇÃO LIMITE ou "CUT-OFF". Abaixo deste limite estão os valores que se consideram negativos e acima dele os valores tomados como positivos. No estabelecimento do limite deve ser levado em consideração a finalidade para a qual o teste foi padronizado: para fins de triagem, de identificação de casos, de diagnóstico, de cura, etc. É bastante fácil de entender que para cada um dos casos mencionados talvez seja interessante variar-se o "cut-off" estipulado. Por exemplo, para fins de triagem em bancos de sangue um reagente deve discriminar os verdadeiros positivos assim como os falsos negativos, portanto se deverá trabalhar com teste de sensibilidade máxima. Isto se faz baixando o limite do "cut-off"; inversamente, se o problema necessitar de teste com especificidade máxima, será necessário elevar o limite do "cut-off" para valores além dos encontrados durante a fase de padronização.

Em trabalhos de padronização de testes sorológicos é necessário calcular-se o tamanho da amostra mínima a ser testada. Este cálculo deverá ser feito idealmente em colaboração com um estatístico e dependerá de fatores como o erro alfa a ser aceito (95%?, 99%?, patamar?), do "poder" do teste estatístico (1-beta) e, finalmente, da prevalência da doença que é objeto da investigação.