

LUÍS CARLOS FERREIRA

**DETERMINAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA DURANTE
COLONOSCOPIA MEDIANTE HEMOCULTURA E PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau acadêmico de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA

2007

Ferreira, Luís Carlos

DETERMINAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA DURANTE
COLONOSCOPIA MEDIANTE HEMOCULTURA E PCR – Curitiba, 2007.
f. 63.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos
Dissertação (Mestrado)/Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.

1. Colonoscopia. 2. Translocação bacteriana. 3. Bacteremia. 4. PCR.
5. Hemocultura

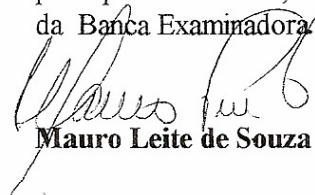
I. Título.



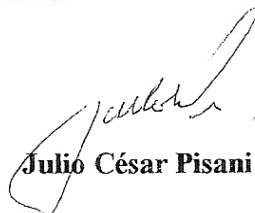
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 311ª Dissertação de Mestrado do 430º do Programa para conclusão da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, nível Mestrado da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **LUIS CARLOS FERREIRA**, com o título: **DETERMINAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA DURANTE COLONOSCOPIA MEDIANTE HEMOCULTURA E PCR na LINHA DE PESQUISA: Diagnóstico e Avaliação das Repercussões da Resposta Inflamatória Clínica e Experimental em Cirurgia, na ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Clínica Cirúrgica** como orientador Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Às sete horas e trinta minutos do dia treze de dezembro de dois mil e sete, no Auditório da CAD no 7º andar central sala 701 do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída pela Banca Examinadora pelos Professores Doutores: **Mauro Leite de Souza Pinho**, **Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas** e **Julio César Pisani** sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão foi apresentada pelo **Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias**, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O Candidato foi considerado **aprovado** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora


Mauro Leite de Souza Pinho


Alexandre C. Teixeira de Freitas


Julio César Pisani

Aos meus filhos João e Eduardo, por me ensinarem o maior amor do mundo.

À minha esposa Sandra, pela compreensão, amizade e amor.

Aos meus pais Elizeu e Avelina, pelo afeto incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Doutor Antônio Carlos Ligocki Campos, Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná e Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio constante e pelos valiosos conselhos, bem como pela orientação sábia e criteriosa para este estudo, meu eterno agradecimento.

Ao Professor e Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná pela coordenação exemplar deste Programa.

Ao Professor e Doutor Mauro de Souza Leite Pinho, Professor da Disciplina de Anatomia e da Disciplina de Clínica Cirúrgica da Universidade da Região de Joinville – Univille, preceptor da residência médica em coloproctologia do Hospital Municipal São José, Joinville/SC. Brilhante coloproctologista e grande amigo cujo constante apoio e incentivo tem sido de grande valia nos meus primeiros passos no estudo da biologia molecular e carreira acadêmica, além da amizade, carinho, ensinamentos e orientações na minha formação cirúrgica e coloproctológica.

Ao Professor e Doutor Harry Kleinübing Júnior, Professor Coordenador da Disciplina de Técnica Operatória e Anestesiologia da Universidade da Região de Joinville – Univille, preceptor da residência médica em coloproctologia do Hospital Municipal São José, Joinville/SC, pela amizade, incentivo e orientação na minha formação cirúrgica e coloproctológica e pelo inestimável auxílio na coleta do material deste estudo.

Ao Doutor Francisco Luiz Altenburg, médico coloproctologista, preceptor da residência médica em coloproctologia do Hospital Municipal São José, Joinville/SC,

pela amizade, incentivo e orientação na minha formação cirúrgica e coloproctológica.

Ao Professor e Doutor Ricardo Lemos, médico, cirurgião geral, preceptor da residência médica em Cirurgia Geral do Hospital Municipal São José, Joinville/SC e Professor Coordenador da Disciplina de Clínica Cirúrgica da Universidade da Região de Joinville – Univille, pela amizade e participação na elaboração desta tese.

Ao Doutor Milton Correia, médico, cirurgião geral, preceptor da residência médica em Cirurgia Geral do Hospital Municipal São José, Joinville/SC pela amizade e coleguismo.

Ao Professor e Doutor Paulo Henrique Condeixa de França, Professor da Universidade da Região de Joinville – Univille, pela amizade e participação ativa na pesquisa da biologia molecular.

À bióloga Leslie Ecker Ferreira, pesquisadora da Universidade da Região de Joinville – Univille, pela amizade e participação ativa na pesquisa da biologia molecular.

À Direção do Centro Hospitalar Unimed de Joinville/SC, pela permissão em realizar os exames de colonoscopia e hemocultura nas suas dependências.

À Universidade Federal do Paraná, pela receptividade e oportunidade de freqüentar o Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde.

A Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, pela oportunidade de permitir meu ingresso na docência e utilizar seus laboratórios no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Ary Elias Sabbag Júnior pelo trabalho estatístico realizado e pelas sugestões na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Endoscopia Digestiva e Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar Unimed – Joinville/SC, pelo incansável apoio durante a coleta de material, realização das colonoscopias e hemoculturas.

A CAPES, pelo incentivo à pesquisa e desenvolvimento científico, além da bolsa de estudo.

“A vida é uma oportunidade, aproveite-a....
A vida é beleza, admire-a...
A vida é felicidade, deguste-a...
A vida é um sonho, torne-o realidade...
A vida é um desafio, enfrente-o...
A vida é uma riqueza, conserve-a...
A vida é amor, goze-o...
A vida é aventura, arrisque-a...
A vida é alegria, mereça-a...
A vida é vida, defenda-a...”

Agnes Gonxha Bojaxhiu (Madre Tereza de Calcutá, 1910-1997)

SUMÁRIO

LISTA DE ANEXOS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 OBJETIVOS.....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 COLONOSCOPIA.....	04
2.2 BACTEREMIA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	05
2.3 DETERMINAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	07
2.3.1 Hemocultura.....	07
2.3.2 Detecção do DNA Bacteriano Pela PCR.....	09
2.3.2.1 DNA	09
2.3.2.2 Gene.....	10
2.3.2.3 PCR	11
2.3.2.4 Eletroforese.....	12
3. PACIENTES E MÉTODO	14
3.1 PACIENTES.....	14
3.2 COLONOSCOPIA.....	15
3.2.1 Preparo do Cólon.....	15
3.2.2 Instrumental.....	16
3.2.3 Técnica de Realização da Colonoscopia.....	16
3.3 REGISTRO EM PROTOCOLO.....	18
3.4 COLETA DE SANGUE.....	18
3.5 HEMOCULTURAS.....	20
3.5.1 Bacterioscopia.....	21
3.6 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO.....	22
3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR.....	25

3.8 ELETROFORESE.....	27
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1 TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS.....	31
4.2 RESULTADOS DOS EXAMES DE COLONOSCOPIA.....	31
4.3 HEMOCULTURAS.....	32
4.4 DNA BACTERIANO POR PCR.....	33
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE HEMOCULTURA E PCR.....	33
4.6 TB E TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS.....	34
4.7 PCR E PROCEDIMENTOS ENDOSCÓPICOS INVASIVOS.....	35
5. DISCUSSÃO.....	37
5.1 TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS.....	37
5.2 RESULTADOS DOS EXAMES DE COLONOSCOPIA.....	37
5.3 HEMOCULTURAS.....	38
5.4 DNA BACTERIANO POR PCR.....	39
5.5 COMPARAÇÃO ENTRE HEMOCULTURA E PCR.....	42
5.6 TB E TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS.....	42
5.7 PCR E PROCEDIMENTOS ENDOSCÓPICOS INVASIVOS.....	43
5.8 APLICABILIDADE CLÍNICA DO ESTUDO.....	43
5.9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	44
6. CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	52

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA	53
ANEXO 2	PROTOCOLO PARA COLETA DO MATERIAL DA PESQUISA: TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM COLONOSCOPIA.....	54
ANEXO 3	CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO PESQUISA.....	55
ANEXO 4	PROTOCOLO DO PREPARO DE COLON PARA A REALIZAÇÃO DE EXAMES DE COLONOSCOPIA NO TURNO DA TARDE – SERVIÇO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA CENTRO HOSPITALAR UNIMED – JOINVILLE / SC.....	56
ANEXO 5	PROTOCOLO DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO DO COLONOSCÓPIO - SERVIÇO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA CENTRO HOSPITALAR UNIMED – JOINVILLE / SC.....	57
ANEXO 6	TÉCNICA UTILIZADA PARA COLETA DE SANGUE.....	60
ANEXO 7	TÉCNICA DO PROCESSO ELETROFORESE - LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE / SC.	62
ANEXO 8	PLANILHA - TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM COLONOSCOPIA.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	BACTEREMIA EM COLONOSCOPIA.....	06
TABELA 02	SEXO E FREQUÊNCIA.....	14
TABELA 03	TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS.....	31
TABELA 04	RESULTADOS DOS EXAMES DE COLONOSCOPIA.....	32
TABELA 05	RESULTADOS DAS HEMOCULTURAS.....	32
TABELA 06	DNA BACTERIANO POR PCR.....	33
TABELA 07	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA HEMOCULTURA E PCR.....	33
TABELA 08	PCR E TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS.....	35
TABELA 09	PCR E PROCEDIMENTOS ENDOSCÓPICOS INVASIVOS.....	36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM SEGMENTO DA MOLÉCULA DE DNA.....	10
FIGURA 02	SISTEMA DE ELETROFORESE.....	13
FIGURA 03	FOTOGRAFIA DO GEL DE AGAROSE COM BANDAS DE DNA.....	13
FIGURA 04	SALA DE ENDOSCOPIA DO CENTRO HOSPITALAR UNIMED – JOINVILLE SC.....	17
FIGURA 05	FRASCO DO SISTEMA DE DETECÇÃO MICROBIANA BACT/ALERT®	18
FIGURA 06	FRASCO COM FECHAMENTO HERMÉTICO.....	19
FIGURA 07	INCUBADORA AUTOMÁTICA BACT/ALERT® 120.....	20
FIGURA 08	PLACAS DE CULTIVO.....	21
FIGURA 09	MICROPIPETA ADICIONANDO MATERIAL COM DNA NO TUBO.....	24
FIGURA 10	AGITADOR VORTEX GENIE 2.....	24
FIGURA 11	MICROCENTRIFUGA EPPENDORF.....	25
FIGURA 12	ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>A</i> lu I.....	26
FIGURA 13	TERMOCICLADOR.....	27
FIGURA 14	EQUIPAMENTO PARA ELETROFORESE.....	28
FIGURA 15	FOTOGRAFIA DO GEL DE AGAROSE.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HCl	Ácido Clorídrico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
A	Adenina
C	Citosina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
PO ₄	Fosfato
° C	Grau Celcius
h	Hora
kg	Kilograma
™	Marca Comercial
®	Marca Registrada
<	Menor que
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
p	Nível de Significância
bp	Par de Base
%	Por Cento
p/v	Por Volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Rpm	Rotação por Minuto
T	Timina
TB	Translocação Bacteriana
Tris	<i>Triethylammonium</i>
TE	Tris EDTA
U	Unidade
Univille	Universidade da Região de Joinville
U	Uracila

RESUMO

INTRODUÇÃO: O exame de colonoscopia tem sido amplamente utilizado na investigação das doenças colorretais, tendo grande importância diagnóstica e terapêutica. Com o aumento da frequência e complexidade nas intervenções invasivas, surgiram complicações relacionadas à translocação bacteriana durante o procedimento, sem consenso na literatura quanto à sua ocorrência. A hemocultura é a técnica rotineiramente empregada no diagnóstico da translocação bacteriana. Com o advento das técnicas de biologia molecular, como a PCR, passou a ser possível identificar DNA bacteriano mesmo em hemoculturas negativas.

OBJETIVOS: Determinar e comparar a ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia mediante sistema automatizado de hemocultura e PCR, determinar a ocorrência da TB mediante sistema automatizado de hemocultura e PCR nos pacientes com tempo de execução da colonoscopia inferior e superior a 30 minutos e nos pacientes submetidos a procedimento endoscópico invasivo.

PACIENTES E MÉTODO: Foram coletadas duas amostras de sangue de 50 pacientes consecutivos, sendo vinte e sete (54%) do sexo feminino e 23 (46%) do sexo masculino e com idade média de 53,9 anos (25 -76 anos). A primeira coleta de sangue foi antes da introdução do endoscópio no canal anal, e a segunda cinco minutos após sua retirada. As hemoculturas foram processadas automaticamente no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® SA. A detecção por PCR de bactérias nas amostras de sangue foi realizada mediante a identificação da seqüência de RNA ribossomal da subunidade 16s do gene.

RESULTADOS: Foram realizadas 50 colonoscopias. O tempo de duração do exame foi inferior a 30 minutos em 39 pacientes (78%). As hemoculturas coletadas pré-exame foram positivas para o crescimento bacteriano em 02 (4%). As coletadas após o exame, todas foram negativas para crescimento bacteriano. A pesquisa de DNA bacteriano por PCR, na coleta pré-exame foi positiva em 23 (46%) das, enquanto nas coletas pós-exame, foram positivas em 33 (66%). A identificação da TB é maior com a PCR quando comparada com a hemocultura ($p=0,002$).

CONCLUSÃO: 1) No presente estudo não foi possível comprovar a ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia mediante sistema automatizado de hemocultura. 2) A colonoscopia aumenta a ocorrência da translocação bacteriana quando efetuada a avaliação pela PCR. 3) A identificação da ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia é maior na PCR quando comparada ao sistema automatizado de hemocultura. 4) A ocorrência da TB detectada pela PCR nos pacientes com tempo de execução da colonoscopia inferior a 30 minutos é similar àqueles com tempo superior a 30 minutos. 5) A realização de procedimentos endoscópicos invasivo não determina TB em colonoscopia mediante investigação pela PCR.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Colonoscopy has been widely used as a safe and essential procedure in diagnosis and treatment of colorectal diseases. The increasing complexity of invasive techniques has contributed to the occurrence of complications attributed to bacterial translocation, despite no clear evidence from literature. Hemoculture has been the usual method of assessment of bacterial translocation in colonoscopy. Recent development of biomolecular techniques has contributed to detection of bacterial DNA by PCR even in negative hemoculture.

OBJECTIVES: To assess the incidence of bacterial translocation in colonoscopy by PCR technique compared to conventional hemoculture. To assess the influence of the length of duration of colonoscopy and invasive endoscopic procedures in bacterial translocation by both hemoculture and PCR methods.

METHODS: Two blood samples were collected from 50 consecutive patients (27 F : 23 M), mean age 53,9 year old, before and after a colonoscopy, respectively. Each sample was examined by both PCR method to detect bacterial DNA and to conventional BacT/ALERT[®] SA automatic system of microbial detection. PCR technique was performed by amplification of DNA sequence of 16s ribosomal RNA.

RESULTS: Total colonoscopy time was less than 30 minutes in 39 cases. Pre-colonoscopy hemocultures were positive for bacterial growth in two (4%). All post-colonoscopy hemocultures were negative. Bacterial DNA detection by PCR in pre-colonoscopy samples was positive in 23 (46%), whilst post-colonoscopy samples were positives in 33 (66%).

CONCLUSIONS: 1) It was not possible in the present study to demonstrate the occurrence of bacterial translocation in colonoscopy by hemoculture. 2) Colonoscopy increases the possibility of bacterial translocation when assessed by PCR method. 3) Identification of bacterial translocation after colonoscopy is greater by PCR technique when compared to hemoculture. 4) The incidence of bacterial translocation detected by PCR was not affected by the length of duration of colonoscopy; 5) Endoscopic invasive procedures did not influence the occurrence of bacterial translocation by PCR.

1. INTRODUÇÃO

A colonoscopia tem sido amplamente utilizada na prática médica diária, sendo fundamental para a avaliação adequada do cólon, reto e, conforme a necessidade, também do íleo terminal. Por tudo isso, a colonoscopia revolucionou a propedêutica coloproctológica, permitindo o diagnóstico precoce dos tumores, a diferenciação e o acompanhamento evolutivo das doenças inflamatórias intestinais, a elucidação de casos duvidosos à radiografia contrastada do cólon e o seguimento pós-operatório das neoplasias. Possibilita também a retirada de pólipos, realização de biópsia, dilatação de estenose e tratamento de lesão vascular. Diante destes aspectos, com a manipulação do cólon, que é um meio altamente contaminado, e o aumento da frequência e complexidade nas intervenções durante a colonoscopia, foram descritas complicações como sangramento, perfuração e dor abdominal (COUGHLIN, BUTLER, ALP e GRANT, 1977). Outra complicação, ocasionalmente descrita, é a translocação bacteriana (TB) (HABR-GAMA e WAYE, 1989).

Acredita-se que durante a colonoscopia, a pressão gerada pelo ar injetado na luz intestinal, associada a micro-traumas causados pelo aparelho de colonoscopia, possa facilitar a ocorrência da translocação bacteriana. Segundo Botoman e Surawicz em 1986, esse achado já pode ser identificado cinco minutos após o início do procedimento (BOTOMAN, SURAWICZ, 1986). A técnica empregada rotineiramente para investigação da TB em colonoscopia é a hemocultura. Esta técnica apresenta ampla variabilidade na incidência, estando relacionada à heterogeneidade dos pacientes estudados, número de coletas realizadas, momento das coletas, técnicas diferentes para hemocultura, tempo de duração do exame e realização concomitante de procedimento endoscópico invasivo diagnóstico ou terapêutico, como biópsias e polipectomias.

Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, notadamente com a reação em cadeia da polimerase (PCR), passou a ser possível identificar a presença de DNA bacteriano mesmo em culturas negativas. A PCR permite amplificar *in vitro* uma seqüência específica de ácidos nucleicos empregando a técnica que utiliza a enzima polimerase termorresistente (EÇA, 2004). As bactérias possuem em comum fragmento 16s do DNA. Os iniciadores bacterianos universais

são utilizados para amplificar o segmento 16s nos mais variados experimentos científicos, com intenção de identificar a presença ou ausência, de determinado fragmento de DNA bacteriano. A PCR e o 16s têm sido largamente empregados em diversas linhas de pesquisa para identificação do DNA bacteriano. Chiquet e colaboradores, em 2007, utilizaram PCR para determinar a presença de bactérias no humor aquoso em endofitalmite pós-operatórias, o que aumentou a identificação bacteriana de 18 para 62% quando comparou com os métodos de culturas comuns (CHIQUET et al., 2007). Bosshard et al. em 2003, observaram casos de bacteremia e endocardite com hemocultura negativa, nos quais foi identificada a presença de DNA bacteriano pela pesquisa do segmento 16s do gene (BOSSHARD et al., 2003). À luz desta técnica não foram identificados, em extensa revisão bibliográfica, artigos que tenham empregado a pesquisa do segmento 16s do gene por PCR para a determinação de ocorrência da TB durante a colonoscopia.

Considerando que este método moderno possibilite maior acurácia para a determinação da TB quando comparado à hemocultura, pode-se antever maior precisão diagnóstica na determinação da ocorrência da TB em a colonoscopia.

1.1 OBJETIVOS

- A) Determinar ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia mediante sistema automatizado de hemocultura.
- B) Determinar ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia mediante a reação em cadeia da polimerase.
- C) Comparar os resultados da ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia mediante sistema automatizado de hemocultura e reação em cadeia da polimerase.
- D) Determinar a ocorrência da translocação bacteriana mediante sistema automatizado de hemocultura e reação em cadeia da polimerase nos pacientes com tempo de execução da colonoscopia inferior e superior a 30 minutos.
- E) Determinar a ocorrência da translocação bacteriana mediante sistema automatizado de hemocultura e reação em cadeia da polimerase nos pacientes submetidos a procedimento endoscópico invasivo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COLONOSCOPIA

A partir do esofagogastroduodenoscópio com fibras óticas flexíveis, com ponta móvel e controlável pelo examinador, foi desenvolvido, nos Estados Unidos da América em 1963, e no Japão em 1966, um aparelho para a observação de todo o cólon e o íleo terminal, denominado de colonoscópio, que revolucionou o diagnóstico e tratamento das enfermidades coloproctológicas (QUILICI e GRECCO, 2000).

O exame de colonoscopia tem sido largamente empregado na prática médica diária no processo de investigação das doenças colorretais, tendo grande importância diagnóstica e terapêutica. Utiliza insuflação de ar para causar distensão e facilitar a visualização da mucosa intestinal. Durante a progressão do aparelho em direção ao ceco são feitas manobras de rotação e tração que podem produzir pequenos traumas na mucosa (QUILICI e GRECCO, 2000).

Embora seja considerado método eficaz, seguro e com poucos riscos, a colonoscopia não é isenta de complicações, mesmo em mãos experientes. Elas têm pequena incidência e são mais comuns nos exames com intervenções terapêuticas do que aqueles puramente diagnósticos. Wolff e Shinya, em 1973, demonstraram que, utilizando alça de aço e eletrocautério, foi possível remover pólipos colônicos e fazer mucosectomias (WOLFF e SHINYA, 1973). Com o aumento da frequência e complexidade nas intervenções durante a colonoscopia surgiram algumas complicações como sangramento, perfuração, lesões de continuidade na mucosa, problemas relacionados à insuflação de ar, distensão do cólon e infiltração de soluções na submucosa. O sangramento é a complicação mais freqüente, ocorre geralmente após biópsias e polipectomias (CAPPELL e FRIEDEL, 2002).

2.2 BACTEREMIA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Em decorrência da quebra na barreira mucosa do cólon, secundária ao trauma e procedimento invasivo ocorridos durante a colonoscopia, acredita-se que a colonoscopia possa ocasionar o processo da TB, e conseqüentemente, a ocorrência de bacteremia transitória (HARTONG; BARNES e CALKINS, 1977).

A bacteremia que se segue ao procedimento endoscópico é geralmente causada por microorganismos provenientes do sistema digestivo, cujos principais representantes são bacilos Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Bacteróides sp* e *Klebsiella sp.*, os Gram-positivos *Corynebacterium sp*, *Clostridium sp* e *Bacillus sp*. Entre os cocos Gram-positivos estão os *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp* e *Peptostreptococcus sp* do sistema digestivo e o *Streptococcus viridans* da flora bucal (BOTOMAN e SURAWICZ, 1986; KEEFFE, 1993; NELSON, 2003) . O *Staphylococcus epidermidis*, além de não representar a bactéria que clinicamente se espera encontrar, é considerado o contaminante mais comum nas hemoculturas (ARONSON e BOR, 1987; LOW et al., 1987; NUNES, NOSSA, TODINOV, SILVA e FORMIGA, 1999; BRINGEL, ALVES e GAMA, 2003).

A TB é definida como sendo a passagem de bactérias entéricas viáveis, fragmentos bacterianos entéricos e endotoxinas através da barreira intestinal, podendo ocorrer devido a três situações: disfunção da barreira intestinal, alteração da microbiota intestinal e deficiência imunológica do hospedeiro (EL-BABA; TOLIA; LIN e DAJANI, 1996).

Bacteremia é a presença de bactérias viáveis no sangue e pode ocorrer de forma transitória, intermitente ou persistente. Pode ainda estar ou não associada à sepse, na dependência do estado imunológico do paciente e do processo infeccioso desencadeante (BONE, BALK, CERRA e Col., 1992; KNOBEL, 1998).

Em pessoas híidas a bacteremia, quando transitória, não deve deixar seqüelas. Porém, em indivíduos com lesões cardíacas suscetíveis, a bactéria pode se alojar em valva cardíaca, endocárdio e no endotélio próximo a defeitos anatômicos congênitos e resultar em endocardite infecciosa ou ainda endarterite (DAJANI, BISNO, CHUNG e Col., 1990). Também há possibilidade de ocasionar infecção por contaminação em próteses ortopédicas e enxertos vasculares

(SHULMAN, AMREN, BISNO e Col., 1984), originar complicações sépticas em pacientes gravemente leucopênicos e naqueles imunocomprometidos (FLEISCHER, 1989). O interesse por complicações infecciosas decorrentes da manipulação endoscópica do cólon, meio altamente contaminado, é limitado na literatura, tendo sido realizados alguns estudos utilizando a hemocultura por alguns autores nas décadas de 70 e 80 (TABELA 1). Embora pouco discutida nas principais séries sobre colonoscopia diagnóstica e terapêutica, a bacteremia após a manipulação do cólon é uma possibilidade real, havendo descrições sobre a sua ocorrência e incidência variável (HABR-GAMA e WAYE, 1989).

TABELA - 1 BACTEREMIA EM COLONOSCOPIA

Autor	n	Bacteremia %
Rafoth e col., 1975	52	0
Craner e col., 1975	12	0
Norfleet e col.,1976(1)	40	0
Dickman e col.,1976	52	6
Norfleet e col.,1976(2)	60	0
Pelican e col.,1976(1)	14	0
Pelican e col.,1976(2)	22	27
Geraci e col., 1976	36	15
Liebermann e col.,1976	20	15
Coughlin e col., 1977	35	0
Hartong e col., 1977	15	0
Stray e col., 1978	25	4
Daly e col., 1979	09	11
Byrne e col., 1981	18	0
Goldman e col., 1982	75	0
Botoman e col., 1986	528	2.2
Nunes e Col. 1999	69	4.4
Malheiros e Col. 2003	94	0

Esta inconstância na incidência está relacionada à heterogeneidade dos pacientes estudados, diferentes formas de preparo de cólon empregadas, número de coletas realizadas, períodos variáveis para coletas, técnicas diferentes para hemoculturas, tempo variável na realização da colonoscopia e realização de procedimentos endoscópicos invasivos (BRINGEL, ALVES e GAMA, 2003).

Acredita-se que durante a colonoscopia, a distensão gerada pelo ar injetado na luz colônica possa facilitar a translocação bacteriana (SCHOEFFEL, JAEGER, BUTT, SALM e FARHMANN, 1994). Em seus estudos, Bringel e colaboradores observaram que, de 81 pacientes, 10 (12,3%) apresentaram bacteremia após polipectomia colonoscópica (BRINGEL, ALVES E GAMA, 2003). Por outro lado, Shorvon e colaboradores, em 1983, observaram em seus estudos que esses fatores não constituíram risco para bacteremia (SHORVON, EYKYN E COTTON, 1983).

Botoman e Surawicz, em 1986, e Keeffe, em 1993, observaram picos de hemoculturas positivas em dois momentos: Durante o exame e cinco minutos após o seu término, e relataram ocorrer hemoculturas positivas até 12 horas após a colonoscopia (BOTOMAN E SURAWICZ, 1986; KEEFFE, 1993).

2.3 DETERMINAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

2.3.1 HEMOCULTURA

Os métodos para a realização de hemocultura podem ser tanto convencionais quanto automatizados. Os automatizados apresentam como vantagens, o menor tempo para detecção dos patógenos e a monitorização contínua do crescimento microbiano (KARAHAN et al., 2006).

Os principais sistemas de hemocultura utilizados hoje são os automatizados e com monitorização contínua, que incluem o BacT/ALERT[®] SA BIOMÉRIEUX (Organon Teknika, Scarborough, Canadá), a geração 9000 do BACTEC[®] (Becton & Dickinson, Brasil), o DIFCO ESP[®] (Difco Laboratories, Detroit,

EUA), MicroScan Blood Culture System 5[®] (Baxter MicroScan, Califórnia, EUA). Os métodos utilizados para a detecção do crescimento de microorganismos variam entre os diferentes sistemas, porém, em todos eles, a detecção do crescimento bacteriano não exige manipulação direta, o que diminui a chance dos resultados falso-positivos. A monitorização é contínua, reduzindo o tempo de detecção do crescimento de microorganismos (KARAHAN et al., 2006).

O sistema de hemocultura automatizado utiliza sensor colorimétrico e reflexão da luz para monitorar a presença e produção de dióxido de carbono dissolvido no meio de cultura. Existindo microorganismos na amostra testada, estes metabolizarão os substratos contidos no meio de cultura. O crescimento de microorganismos produz o dióxido de carbono, o sensor permeável a gases existente no fundo do frasco altera sua cor, indicando a presença de microorganismos na amostra sanguínea (KARAHAN et al., 2006; NOLTE et al., 1993).

O Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT[®] SA BIOMÉRIEUX (Organon Teknika, Scarborough, Canadá), possui um meio de cultura que fornece condições nutricionais e ambientais adequadas para o crescimento bacteriano. A formulação do meio de cultura consiste da digestão pancreática da caseína (1,7% p/v), da digestão da soja pela papina (0,3% p/v), do polianetosulfonato de sódio (0,035% p/v), do hidrocloreto de piridoxina (0,001% p/v), além de outros complexos de aminoácidos e substratos de carboidratos em água purificada (KARAHAN et al., 2006).

O volume de sangue analisado é uma das variáveis mais críticas para a positividade do exame de hemocultura. Tendo em vista, que a quantidade de bactérias circulantes é variável e intermitente, diante disso, Dal Forno e colaboradores sugerem em sua revisão feita em 2005, que o volume ideal de sangue a ser coletado seja entre 5 e 10 ml (DAL FORNO et al., 2005).

2.3.2 DETECÇÃO DE DNA BACTERIANO PELA PCR

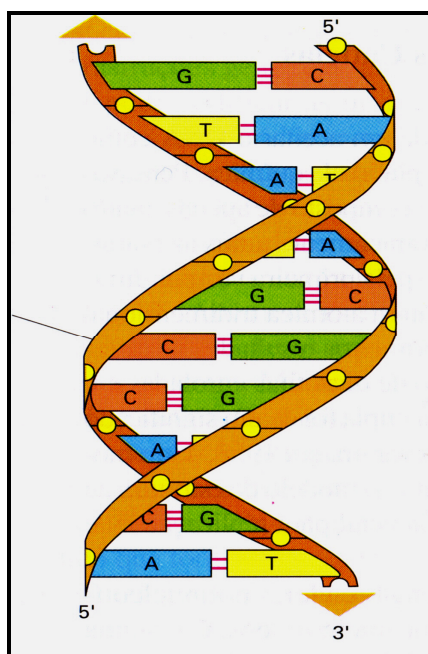
2.3.2.1 DNA

O genoma de um ser vivo, animal ou vegetal, reúne as informações responsáveis por todas as suas características básicas e está contido nas moléculas de DNA, que incluem os genes distribuídos ao longo dos cromossomos. O DNA é a molécula que carrega o código genético de todos os organismos vivos, eucarióticos e procarióticos, com exceção do vírus RNA (EÇA, 2004).

A molécula de DNA é de fato um polímero, composta por duas fitas que se unem por pontes de hidrogênio entre as bases de fitas diferentes. Os nucleotídeos são constituídos por três tipos de moléculas, sendo um carboidrato com 5 átomos de carbono, uma base nitrogenada e um grupo fosfato. As bases se ligam aos açúcares e estão voltadas para dentro da dupla fita numa regra fixa, conhecida como regra de Chargaff: A adenina (A) pareia com a timina (T) através de duas pontes de hidrogênio, e a guanina (G) pareia com a citosina (C) através de três pontes de hidrogênio, conforme é observado na figura 01 (EÇA, 2004).

Cada fita de DNA tem uma extremidade 5' e uma extremidade 3' dadas pelos carbonos disponíveis das últimas moléculas do carboidrato, isto é, apresentam direção ou sentido. As duas fitas correm em direções opostas (antiparalelas), formando uma dupla hélice, com uma volta completa a cada dez nucleotídeos (WATSON e CRICK, 1953).

FIGURA 01 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM SEGMENTO DE MOLÉCULA DE DNA.



Observam-se as duas fitas formando uma estrutura helicoidal ligadas entre si através das bases nitrogenadas. (Extraído de Pinho. M., *Biologia Molecular do Câncer – Fundamentos para a Prática Médica*. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, 2005).

2.3.2.2 GENE

Define-se como gene cada segmento contido na molécula de DNA, cuja seqüência de nucleotídeos contém informação completa para a expressão de uma proteína. A seqüência gênica é específica para cada espécie. No entanto, podem existir determinados segmentos que são comuns a diversas espécies. A partir deste achado, foi desenvolvido um método para a identificação do segmento específico do DNA presente em bactérias (ANDERSON, 1994).

Para que seja feita a pesquisa do DNA bacteriano na amostra de sangue coletado é necessária inicialmente a extração do DNA contido na amostra, o qual

será posteriormente isolado através de um processo de centrifugação. Dentre este conjunto de DNA extraído é pesquisado o segmento 16s, que é comum às bactérias. Para isso é utilizada a técnica de PCR, que permite amplificar determinado segmento de uma molécula de DNA usando dois iniciadores complementares às extremidades do segmento que se quer amplificar e uma enzima polimerase. Os iniciadores escolhidos serão os responsáveis pela definição do segmento de DNA que vai ser amplificado (ANDERSON, 1994).

2.3.2.3 PCR

A PCR é uma técnica altamente sensível, por meio da qual diminuta quantidade de seqüências específicas do DNA podem ser enzimaticamente amplificadas milhares de vezes em apenas algumas horas (MULLIS e FALOONA, 1986).

Esta técnica revolucionou as pesquisas em biologia molecular, pois até então se demorava muito tempo para a amplificação do DNA. A partir da PCR é possível obter-se cópias de uma parte do material genético em quantidade suficiente que permita detectar e analisar a seqüência que é alvo do estudo. A reação explora a função natural da enzima chamada de taq-polimerase, extraída da bactéria *Thermus Aquaticus*, que é uma enzima termoestável. Este processo de amplificação do DNA foi desenvolvido por Kary Mullis em 1983 (MULLIS e FALOONA, 1986).

Desde então, houve um aumento exponencial no número de publicações científicas que relatavam utilizar a técnica da PCR em experimentos, passando de 3 publicações em 1986 para 1700 em 1990 (EÇA, 2004).

O fato central que faz a PCR tão útil é que todo organismo vivo possui seqüências de nucleotídeos no DNA que são únicas e específicas para cada espécie. Esta reação permite a amplificação de qualquer seqüência de DNA coletada de amostras de materiais biológicos (EÇA, 2004).

Para a execução da técnica da PCR é preciso que se tenha conhecimento prévio da seqüência do ácido nucléico que se deseja amplificar, chamada de

seqüência alvo. A partir disto, desenham-se dois iniciadores para dar partida ao processo de síntese em um local específico. Um iniciador serve para sintetizar a seqüência alvo no sentido 3'- 5'e outro para o sentido inverso isto é, 5'-3' (EÇA, 2004).

Iniciador é uma pequena seqüência de nucleotídeos que hibridiza no início da seqüência alvo que se quer amplificar e da qual ele é complementar (MULLIS e FALOONA, 1986).

Ao reconhecer o iniciador, a polimerase sintetiza uma cópia complementar, obedecendo à informação contida na seqüência de DNA que será replicada. A reação da PCR é feita no termociclador, onde a molécula de DNA é inicialmente desnaturada pelo aumento de temperatura: as fitas se separam. A temperatura é então reduzida, permitindo que cada iniciador pareie ou hibridize com sua seqüência complementar, presente nas extremidades do segmento que vai ser copiado. O ciclo de desnaturação, hibridização e extensão se repetem muitas vezes, resultando em milhares de cópias do segmento desejado (MULLIS e FALOONA, 1986).

2.3.2.4 ELETROFORESE

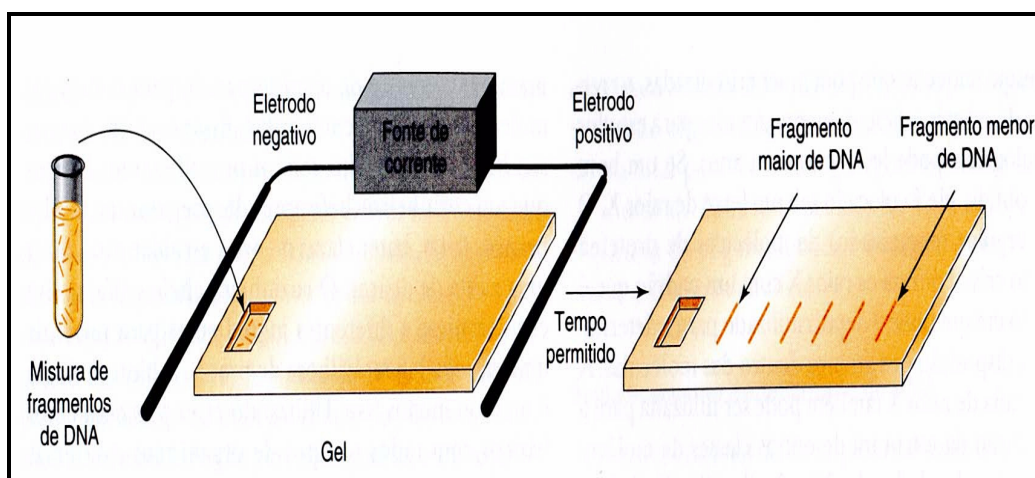
A eletroforese é um método laboratorial amplamente utilizado no meio científico onde é aplicada uma corrente elétrica controlada com a finalidade de separar diversas moléculas orgânicas, como lipoproteínas, proteínas, RNA e DNA segundo sua massa e carga elétrica através de uma matriz gelatinosa (EÇA, 2004; PINHO, 2005).

Uma vez amplificado o segmento da molécula de DNA, este pode ser identificado mediante a técnica de eletroforese, que consiste no deslocamento de biomoléculas pela ação do campo elétrico na matriz sólida com gel de agarose ou poliacrilamida (EÇA, 2004; PINHO, 2005).

Sob influência da carga elétrica aplicada ao sistema, as diferentes moléculas migram através do gel com velocidades distintas, sendo que as moléculas menores migram mais rapidamente em relação as maiores no mesmo intervalo de tempo.

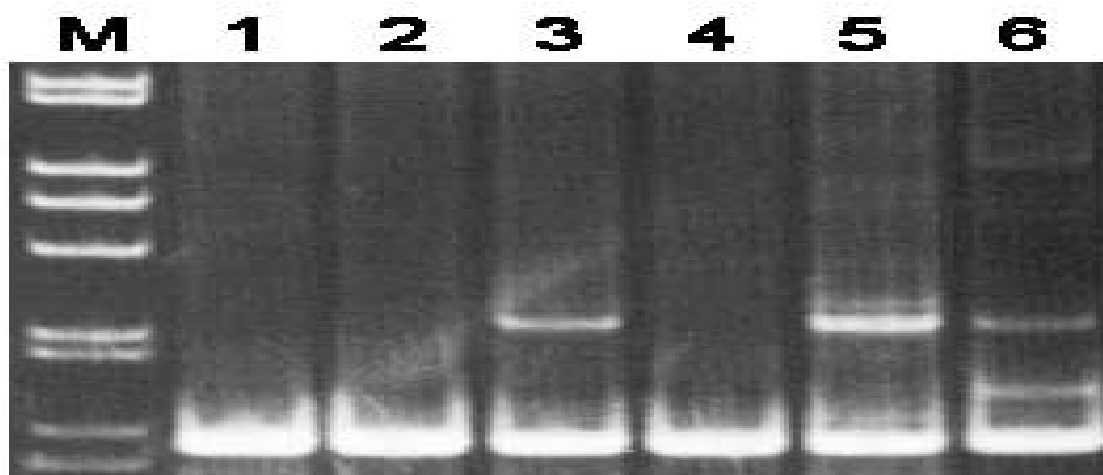
Sabendo-se que os segmentos de DNA amplificados apresentam carga elétrica negativa, quando colocados sobre uma lâmina de gel na qual seja aplicada corrente elétrica deverão migrar no sentido do pólo negativo para o pólo positivo (Figura 2). Neste caso, a simples migração do fragmento de DNA amplificado através do gel, indicará a presença de DNA bacteriano na amostra (EÇA, 2004; PINHO, 2005).

FIGURA 02 - SISTEMA DE ELETROFORESE



Desenho esquemático do sistema de eletroforese - (Extraído de Pinho. M., Biologia Molecular do Câncer – Fundamentos para a Prática Médica. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, 2005).

FIGURA 03 - FOTOGRAFIA DO GEL DE AGAROSE COM BANDAS DE DNA.



Bandas de DNA em branco no de gel de agarose

3. PACIENTES E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal São José, Joinville/SC (parecer consubstanciado em anexo).

Todos os pacientes foram devidamente esclarecidos e consentiram, por escrito, em participar da pesquisa (formulário em anexo).

3.1 PACIENTES

Foram coletadas 100 amostras de sangue de 50 pacientes consecutivos de ambos os sexos (Tabela 02). A idade média dos pacientes foi de 53,92 anos (25 -76 anos) e a mediana de 52 anos, sendo o de menor idade com 25 anos e o de maior 76 anos.

Foram excluídos dois pacientes do estudo, sendo um por apresentar preparo de colon inadequado para a realização da colonoscopia, e outro, por estar em vigência de febre.

As indicações para a realização da colonoscopia foram: Dor abdominal a esclarecer, enterorragia, diarreia aguda ou crônica, constipação, investigação ou seguimento de doença inflamatória intestinal e investigação ou seguimento oncológico.

Todos submetidos ao exame de vídeo-colonosopia no Serviço de Endoscopia Digestiva do Centro Hospitalar Unimed de Joinville /SC (figura 04) no período compreendido entre 03 de julho e 18 de agosto de 2006.

TABELA 02 – SEXO E FREQUÊNCIA

Sexo	Número
Feminino	27(54%)
Masculino	23(46%)
Total	50(100%)

n- número

Foram considerados como critérios de inclusão:

- Todos os pacientes que realizaram colonoscopia eletiva, pelo departamento de coloproctologia, no serviço de endoscopia digestiva do Centro Hospitalar Unimed – Joinville/SC, no período entre 03 de julho e 18 de agosto de 2006;
- Todos os pacientes que aceitaram, de livre e espontânea vontade, participar do estudo e assinaram o consentimento informado.

Foram considerados como critérios de exclusão:

- Pacientes fazendo uso atual ou até uma semana antes do exame de medicamentos antibióticos, corticoesteróides ou imunossupressores;
- Pacientes com preparo de cólon inadequado devido à presença de grande volume de resíduos sólidos;
- Pacientes em vigência de qualquer processo infeccioso ou febril;
- Pacientes com lesões de pele no local de punção venosa para a coleta do sangue.

3.2 COLONOSCOPIA

3.2.1 PREPARO DO CÓLON

Todos os pacientes foram submetidos a limpeza mecânica do cólon para a realização da colonoscopia mediante os seguintes procedimentos:

A) No dia anterior ao exame:

- Supressão da ingestão de frutas e verduras;
- Beber muito líquido, como água, chás, café sem leite e sucos coados;
- Ingerir almoço leve, como sopas, arroz e macarrão e ingerir ao jantar caldo de sopa, chá com bolacha salgada ou torradas, gelatina clara;
- Ingerir quatro comprimidos de bisacodil 5mg às 20h00min.

B) No dia do exame:

- Os pacientes ingeriram, entre 7 e 8 horas da manhã, a solução resultante da adição de 500ml de manitol à 20%, 500ml de suco de laranja coado e 10ml de dimeticona gotas. Após, permaneceriam em jejum até a realização do exame.

3.2.2 INSTRUMENTAL

O aparelho utilizado foi o vídeo-colonoscópico da marca OLYMPUS CV-145 (OLYMPUS OPTICAL, Tóquio, Japão). As pinças de polipectomia e biópsia utilizadas foram da marca G-FLEX EUA (Atlanta, EUA), esterilizadas com gás de etileno.

3.2.3 TÉCNICA DE REALIZAÇÃO DA COLONOSCOPIA

Os exames de colonoscopia foram realizados em ambiente adequado para este procedimento (Figura 4). O acesso venoso foi realizado com técnica asséptica, no antebraço direito de cada paciente, utilizando-se gazes estéreis, solução de digluconato de clorexidina 0,5% e abocath 18GAX1. 88IN (BECTON DICKINSON,

Juiz de Fora, Brasil). Manteve-se o acesso venoso com a infusão de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Este acesso foi utilizado pelo médico anestesiológico para infusão de medicamentos. A sedação foi obtida através do uso de propofol 10mg/ml endovenoso, com dose de indução de 0,5mg a 1mg/kg, administrada durante 1 a 5 minutos e manutenção com 1,5mg a 4,5mg/kg/h, administrados por infusão contínua até atingir o nível desejado para a sedação.

Os pacientes foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, com membros inferiores fletidos. A seguir, foi realizado toque digital após prévia lubrificação com geléia de cloridrato de lidocaína a 2%, para examinar o reto e causar suave dilatação do ânus, sendo posteriormente introduzida a extremidade do endoscópio no canal anal. Tendo o endoscópio passado pelo canal anal, iniciou-se a insuflação de ar, promovendo abertura e visão da luz retal. O colonoscópio foi então progressivamente introduzido no cólon até o ceco.

FIGURA 04 - SALA DE ENDOSCOPIA DO CENTRO HOSPITALAR UNIMED – JOINVILLE SC



3.3 REGISTRO EM PROTOCOLO

O médico examinador preencheu o protocolo (modelo no anexo) durante a realização do exame, constando da identificação, indicações do exame, usam de medicamentos, doenças pré-existentes e tempo de duração do exame.

3.4 COLETA DE SANGUE

Foram utilizadas para as coletas de sangue, assepsia com digluconato de clorexidina degermante e digluconato de clorexidina alcoólica 0,5%, além de material estéril para o curativo, luvas de procedimento e garrote, seringas e agulhas descartáveis. Os materiais perfuro-cortantes foram descartados em recipiente adequado. Os frascos utilizados para a deposição do material coletado foram (figura 05) do Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® SA BIOMÉRIEUX (Organon Teknika, Scarborough, Canadá), e frascos estéreis com tampa de fechamento hermético para a PCR (figura 06).

FIGURA 05 – FRASCO DO SISTEMA DE DETECÇÃO MICROBIANA BACT/ALERT®



FIGURA 06 – FRASCO COM FECHAMENTO HERMÉTICO



Frasco estéril utilizado no armazenamento de material coletado para a PCR.

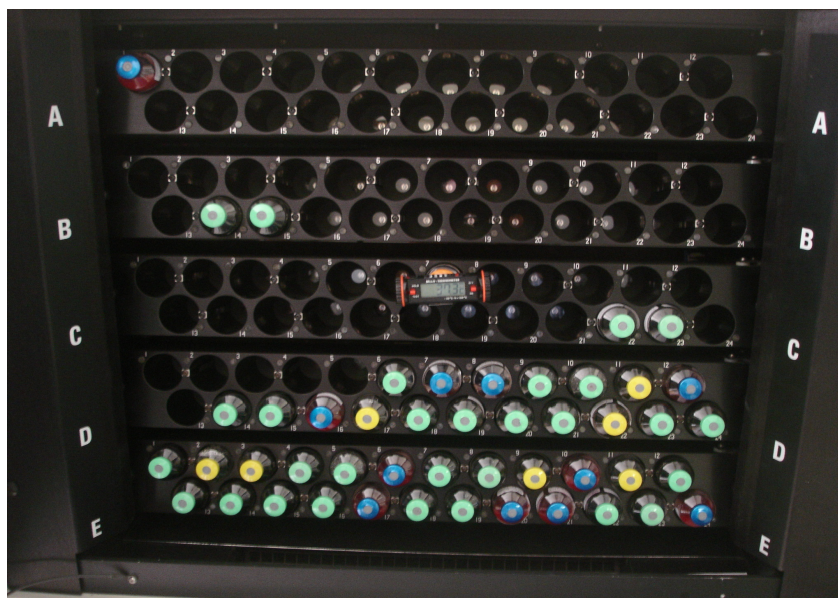
Foram coletadas duas amostras de 15 ml de sangue em sítios diferentes para evitar possíveis fontes de contaminação, sendo a primeira cinco minutos antes da introdução do endoscópio no canal anal, e a segunda 05 minutos após sua retirada. Cada amostra foi dividida em dois frascos, sendo 10 ml destinados ao frasco do sistema automatizado de hemocultura e os outros 5ml ao frasco da pesquisa de DNA bacteriano. Os frascos foram identificados com etiquetas adesivas coladas na parte externa como primeira e segunda coleta, respectivamente.

Após a coleta, os frascos foram acondicionados em recipiente adequado para armazenamento e transporte. Aqueles referentes à hemocultura foram encaminhados imediatamente para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia do Centro Hospitalar Unimed-Joinville/SC, enquanto os restantes foram transportados ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville – Univille, Joinville/SC.

3.5 HEMOCULTURAS

As hemoculturas foram processadas automaticamente no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® SA BIOMÉRIEUX (Organon Teknika, Scarborough, Canadá), que foi usado para determinar a presença de microorganismos nas amostras de sangue. Os frascos permaneceram incubados a 37°C durante cinco dias na incubadora automática BacT/ALERT® 120 (Organon Teknika, Scarborough, Canadá), sendo feitas leituras automáticas periodicamente (FIGURA 07) . O sensor permeável a gases existente no fundo do frasco alteraria sua cor de azul-esverdeado para amarelo na presença do crescimento de microorganismos.

FIGURA 07 – INCUBADORA AUTOMÁTICA BACT/ALERT® 120



Incubadora automática BacT/ALERT® 120 com a porta aberta, onde foram colocados os frascos do sistema automatizado de hemocultura.

3.5.1 BACTERIOSCOPIA

Nas amostras positivas foram realizados testes microbiológicos para a confirmação e identificação do microorganismo.

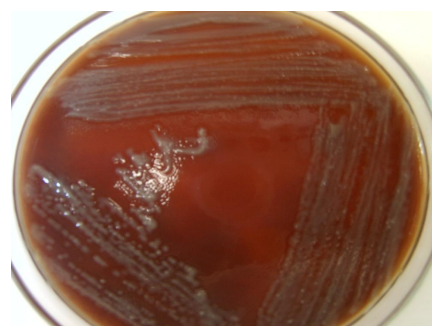
Foi realizada bacterioscopia na amostra positiva do sistema automatizado. Feita a desinfecção da tampa do frasco, homogeneizado e puncionado com luvas de procedimento, seringa e agulha estéril descartáveis, foi retirado 1ml do material presente no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® SA BIOMÉRIEUX (Organon Teknika, Scarborough, Canadá). Foi transferida uma gota da amostra para uma lâmina nova e limpa, sendo tomado o cuidado para não tocar a agulha na lâmina. Espalhada a gota sobre a lâmina com auxílio de uma alça calibrada 1:100. O esfregaço foi secado e fixado na chama do bico de Bunsen e após foi corada pelo método de Gram. A lâmina foi lida no microscópio ótico.

Após conhecido o resultado da bacterioscopia, foi procedido a semeadura nos meios de cultivo, ágar chocolate e ágar sangue de carneiro (figura 08). Foram incubadas as placas ágar de chocolate em tensão de dióxido carbono e as placas com ágar sangue de carneiro em tensão normal de oxigênio. Após o crescimento das colônias no meio de cultivo, foram avaliadas macroscopicamente. A leitura microscópica foi feita com lâmina corada pelo método de Gram.

FIGURA 8 – PLACAS DE CULTIVO



A



B

Observa-se em A, placa de cultivo com ágar chocolate e em B, com ágar sangue de carneiro.

3.6 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

Para a extração do DNA bacteriano foi empregada a técnica utilizada no laboratório de biologia molecular da Universidade da Região de Joinville – Univille, que foi descrita por Sambrook e colaboradores, em 1989.

Foram realizadas as seguintes etapas:

- Foram utilizados 100ul da amostra de sangue e adicionados com micropipeta automática (figura 09) de 1000 µL, Pipetman® F(Gilson, Middleton, EUA), 400µl do tampão de extração 10mM Tris pH 7,4; 10mM NaCl; 25mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 1% Dodecil Sulfato de Sódio, (UltraPure™ Sodium Dodecyl Sulfate, Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 100 µg/ ml de Proteinase K, (Protein kinases, Invitrogen, Carlsbad, EUA).
- Incubado a 37°C, “overnight”.
- Adicionados com micropipeta automática de 1000 µL, Pipetman® F (Gilson, Middleton, EUA), volume igual de Fenol neutralizado (UltraPure™ Phenol, Invitrogen, Carlsbad, EUA).
- Agitado suavemente por 10 minutos no agitador Vortex Genie 2 (Scientific, NY, EUA), (figura 10).
- Centrifugado na microcentrifuga (Eppendorf AG, Centrifuge 5415 R, Hamburgo, Alemanha), a 13000 rpm por 10 minutos (figura 11).
- Recolhida a fase aquosa com micropipeta automática de 1000 µL, Pipetman® F (Gilson, Middleton, EUA) e transferida para um novo tubo e foi adicionado com micropipeta automática de 1000 µL, Pipetman® F (Gilson, Middleton, EUA) o mesmo volume de solução de Fenol e Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25:24:1) (UltraPure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1), Invitrogen, Carlsbad, EUA).
- Agitado suavemente por 10 minutos no agitador Vortex Genie 2 (Scientific, Nova York, EUA).
- Centrifugado na microcentrifuga (Eppendorf AG, Centrifuge 5415 R, Hamburgo, Alemanha), a 13000 rpm por 10 minutos.

- Retirado a fase aquosa com micropipeta automática de 1000 μL , Pipetman® F (Gilson, Middleton, EUA) e transferida para um novo tubo com igual volume de clorofórmio (Labsynth, Diadema, Brasil) e álcool isoamílico (LabMaster, Curitiba, Brasil).
- Agitado suavemente por 10 minutos no agitador Vortex Genie 2 (Scientific, NY, EUA).
- Centrifugado em microcentrífuga (Eppendorf AG Centrifuge 55415 R, Hamburgo, Alemanha) a 13000 rpm por 10 minutos.
- Recolhida a fase aquosa com micropipeta automática de 1000 μL , Pipetman® F (Gilson, Middleton, EUA) e transferida para um novo tubo com 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3M, pH 5,2 (LabMaster, Curitiba, Brasil).
- Adicionado 2,5 vezes o volume de Etanol (F. Maia Indústria e Comércio, Cotia, São Paulo, Brasil) 100% gelado com micropipeta automática de 1000 μL , Pipetman® F (Gilson, Inc. Middleton, EUA).
- Incubado a -20°C , “overnight”, para ocorrer a precipitação do DNA.
- Centrifugado na microcentrífuga (Eppendorf AG, Centrifuge 5415 R, Hamburgo, Alemanha) a 4°C , por 10 minutos a 13.000 rpm.
- Em seguida foram realizadas duas lavagens com etanol 70% gelado.
- Foi eluído o DNA em 25 μl de TE (10mM Tris-HCL, 10 μM EDTA; pH 8,0), (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

FIGURA 09 – MICROPIPETA ADICIONANDO MATERIAL COM DNA NO TUBO

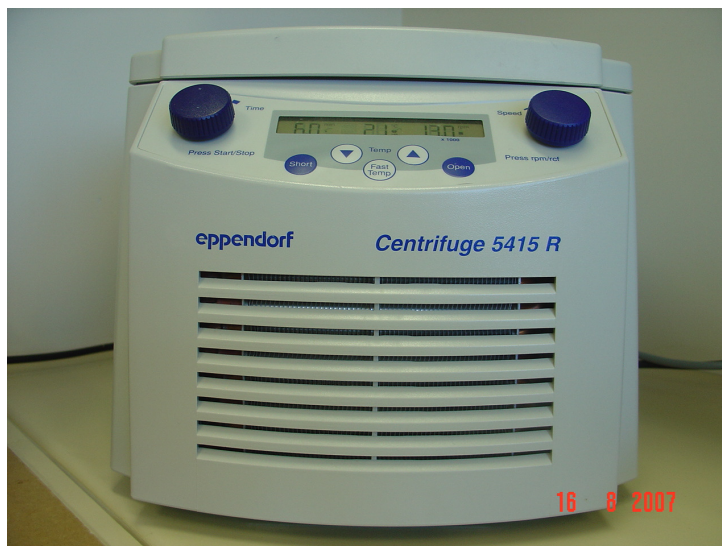


FIGURA 10 – AGITADOR VORTEX GENIE 2



Agitador Vortex Genie 2 utilizado para agitar suavemente material no processo de extração de DNA

FIGURA 11 - MICROCENTRIFUGA EPPENDORF



Microcentrifuga Eppendorf 5415r utilizada para centrifugar o material no processo de extração de DNA

3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

As reações de PCR, usadas para a amplificação da seqüência correspondente ao RNA ribossomal subunidade 16s do gene, foram feitas com as seguintes condições:

- Usado o termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA), no processo da PCR para desnaturação, anelamento e extensão (FIGURA 13).
- 10X Ne Buffer (5mM KCl, 1Mm Tris-HCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂), 0,5mM MgCl₂, 0,2mM DNTP's, 20 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores Com1 (5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3') e Com 2 (5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT3'). 1U de

Platinum Taq DNA polimerase, (Invitrogen, Carlsbad, EUA). 5U da enzima de restrição *Alu I* (figura 12) (New England BioLabs, Massachusetts, EUA).

- Essa reação foi incubada a 37°C por 2 horas para a digestão completa de possíveis DNAs contaminantes na reação, e inativada por 20 minutos a 65°C.
- Após, acrescentou-se 3,0µl de DNA a ser amplificado.
- A ativação da enzima *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) ocorreu a 94°C por 3 minutos e a amplificação ocorreu em 35 ciclos, onde cada ciclo consistia de: desnaturação: 1 minuto a 94°C - anelamento: 1 minuto a 55°C – e extensão: 1minuto e 30 segundos a 72°C, seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

FIGURA 12 – ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Alu I*



Enzima utilizada para a digestão completa de possíveis DNAs contaminantes.

FIGURA 13 – TERMOCICLADOR



Termociclador utilizado no processo da PCR, para amplificação de segmento específico do DNA.

3.8 ELETROFORESE

O produto resultado da amplificação de aproximadamente 410bp foi corrido em gel 1% agarose por 1 hora a 100 Volts e corado na presença do corante intercalante brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. O surgimento de bandas no de gel de agarose foi indicativo da presença de DNA (figuras 14 e 15).

FIGURA14 – EQUIPAMENTO PARA ELETROFORESE

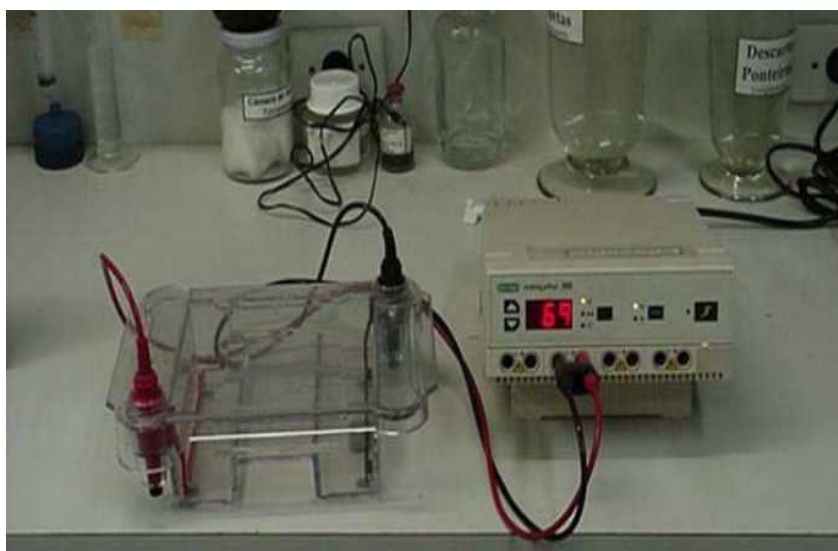
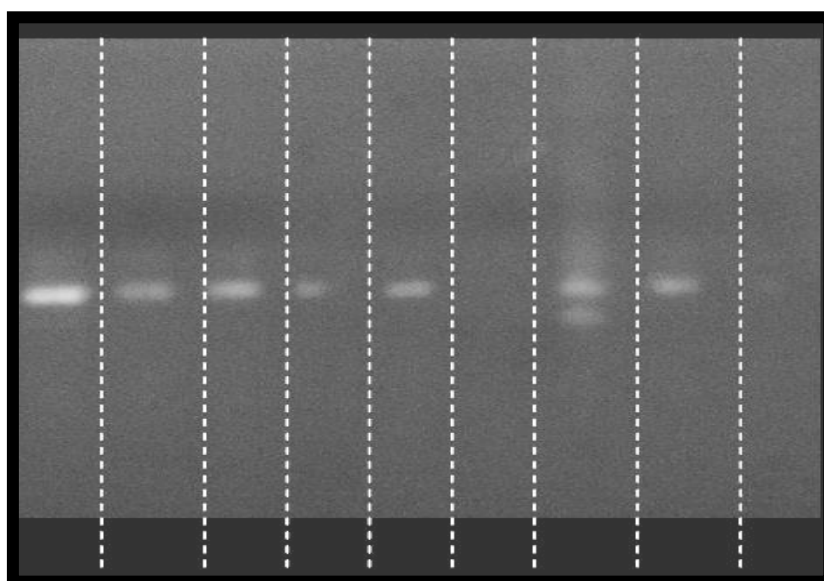


FIGURA 15 - FOTOGRAFIA DO GEL DE AGAROSE.



Bandas de DNA vistas como faixas brancas transversais no gel de agarose.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da TB na colonoscopia, de acordo com os resultados da PCR e da hemocultura, e para comparação destes métodos de avaliação, foi considerado o teste binomial unilateral. Para avaliação de variáveis dicotômicas em relação à TB, foi considerado o teste exato de Fisher bilateral. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Foi testada a hipótese nula de que a probabilidade de presença da TB, investigada pela hemocultura, antes da colonoscopia é igual à probabilidade de presença da TB depois da colonoscopia, versus a hipótese alternativa de que a probabilidade de presença da TB depois da colonoscopia é maior do que a probabilidade de presença da TB antes da colonoscopia.

Também foi testada a hipótese nula de que a probabilidade de presença da TB, investigada pela PCR, antes da colonoscopia é igual à probabilidade de presença da TB depois da colonoscopia, versus a hipótese alternativa de que a probabilidade de presença da TB depois da colonoscopia é maior do que a probabilidade de presença da TB antes da colonoscopia.

Para comparação da hemocultura e PCR, foi considerado o resultado conjunto dos exames antes e depois da colonoscopia, sendo avaliado o poder de identificar a mudança de um resultado negativo da presença da TB na coleta anterior à colonoscopia para um resultado positivo na coleta posterior à colonoscopia. Desta forma, foi testada a hipótese nula de que a probabilidade de identificação da mudança de negativo para positivo na PCR é igual à probabilidade de identificação da mudança de negativo para positivo na hemocultura, versus a hipótese alternativa de probabilidades inversas.

Também foi testada a hipótese nula de que a probabilidade de presença da TB em pacientes que tem o tempo de colonoscopia até 30 minutos é igual à probabilidade da TB em pacientes que tem o tempo de colonoscopia maior do que 30 minutos, versus a hipótese alternativa de probabilidades inversas.

Finalmente, foi testada a hipótese nula de que a probabilidade de presença da TB em pacientes que são submetidos a procedimento invasivo é igual à

probabilidade da TB em pacientes que não são submetidos ao procedimento, versus a hipótese alternativa de probabilidades inversas.

4. RESULTADOS

Foram realizadas 50 colonoscopias em 50 pacientes consecutivos que procuraram o serviço de endoscopia do Centro Hospitalar Unimed de Joinville/SC e satisfizeram os critérios de inclusão. Em todos os exames o aparelho de colonoscopia chegou ao ceco.

4.1 TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS

O tempo de duração do exame de colonoscopia foi inferior a 30 minutos em 39 dos casos e não ultrapassou 60 minutos em nenhum caso, conforme pode se observado na tabela 03.

TABELA 03 – TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS

Tempo em minutos	n	Percentual
00 a 30	39	78%
30 a 60	11	22%
Total	50	100%

n - número

4.2 RESULTADOS DOS EXAMES DE COLONOSCOPIA

Quanto ao resultado dos exames de colonoscopia, foi observado que em 25 pacientes (50%) os achados eram compatíveis com os padrões da normalidade. As anormalidades encontradas foram pólipos, doença diverticular, doença inflamatória intestinal, câncer, fístula anal e angiodisplasia. (Tabela 04).

TABELA 04 - RESULTADOS DOS EXAMES DE COLONOSCOPIA

Achado	n (%)
Normal	25 (50%)
Pólipos colorretais	13 (26%)
Doença diverticular	08 (16%)
Doença inflamatória intestinal	03 (6%)
Câncer colorretal	01 (2%)
Angiodisplasia	01 (2%)
Fístula anal	01 (2%)
Anastomose	01 (2%)

n= número

4.3 HEMOCULTURAS

Os resultados das hemoculturas encontram-se na tabela 05. Pode-se observar que, na primeira coleta, quarenta e oito hemoculturas foram negativas para o crescimento bacteriano, enquanto duas (4%) foram positivas, com crescimento de *Staphylococcus epidermidis*. Na segunda coleta, todas as hemoculturas foram negativas para crescimento bacteriano. O resultado do teste estatístico indicou que a probabilidade de existir TB antes e depois da colonoscopia é similar ($p=0,25$).

TABELA 05 - RESULTADOS DAS HEMOCULTURAS

	Hemocultura 1ª coleta	Hemocultura 2ª coleta
Positivo(n)	02 (4%)	00
Negativo(n)	48 (96%)	00
Total	50 (100%)	00

n- número
 $p= 0,25$

4.4 DNA BACTERIANO POR PCR

O resultado da pesquisa de DNA bacteriano pela PCR está resumido na tabela 06. Na primeira coleta, o DNA bacteriano foi encontrado em 23 (46%) amostras, enquanto 27 (54%) amostras foram negativas. Na segunda coleta, o DNA bacteriano foi encontrado em 33 (66%) amostras, enquanto 17 (34%) amostras foram negativas. O resultado do teste estatístico indicou que a colonoscopia aumenta a probabilidade de existência da TB, quando efetuada a avaliação pela PCR ($p=0,001$). Isto pode ser observado na tabela 06, constatando os resultados de percentuais dos casos positivos na primeira (46%) e na segunda coleta (66%).

TABELA 06 - DNA BACTERIANO POR PCR

	PCR 1ª coleta	PCR 2ª coleta
Positivo(n)	23 (46%)	33 (66%)
Negativo(n)	27 (54%)	17 (34%)
Total	50 (100%)	50 (100%)

n - número
 $p= 0,001$

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE HEMOCULTURA E PCR

TABELA 07 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA HEMOCULTURA E A PCR

HEMOC (n)	PCR (n)				Total (n)
	1ªc N e 2ªc N	1ªc N e 2ªc P	1ªc P e 2ªc N	1ªc P e 2ªc P	
1ªc N e 2ªc N	17 (34%)	10 (20%)	0 (0%)	21 (42%)	48
1ªc P e 2ªc N	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4%)	2
TOTAL	17	10	0	23	50

n – número
 N – negativo
 P - positivo
 1ªc - 1ª coleta
 2ªc - 2ª coleta

Com relação à comparação dos resultados da TB mediante hemocultura e PCR, foi observado que em 17 (34%) casos, tanto a hemocultura quanto a PCR, foram negativos na primeira e segunda coleta. Em 10 (20%) casos, a hemocultura foi negativa na primeira e segunda coleta, enquanto a PCR foi negativa na primeira e positiva na segunda coleta. Dos 21 (42%) casos em que a PCR foi positiva na primeira e segunda coleta, a hemocultura foi negativa tanto na primeira quanto na segunda coleta. Em dois (4%) casos a hemocultura foi positiva na primeira e negativa na segunda coleta, e em ambos foram positivos na primeira e segunda coleta mediante a PCR.

O resultado do teste estatístico rejeitou a hipótese de que tanto a hemocultura quanto a PCR foram iguais na capacidade de identificar a TB na colonoscopia. Desta forma, a probabilidade de identificar a TB na colonoscopia é maior pela PCR ($p=0,002$).

4.6 TB E TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS

Não foram identificadas hemoculturas positivas nas coletas realizadas após a os exames de colonoscopias, desta forma, não foi possível estabelecer relação entre o tempo de execução das colonoscopias e TB mediante hemocultura.

Em relação ao tempo de execução das colonoscopias e a PCR, foi observado que das 20 colonoscopias com tempo inferior a 30 minutos e tiveram a pesquisa pela PCR negativa na primeira coleta, seis (30%) positivaram na segunda coleta, indicando desta forma TB. Por outro lado, das sete colonoscopias com tempo de execução superior a 30 minutos, quatro (57,14%) positivaram na segunda coleta indicando TB. O resultado do teste estatístico, conforme observado na tabela 08, indicou que a probabilidade de existência da TB nos pacientes com tempo de execução da colonoscopia inferior à 30 minutos é similar à dos pacientes com tempo de execução superior à 30 minutos ($p=0,390$).

TABELA 08 – PCR E TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS

PCR	Tempo de execução da colonoscopia	
	Inferior à 30 minutos(n)	Superior à 30 minutos(n)
1 ^a c N e 2 ^a c P	06 (30%)	04 (57,1%)
1 ^a c N e 2 ^a c N	14 (70%)	03 (42,8%)
Total	20 (100%)	07 (100%)

n – número

N – negativo

P - positivo

1^ac - 1^a coleta

2^ac - 2^a coleta

p= 0,390

4.7 PCR E PROCEDIMENTOS ENDOSCÓPICOS INVASIVOS

A análise da tabela 09 demonstra o resultado do estudo da TB mediante a PCR nos 27 pacientes que foram submetidos a procedimento endoscópico invasivo. Foi observado que dos 10 casos em que houve a mudança de negativo na primeira coleta para positivo na segunda coleta, apenas quatro, haviam sido submetidos a procedimento endoscópico invasivo. Neste mesmo grupo, seis passaram de negativo na primeira coleta para positivo na segunda coleta, sem procedimento endoscópico invasivo. Por outro lado, dos 17 casos em que se mantiveram os resultados negativos tanto na primeira quanto na segunda coleta, em seis foram feitos procedimento endoscópico invasivo. Diante destes aspectos, o resultado do teste estatístico indicou que a probabilidade da existência da TB em pacientes que são submetidos a procedimento endoscópico invasivo é igual à dos pacientes que não são submetidos a esses procedimentos (p=0,999).

TABELA 09 - PCR E PROCEDIMENTOS ENDOSCÓPICOS INVASIVOS

PCR	PROCEDIMENTO		TOTAL (n)
	SIM(n)	NÃO(n)	
1 ^a c N e 2 ^a c P	04 (40%)	06 (60%)	10
1 ^a c N e 2 ^a c N	06 (35,2%)	11 (64,7%)	17
Total	10	17	27

n – número

N – negativo

P - positivo

1^ac - 1^a coleta

2^ac - 2^a coleta

p= 0,999

5. DISCUSSÃO

Com o aumento da frequência e complexidade nas intervenções colonoscópicas surgiram complicações relacionadas ao processo da TB. Este processo, até então, sempre foi pesquisado através da hemocultura, com resultados conflitantes entre os autores. O presente estudo justifica-se por haver empregado, possivelmente de forma inédita em colonoscopia, a PCR como método de diagnóstico da TB, além de compará-la com os achados de hemocultura.

5.1 - TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS

O tempo de realização do exame de colonoscopia neste estudo foi inferior a 30 minutos em 78% casos, enquanto em 22%, foi superior. Bernstein e colaboradores, em 2005, em 587 colonoscopias tiveram o tempo médio de execução de nove minutos, enquanto Arcovedo e colaboradores, em 2007, observaram em 435 exames consecutivos o tempo médio do exame no sexo feminino foram dez minutos, e no masculino, oito minutos. Embora estes autores aferiram apenas o tempo de retirada do endoscópio.

O tempo médio de realização dos exames por colonoscopistas treinados é inferior a trinta minutos em média, exceto naqueles exames com dificuldade técnica, lesões obstrutivas, estenoses, aderências, irradiação pélvica e doença diverticular ou procedimentos terapêuticos complexos.

5.2 – RESULTADOS DOS EXAMES DE COLONOSCOPIA

Os achados durante os exames de colonoscopia neste estudo, vêm de encontro aos relatados por Nahas e Colaboradores em 2005, quando investigaram 2.567 exames. Onde, em torno de 50% foram compatíveis com os padrões de

normalidade, e a alteração mais freqüente foram os pólipos colorretais (15%) seguidos pela doença diverticular dos cólons (12%) (NAHAS et al., 2005).

5.3 - HEMOCULTURAS

Em todas as amostras avaliadas foram coletados 10ml de sangue para a hemocultura, tendo em vista que o número de microorganismos é pequeno e sua presença na corrente sanguínea ocorre de forma intermitente. O volume de sangue cultivado é uma variável crítica para hemocultura, pois quanto maior volume, maior será o índice de positividade. Dal Forno e colaboradores, em 2005, observaram que a porcentagem de cultivos positivos diminui significativamente quando são coletados menos de 10ml de sangue por frasco.

Encontrou-se 4% de hemoculturas positivas nas amostras coletadas antes da introdução do endoscópio, enquanto nas coletadas após a realização da colonoscopia não houve crescimento bacteriano. Estes resultados vêm de encontro aos achados de Nunes e colaboradores, em 1999, que investigaram a ocorrência de translocação bacteriana na colonoscopia em 69 pacientes e encontraram 5% das hemoculturas positivas na amostra de sangue coletada após o exame. London e colaboradores, em 1986, reportaram 4% das hemoculturas positivas de 50 pacientes que realizaram colonoscopia. Botoman e Surawicz observaram, em revisão feita em 1986 com 13 estudos, totalizando 528 pacientes submetidos à colonoscopia, foi relatada freqüência de 2.2% de bacteremia em exames de colonoscopia. Por outro lado, Norfleet e colaboradores, em 1976, e Malheiros e colaboradores, em 2003, não tiveram hemoculturas positivas para o crescimento bacteriano em 94 pacientes submetidos à colonoscopia.

Esta inconstância na incidência esta relacionada à heterogeneidade dos pacientes estudados, espectro microbiano analisado, número de coletas realizadas, períodos variáveis para coletas, técnicas diferentes para hemoculturas, tempo variável de duração do exame e realização de procedimento endoscópico invasivo.

O microorganismo identificado em nossas amostras positivas foi o *Staphylococcus epidermidis*. O crescimento de *Staphylococcus epidermidis* nas hemoculturas em geral tem sido considerado como contaminação, tendo em vista, ser um microorganismo comum na superfície cutânea e não estar habitualmente presente na flora intestinal (ARONSON e BOR, 1987, LOW et al., 1987, NUNES, NOSSA, TODINOV, SILVA e FORMIGA, 1999, BRINGEL, ALVES e GAMA, 2003).

Com o uso do Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT[®] para hemocultura foi possível menor tempo para detecção dos patógenos, monitorização não invasiva e contínua do crescimento microbiano, o que contribuiu para diminuir a chance de resultados falso-positivos. Ainda assim, atribuiu-se as hemoculturas positivas coletadas antes da colonoscopia, provável contaminação na ocasião da coleta.

Neste estudo, os resultados encontrados nas hemoculturas coletadas antes e após a introdução do endoscópio no canal anal, vêm de encontro às publicações nacionais e internacionais.

5.4 - DNA BACTERIANO POR PCR

Foi encontrado neste estudo, DNA bacteriano em 46% das amostras coletadas antes da introdução do endoscópio, enquanto, nas coletas após a colonoscopia a positividade foi de 66%.

Karahan e colaboradores, em 2005, encontraram 9,6% de positividade para DNA bacteriano, amplificando o segmento 16s do gene de bactéria com a PCR, em 169 hemoculturas que foram realizadas por diversos motivos em diferentes pacientes hospitalizados, e que haviam tido cultivo negativo nos frascos de sistemas automatizados de hemocultura.

Kane e colaboradores, em 1998, quando investigaram translocação bacteriana em pacientes cirúrgicos, por hemocultura e pesquisa do segmento 16s do gene bacteriano pela PCR, observaram que em seus controles hígidos não houve qualquer identificação de DNA bacteriano pela PCR, ou seja, todos os

controles foram negativos para a pesquisa do segmento 16s do gene (KANE, ALEXANDER, JOHANNIGMAN, 1998).

Ono e colaboradores, em 2005, coletaram sangue de 52 pacientes antes e após serem submetidos a operações abdominais de grande porte para pesquisar a translocação bacteriana mediante a detecção de DNA bacteriano pela PCR com a amplificação do segmento 16s do gene. Em nenhuma das amostras pré-operatórias, assim como em dez indivíduos controles, houve detecção de DNA bacteriano pela PCR ou pela hemocultura.

Diante destes aspectos, o índice de 46% de positividade encontrado no presente estudo em amostras coletadas antes da colonoscopia sugere a ocorrência de translocação bacteriana antes mesmo da realização do exame. Como todos os pacientes haviam sido submetidos a preparo mecânico do cólon mediante utilização de manitol e bisacodil, formulou-se a hipótese de que este preparo tenha sido o responsável pela translocação bacteriana observada, sendo este achado ainda não relatado na literatura.

Durante o processo de preparo mecânico do cólon com o uso do manitol é provocada diarreia osmótica, aumento da motilidade do cólon, certo grau de distensão e aumento da permeabilidade passiva na mucosa do cólon. Schweigel e colaboradores, em 2005, identificaram a possibilidade da translocação bacteriana durante estudo experimental em ovelhas com uso do manitol oral, possivelmente por aumentar a permeabilidade passiva na mucosa do cólon (SCHWEIGEL et al., 2005).

A pesquisa de segmentos do DNA utilizando iniciadores universais pode identificar qualquer tipo de DNA, não indicando especificamente bactérias viáveis ou apenas fragmentos bacterianos presentes na amostra. Baseados nisso, aventou-se a hipótese da existência de resíduos bacterianos secundários ao processo de esterilização com radiação gama, que estariam aderidas em seringas, agulhas e frascos de coleta e não foram identificados nos cultivos. A existência desta hipótese já foi sugerida por Trampuz e colaboradores, em 2006, quando investigaram em frascos estéreis pelo processo de radiação gama a viabilidade do DNA de *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* com o uso da PCR e 16s (TRAMPUZ, PIPER, STECKELBERG, PATEL, 2006).

Por outro lado, os estudos de Kane e colaboradores, e de Ono e colaboradores, não sustentam a hipótese de Trampuz e colaboradores, pois não identificaram translocação bacteriana, mediante a detecção de DNA bacteriano pela técnica de amplificação do segmento 16s do gene, em indivíduos controles que eram hígidos. Assim como, os próprios resultados do presente estudo, pois apresentaram grande número de resultados negativos utilizando à mesma metodologia, ou seja, 27 (54%) amostras na primeira coleta e 17 (34%) na segunda coleta.

Quintanilha e colaboradores, em 2007, investigaram a presença de bactérias nos diferentes sítios do cólon em pacientes que foram submetidos ao preparo mecânico com manitol. As coletas foram realizadas através do endoscópio durante o exame de colonoscopia. Os autores observaram distribuição similar de bactérias aeróbias e anaeróbias. Concluíram ainda que muitas das bactérias anaeróbias, como a *Veillonella sp*, não são patogênicas pelo seu baixo potencial de óxido-redução (QUINTANILHA et al., 2007). Diante deste aspecto, pode-se estar identificando translocação de bactérias anaeróbias presente na amostra, tendo em vista que a técnica de cultivo empregada pelo sistema automatizado de hemocultura não possibilita o crescimento destes microorganismos. Por outro lado, este sistema automatizado para hemocultura, é o utilizado, pela maioria dos autores para o cultivo bacteriano em pesquisas de TB.

Nas amostras coletadas após a colonoscopia encontrou-se, no presente estudo 66% de positividade, ou seja, 20% acima do encontrado na primeira coleta. Considera-se que ambas as coletas foram realizadas da mesma forma e processadas igualmente, sugere-se então, que houve translocação bacteriana durante o exame de colonoscopia.

A ausência de manifestação clínica secundária ao processo da TB, nestes pacientes, é sugerida pelo número reduzido e baixa patogênicidade das bactérias translocadas.

Como não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham empregado a pesquisa do segmento 16s do gene por PCR para a determinação de ocorrência da TB durante a colonoscopia não foi possível comparar estes resultados.

5.5 – COMPARAÇÃO ENTRE HEMOCULTURA E PCR

Foi observado que, com a técnica de cultivo empregada pelo sistema automatizado de hemocultura, não ocorreram mudanças de negativo na primeira para positivo na segunda coleta, enquanto com a PCR, em 10 (20%) casos passou o resultado de negativo na primeira para positivo na segunda coleta, indicando a existência da TB.

Os resultados das hemoculturas vêm de encontro às publicações nacionais e internacionais. Por outro lado, os achados deste estudo com a PCR, não puderam ser comparados pela ausência na literatura de estudos semelhantes em colonoscopia. Certamente novas pesquisas surgirão e estes dados serão confrontados.

Neste estudo, quando foram comparados estatisticamente os resultados obtidos na identificação da TB entre, o sistema automatizado de hemocultura e a PCR, foi constatado que a sensibilidade para detecção da TB durante exames de colonoscopia é maior com a PCR.

5.6 TB E TEMPO DE EXECUÇÃO DAS COLONOSCOPIAS

Neste estudo foi estratificado o tempo de execução da colonoscopia em dois grupos, tendo como divisor o limite de 30 minutos.

Não foi possível neste estudo estabelecer relação entre o tempo de execução das colonoscopias e TB mediante hemocultura.

Foi observado mediante a PCR, que das 20 colonoscopias com tempo de execução inferior a 30 minutos, em apenas seis houve a mudança de negativo na primeira para positivo na segunda coleta. Enquanto, das sete colonoscopias em que o tempo foi superior a trinta minutos, em quatro houve a mudança de negativo na primeira para positivo na segunda coleta, indicando TB mediante a PCR.

O teste estatístico indicou que a existência da TB nos pacientes com tempo de execução da colonoscopia inferior a 30 minutos foi igual àqueles com tempo superior a 30 minutos.

Diante destes aspectos, conclui-se que o tempo de execução do exame de colonoscopia não é fator determinante no processo da TB em colonoscopia.

5.7 PCR E PROCEDIMENTOS ENDOSCÓPICOS INVASIVOS

A importância do tratamento endoscópico dos pólipos colorretais é fundamentada no reconhecimento da associação entre adenoma e câncer. As biópsias realizadas na mucosa do cólon tem seu valor baseado na elucidação histológica de patologias colorretais.

A análise da existência da TB mediante a PCR nos 27 pacientes que foram submetidos a procedimentos endoscópicos invasivos, mostrou que dos 10 casos em que houve a mudança de negativo na primeira coleta para positivo na segunda coleta, apenas quatro haviam sido submetidos a procedimentos endoscópicos invasivos. Por outro lado, dos 17 pacientes nos quais o resultado se manteve negativo na primeira e segunda coleta, em seis foram feitos procedimentos endoscópicos invasivos.

O teste estatístico indicou que a probabilidade da existência da TB mediante a PCR em pacientes que são submetidos a procedimento endoscópico invasivo é igual à dos pacientes que não são submetidos ao mesmo procedimento ($p=0,999$).

Em presença destes resultados, conclui-se que a realização de procedimentos endoscópicos invasivos não determina TB em colonoscopia mediante investigação pela PCR.

5.8 – APLICABILIDADE CLÍNICA DO ESTUDO

Embora a maioria dos casos de bacteremia que se segue à colonoscopia seja transitória e não reconhecível clinicamente, suas conseqüências podem ser desastrosas, sobretudo em pacientes com lesões cardiovasculares suscetíveis,

podendo resultar em endocardite infecciosa, endarterite e contaminação nos enxertos vasculares e próteses ortopédicas, além de complicações sépticas em pacientes gravemente leucopênicos e imunocomprometidos (FLEISCHER, 1989).

Mesmo na ausência de bacteremia com bactérias viáveis, alguns produtos microbianos podem ser absorvidos em decorrência da manipulação endoscópica do cólon. As endotoxinas e fragmentos provenientes da parede celular da flora gram-negativa podem atingir a circulação portal e sistêmica, sobretudo em pacientes com alteração da função do sistema reticuloendotelial hepático. Assim como a bacteremia, a translocação dessas substâncias é definida como responsável pelo desenvolvimento de sepse em pacientes de alto risco.

Apesar de todo o progresso obtido nas técnicas de hemocultura, muitas vezes, a TB não é identificada.

Os resultados do presente estudo sugerem a existência de translocação bacteriana em colonoscopia diagnosticada pela PCR e não identificada nos sistemas automatizados de hemocultura.

Em pessoas híginas a TB não deve deixar seqüelas, porém em indivíduos suscetíveis, é relevante a atenção do endoscopista na realização de colonoscopia pelo risco de complicações secundárias a TB, pois o resultado negativo de hemocultura processada em sistema automatizado, não exclui a ocorrência da translocação bacteriana.

5.9 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Tornam-se necessárias novas pesquisas para esclarecimentos do índice 46% de TB ocorrida nas coletas realizadas antes da colonoscopia. Sugere-se, no próximo passo, investigar TB no processo de preparo do cólon, utilizando controles hígidos antes do preparo do colon.

6. CONCLUSÕES

A comparação entre translocação bacteriana detectada, por hemocultura e reação em cadeia da polimerase antes e após colonoscopia, nas condições do presente estudo permitiram concluir que:

1. Não é possível neste estudo comprovar a possibilidade de ocorrência da translocação bacteriana em colonoscopia mediante sistema automatizado de hemocultura.
2. A reação em cadeia da polimerase aumenta possivelmente a detecção da ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia.
3. A sensibilidade para detecção da ocorrência de translocação bacteriana em colonoscopia é maior com a reação em cadeia da polimerase quando comparada ao sistema automatizado de hemocultura.
4. A ocorrência da translocação bacteriana detectada pela reação em cadeia da polimerase nos pacientes com tempo de execução da colonoscopia inferior a 30 minutos é similar à dos pacientes com tempo de execução superior a 30 minutos.
5. Não foi possível determinar a translocação bacteriana em colonoscopia mediante investigação pela reação em cadeia da polimerase durante a realização de procedimento endoscópico invasivo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B. Broad-range polymerase chain reaction for detection and identification of bacteria. **J. Fla. Med. Assoc.**, Jacksonville, v.81, n.12, p.835-837, 1994.
- ARCOVEDO, R.; LARSEN, C.; REYES, H.S. Patient factors associated with a faster insertion of the colonoscope. **Surg Endosc.** New York, v.21, n.6, p. 885-888, 2007.
- ARONSON, M.D.; BOR, D.H. Blood cultures. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.106, n.2, p. 246-253, 1987.
- BERNSTEIN, C.; THORN, M.; MONSEES, K.; SPELL, R.; O'CONNOR, J.B. A prospective study of factors that determine cecal intubation time at colonoscopy. **Gastrointest Endosc.** St Louis, v.61, n.1, p.72-75, 2005.
- BYRNE, W.J; EULER, A.R; CAMPBELL, M; EISENACH, K.D. Bacteremia in children following upper gastrointestinal endoscopy or colonoscopy. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** New York, v.1, n 4, p. 551-553, 1982.
- BONE, R.C.; BALK, R.A; CERRA, F.B.; *et al.* ACCP/SCCM Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest.**, Chicago, v.101, n.6, p.1644-1655, 1992.
- BOSSHARD, P.P.; KRONENBERG, A.; ZBINDEN, R.; RUEF, C.; BOTTGER, E.C; ALTWEGG, M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.37, n. 2, p.167-172, 2003.
- BOTOMAN, V.A.; SURAWICZ, C.M; Bacteremia with gastrointestinal endoscopic procedures. **Gastrointest. Endosc.**, St Louis, v.32, n.5, p. 342-346, 1986.
- BRINGEL, R.W.A.; ALVES, P.R.A.; GAMA, A.H. Incidência comparativa de bacteremia pós-polipectomia colonoscópica com e sem infiltração salina submucosa, **GED Gastroenterol. Endosc. Dig.**, São Paulo, v.22, n.5, p.185-192, 2003.
- CAPPELL, M.S.; FRIEDEL, D. The role of sigmoidoscopy and colonoscopy in the diagnosis and management of lower gastrointestinal disorders: endoscopic findings, therapy, and complications. **Med. Clin. North Am.**, Philadelphia, n.86, p.1253-1288, 2002.
- CHIQUET, C.; LINA, G.; BENITO, Y.; CORNUT, P.L.; ETIENNE, J.; ROMANET, J.P.; DENIS, P.; VANDENESCH, F. Polymerase chain reaction identification in aqueous humor of patients with postoperative endophthalmitis. **J. Cataract. Refract. Surg.**, Philadelphia, v.33, n.4, p. 635-641, 2007.

COUGHLIN, G.P.; BUTLER, R.N.; ALP, M.H.; GRANT, A.K. Colonoscopy and bacteremia, **Gut**, London ,v.18, n.8, p.678-679, 1977.

CRANER, G.E; OGBURN, R.M. More data on bacteraemia in colonoscopy. **Gastrointest Endosc.** St Louis, v. 22, p. 105, 1975.

DAJANI, A.S.; BISNO, A.L.; CHUNG, K.J.; *et al.* Prevention of bacterial endocarditis: recommendations by the American Heart Association. **JAMA**, Chicago, v.264, n.22, p. 2919-2922, 1990.

DAL FORNO, N.L.F.; CAMPOS, A.S.; ROSA, L.C.; GODOY, L.P.; NOAL, A.L.; HÖRNER, R. Influência do volume de sangue no exame de hemocultura utilizando sistema automatizado em Hospital de Ensino. **RBAC**, Rio de Janeiro, v.37, n.1, p. 7-9, 2005.

DALY, J.P; MOLINIE, C; MISSONNIER, G; ESSIUX, H; SALIOU, P; DUROSOIR, J.L; CRISTAU, P; LAVERDANT, C.H. Le risuge infectieux endoscopie digestive. Étude prospective et resultants d'une enquête nationale. **Medécine et armées.** Paris, v. 7, n. 9, p. 799-805.

DICKMAN, M.D; FARRELL, R; HIGGS, R.H; WRIGHT, L.E; HUMPHRIES, T.J; WOJCIK, J.D; CHAPPELKA, R. Colonoscopy associated bacteremia. **Surg Gynecol Obstet.** Chicago, v.142, n2, p.173-176, 1976.

EÇA, L.P.; e Col. Biologia molecular – Guia Prático e Didático. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, p. 1-9, 2004.

EL-BABA, M.; TOLIA, V.; LIN, C.H.; DAJANI, A. Absence of bacteremia after gastrointestinal procedures in children. **Gastrointest. Endosc.**, St Louis n.44, p. 378-381,1996.

FLEISCHER, D. Controversies, dilemmas, and dialogues: recommendations for antibiotic prophylaxis before endoscopy. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.84, n.12, p. 1489-1491, 1989.

GOLDMAN, G.D; MILLER, S.A; FURMAN, D.S; BROCK, D; RYAN, J.L; MCCALLUM, R.W. Sigmoidoscopy and bacteremia. **Ann Intern Med.** Philadelphia, v. 97, n. 5, p. 784-785, 1982.

GERACI, K. SIMFENDORFER, C. ROSENTHAL, M. Does bacteraemia follow colonoscopy. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 70, p. 1189, 1976.

HABR-GAMA, A; WAYE, J.D. Complications and hazards of gastrointestinal endoscopy. **World J Surg.** New York , V. 13, n. 2, p. 193-201, 1989.

HARTONG, W.A.; BARNES, W.G.; CALKINS, W.G. The Absence of Bacteremia During Colonoscopy. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.67, n.3, p. 240-244, 1977.

HUANG, Y.; FAN, X.G.; TANG, Z.S.; LIU, L.; TIAN, X.F.; LI, N. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in peripheral blood from patients with peptic ulcer or gastritis. **APMIS**, Copenhagen, v.114, n.12, p.851-856, 2006.

KANE, T.D.; ALEXANDER, J.W.; JOHANNIGMAN, J.A.; The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. **Ann Surg.**, Philadelphia, v.227, n 1, p.1-9, 1998.

KARAHAN, Z.C.; MUMCUOGLU, I.; GURIZ, H.; TAMER, D.; BALABAN, N.; AYSEV, D.; AKAR, N. PCR evaluation of false-positive signals from two automated blood-culture systems. **J. Med. Microbiol.**, London, v.55, n.1, p.53-537, 2006.

KEEFFE, E.B. Antibiotic prophylaxis: who, when, and how. **Gastrointest Endosc Clin. North Am.**, Philadelphia, n.3, v.3, p. 431-445, 1993.

KNOBEL, E. *Conduas no paciente grave*. Segunda edição, Editora Atheneu, São Paulo, v.1, p. 18, 1998.

KISS, A.; FERENCI, P.; GRANINGER, W.; PAMPERL, H.; POTZI, R.; MERYN, S. Endotoxaemia following colonoscopy. **Endoscopy**, Stuttgart, v.15, n. 1, p.24-26, 1983.

LIEBERMANN, T.R. Bacteremia and fiberoptic endoscopy. **Gastrointest Endosc.** St Louis, v.23, n 1, p. 36-37, 1976.

LOW, D.E.; SHOENUT, J.P.; KENNEDY, J.K.; SHARMA, G.P.; HARDING, G.K.; DEN BOER, B.; MICFLIKIER, A.B. Prospective assessment of risk of bacteremia with colonoscopy and polypectomy. **Dig Dis Sci.**, Winnipeg. v. 32, n.11, p. 1239-1243, 1987.

LONDON, M.T.; CHAPMAN, B.A.; FAOAGALI, J.L.; COOK, H.B. Colonoscopy and bacteraemia: an experience in 50 patients. **N Z Med J.** Wellington, v. 23, n. 99 p. 269-71, 1986.

MALHEIROS, A.P.R.; ALMEIDA, M.G.; BARAVIERA, A.C.; GOMES, C.A.S.; KISS, D.R. Bacteremia em Colonoscopia: estudo prospectivo através da hemocultura. **GED - Gastroenterol. Endosc. Dig.**, São Paulo, v.22, n.6, p.227-230, 2003.

MOHAMMADI, R. N. I.; PIETERSZ, L. A. H.; SCHOLTALBERS, C. M. J. E.; VANDENBROUCKE-GRAULS, P. H. M.; SAVELKOUL, H. W. REESINK. Optimal sampling time after preparation of platelet concentrates for detection of bacterial contamination by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 89, n.4, p. 208–214, 2005.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.; Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** New York, v.155, p.335-350, 1987.

NAHAS, S. C.; MARQUES, C. F. S.; ARAÚJO, S. A.; AISAKA, A. A.; NAHAS, C. S. R.; PINTO, R. A.; KISS, D. R. Colonoscopia como método diagnóstico e terapêutico das moléstias do intestino grosso: análise de 2.567 exames. **Arq. Gastroenterol.** São Paulo, v. 42, n. 2, p. 77-82, 2005.

NELSON, B.D. Infection Control During Gastrointestinal Endoscopy, **J. Lab. Clin. Med.** , New York, v.141, n.3, p. 159-167, 2003.

NELSON, D.B.; MUSCARELLA, L.F. Current issues in endoscope reprocessing and infection control during gastrointestinal endoscopy. **World J Gastroenterol.** Beijing, v.12; n. 25; p. 3953-3964, 2006.

NOLTE, F.S.; WILLIAMS, J.M.; JERRIS, R.C.; MORELLO, J.A.; LEITCH, C.D.; MATUSHEK, S.; SCHWABE, L.D.; DORIGAN, F.; KOCKA, F.E. Multicenter clinical evaluation of continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). **J. Clin. Microbiol.**, London, n. 31, p. 552–557, 1993.

NORFLEET, R.G.; MULHOLLAND, D.D.; MITCHELL, P.D.; PHILO, J., WALTERS, E.W. Does bacteremia follow colonoscopy? **Gastroenterology**, Baltimore, v. 70, n. 1, p. 20-21, 1976.

NORFLEET, R.G.; MITCHELL, P.D.; MULHOLLAND, D.D.; PHILO, J. Does bacteremia follow colonoscopy? II: Results with blood cultures obtained 5, 10, and 15 minutes after colonoscopy. **Gastrointest Endosc.** St Louis, v. 23, n 1, p. 31-32, 1976.

ONO, S; TSUJIMOTO, H; YAMAUCHI, A; HIRAKI, S; TAKAYAMA, E; MOCHIZUKI, H. Detection of microbial DNA in the blood of surgical patients for diagnosing bacterial translocation. **World J Surg.**, New York, V.29, n.4, p.535-9, 2005.

PETTI, C.A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.44, n.8, p.1108-1114, 2007.

PAULA NUNES, B.L.B.B.; NOSSA, F.L.C.; TODINOV, L.R.; SILVA, J.H.; FORMIGA, G.J.S.; Translocação Bacteriana em Colonoscopia. **Rev. Bras. de Coloproct.**, São Paulo, v.19, n.2, p. 99-102, 1999.

PELICAN, G; HENTGES, D; BUTT, J; HAAG, T; ROLFE, R; HUTCHESON, D. Bacteremia during colonoscopy. **Gastrointest Endosc.** St Louis, v. 23, n. 1, p. 33-35, 1976.

PINHO. M. Biologia molecular do câncer – fundamentos para a prática médica. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, p. 55-71, 2005.

QIAN, Q.; TANG, Y.W.; KOLBERT, C.P.; TORGERSON, C.A.; HUGHES, J.G.; VETTER, E.A.; HARMSSEN, W.S.; MONTGOMERY, S.O.; COCKERILL, F.R.; PERSING, D.H. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240

instrument true-positive and false-positive results. **J. Clin. Microbiol.**, London, v. 39, n.10, p. 3578-3582, 2001.

QUILICI, F.A.; GRECCO, C.E. Colonoscopia. Editora Lemos-Editorial, São Paulo, p. 17-18, 2000.

QUINTANILHA, A.G.; ZILBERSTEIN, B.; SANTOS, M.A.A.; PAJECKI, D.; MOURA, E.G.H.; ALVES, P.R.A.; MALUF-FILHO, F.; CECCONELLO, I. A novel sampling method for the investigation of gut microbiota. **World J Gastroenterol.**, Beijing, v. 13, n. 29, p. 3990-3995, 2007.

RAFOTH, R.J.; SORENSON, R.M; BOND, J.H. JR. Bacteremia following colonoscopy. **Gastrointest Endosc.** St Louis, V.22, n.1, p. 32-3, 1975.

RODICIO, M.D.E.L. R.; MENDOZA, M.D.E.L.C.; Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v.22, n.4, p. 238-245, 2004.

SAMBROOK, J. E.F.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed., vol.I. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHOEFFEL, U.; JAEGER, D.; BUTT, J.; SALM, R.; FARHMANN, E.H. Effect of human bowel wall distension on translocation of indigenous bacteria and endotoxins. **Dig. Dis. Sci.**, New York, n.39, p. 490-493, 1994.

SHORVON, P.J.; EYKYN, S.J.; COTTON, P.B. Gastrointestinal instrumentation, bacteraemia, and endocarditis. **Gut**, London, v.24, n. 11, p. 1078-1093, 1983.

SCHWEIGEL, M.; FREYER, M.; LECLERCQ, S.; ETSCHMANN, B.; LODEMANN, U.; BÖTTCHER, A.; MARTENS, H. Luminal hyperosmolarity decreases Na transport and impairs barrier function of sheep rumen epithelium. **J Comp Physiol [B]**, Berlin / Heidelberg, v.175, n. 8, p. 575-591, 2005.

SHULMAN, S.T.; AMREN, D.P.; BISNO, A.L.; *et al.* Prevention of bacterial endocarditis: a statement for health professionals by the committee on rheumatic fever and infective endocarditis of the council on cardiovascular disease in the young. **Circulation**, Dallas, v.70, n.6, p.1123A-1127A, 1984.

STRAY, N; MIDTVEDT, T; VALNES, K; ROSSELAND, A; PYTTE, R; HOIVIK, B. Endoscopy Related bacteremia. **Scand. J Gastroenterol.** Oslo, V.13, n 3, p.345-347, 1978.

SIQUEIRA, J.F.; ROCAS, I.N.; DE UZEDA, M.; COLOMBO, A.P.; SANTOS, K.R.; Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. **J. Med. Microbiol.**, London, n.51, p.1090 – 1096, 2002.

TRAMPUZ, A.; PIPER, K.E.; STECKELBERG, J.M.; PATEL, R. Effect of gamma irradiation on viability and DNA of Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli. **J Med Microbiol.** , London, v. 55, n 9, p.1271-1275, 2006.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C.; Molecular structures of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, Paris, v.171, p. 737-738, 1953.

WOLFF, W.I.; SHINYA, H. A new approach to colonic polyps. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.178, n.3, p.367-378, 1973.

ANEXOS

ANEXO – 1 PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA

Joinville, 23 de abril de 2007

Ref. CEP Nº 07013

Caro Pesquisador

Dr. Luís Carlos Ferreira

Após a análise do seu projeto de pesquisa sob o título: BACTEREMIA EM COLONOSCOPIA, que será conduzido no Centro Hospitalar Unimed, sob responsabilidade do Dr. Luís Carlos Ferreira, foi avaliado por este Comitê de Ética e Pesquisa e considerado **APROVADO**.

Dra. Luciane Mônica Deboni

Presidente do CEP do Hospital Municipal São José de Joinville-SC

ANEXO – 2**PROTOCOLO PARA COLETA DO MATERIAL DA PESQUISA: TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM COLONOSCOPIA****1. IDENTIFICAÇÃO:**

NOME:.....

SEXO: () MASC. () FEM. IDADE:ANOS

2. INDICAÇÃO:

- () DOR ABDOMINAL () CONSTIPAÇÃO
 () ENTERORRAGIA () DOENÇA INFLAMAT. INTESTINAL
 () DIARRÉIA () ONCOLÓGICO
 () OUTROS

3. USO MEDICAÇÕES: () IMUNOSSUPRESSORAS (QT, RT, CORTICOTERÁPIA, AZATIOPRINA)
 () ANTIBIÓTICOS

4. TEMPO DE EXAME: () ↑ DE 30 MINUTOS () ↓ DE 30 MINUTOS

5. REALIZADO PROCEDIMENTO () NÃO
 () SIM () BIÓPSIA
 () POLIPECTOMIA
 () MUCOSECTOMIA

6. ACHADOS DA COLONOSCOPIA:

- () NORMAL () D. CROHN EM ATIVIDADE
 () DOENÇA DIVERTICULAR () D. CROHN CONTROLADA
 () RETOCOLITE EM ATIVIDADE () CÂNCER
 () RETOCOLITE CONTROLADA () OUTROS

1. Coletar uma amostra de sangue antes da colonoscopia e dividir em dois frascos identificados com nome do paciente e *primeira* coleta
2. Coletar uma amostra de sangue após 05 minutos do término da colonoscopia e dividir em dois frascos identificados com nome do paciente e *segunda* coleta.

ANEXO - 3**CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Joinville,.....de.....de2006.

Eu,.....autorizo a minha inclusão na pesquisa de bacteremia durante a colonoscopia. Estou ciente que será coletado uma amostra de 15 mililitros de sangue do meu corpo com técnica asséptica e material descartável, antes e depois do exame de colonoscopia.

Este sangue será usado exclusivamente para o objetivo do estudo que é a identificação de bactérias no meu sangue durante o exame de colonoscopia.

Fui devidamente informado(a) dos riscos durante a coleta do sangue, entre elas inflamação na veia e dor, sendo as vezes, até mesmo necessário tomar remédios para controle. Posso desistir da minha participação no estudo a qualquer momento, basta solicitar.

Não terei gastos financeiros com a minha participação.

Assinatura para autorização:.....

ANEXO – 4**PROTOCOLO DO PREPARO DE CÓLON PARA A REALIZAÇÃO DE EXAMES DE COLONOSCOPIA NO TURNO DA TARDE – SERVIÇO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA DO CENTRO HOSPITALAR UNIMED – JOINVILLE / SC.**

No dia anterior ao exame:

1. Não comer frutas e verduras.
2. Beber muito líquido, como água, chás, café sem leite e sucos coados.
3. Ingerir almoço leve, como sopas, arroz e macarrão.
4. No jantar, tomar caldo de sopa, chá com bolacha salgada ou torradas, gelatina clara.
5. Tomar 4 comprimidos de bisacodil 5mg às 20h00min

No dia do Exame:

1. Adicionar 500ml de solução de manitol 20%, 500ml de suco de laranja coado e 10ml de dimeticona gotas.
2. Tomar a solução entre 7 de 8 horas da manhã. Tomar em pequenos goles.
3. Durante o período que estiver tomando a solução permanecer deambulando.
4. Após tomar a solução permanecer em jejum até a realização do exame.

ANEXO – 5

PROTOCOLO DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO DO COLONOSCÓPIO - SERVIÇO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA DO CENTRO HOSPITALAR UNIMED – JOINVILLE / SC.

Técnica de limpeza

1. Limpar o tubo de inserção externamente, com gaze ou toalha de papel, imediatamente após a retirada do aparelho do cliente;
2. Desligar a bomba de ar. Retire a válvula de jato de ar/água puxando-a lentamente e coloque-a na solução de limpeza;
3. Inserir o adaptador para limpeza do canal de ar/água;
4. Alimentar alternadamente com ar e água durante 10 segundos cada. Desligar a fonte de luz. O adaptador para limpeza do canal de ar/água alimentará ambos os canais com água quando pressionado. Quando a válvula for solta, ambos os canais receberão ar automaticamente;
5. Colocar a ponta distal na água e aspirar por aproximadamente 10 segundos. Em seguida alterne a sucção de ar e água várias vezes inserindo e retirando a ponta distal da água. Desligue o dispositivo de sucção;
6. Remover o adaptador para limpeza do canal de ar/água, válvula de sucção e válvula de biópsia.
7. Colocar o tubo de inserção na pia da própria sala e efetuar a limpeza com água e detergente enzimático, com auxílio de gaze;
8. Inspeccionar o endoscópio para verificar danos ocorridos durante o manuseio;
9. Irrigar/aspirar canal de sucção e biópsia para remover matéria orgânica;
10. Remover as válvulas e lava-las com auxílio de escova tipo dental;
11. Limpar a ponta distal com auxílio de escova tipo dental;

12. Limpar o canal de sucção e biópsia com auxílio de escova de limpeza própria, inserindo 750 no tubo de inserção e a 900 no cordão universal. Lavar a ponta da escova a cada saída na ponta distal;
13. Limpar as janelas de fixação das válvulas com auxílio de cotonete;
14. Enxaguar o aparelho com água, interna e externamente;
15. Secar com ar comprimido;

Técnica de Desinfecção

1. Imergir completamente o endoscópio e as válvulas em recipiente plástico com tampa, contendo desinfetante/esterilizante de glutaraldeído a 2%. Com auxílio do irrigador multi-canal e seringa, bombear a solução desinfetante através dos canais. Manter as seringas acopladas às entradas dos canais, com êmbolo tracionado para conservar o nível de desinfetante no interior dos canais. Deixar todo o aparelho submerso por 20 minutos(sempre com a tampa de proteção) no recipiente contendo o desinfetante.
2. Enxaguar abundantemente o endoscópio com água, interna e externamente, utilizando seringa para irrigar/enxaguar todos os canais e orifícios;
3. Secar o tubo de inserção externamente com auxílio de gaze;
4. Irrigar/aspirar todos os canais com álcool a 70% com a finalidade de favorecer a secagem e desinfecção;
5. Utilizar ar comprimido para secar os canais/orifícios.

Considerações Gerais

1. Os itens limpeza e desinfecção devem ser sempre realizados após cada exame de colonoscopia;
2. O item desinfecção deve ser repetido antes do primeiro exame do dia com álcool 70%(fricção e rinsagem);

3. Durante o processo de desinfecção, o aparelho deve permanecer totalmente submerso, sem formação de bolhas de ar onde a solução desinfetante deverá permanecer bombeada em todos os canais, mediante o uso de seringa e irrigador próprio;
4. Solução para a limpeza: utilizar detergente enzimático. Ao final dos trabalhos deixar o aparelho de molho por 5 minutos;
5. O recipiente contendo a solução de glutaraldeído deverá permanecer tampado, a fim de evitar a evaporação do produto e conseqüente perda da eficácia da ação;
6. Observar o enxágüe rigoroso do aparelho após a desinfecção química para evitar que resíduos do desinfetante permaneçam no equipamento;
7. Secar muito bem com ar comprimido o aparelho após a limpeza e desinfecção;
8. O reservatório de água e sua extensão deverão ser esterilizados ou sofrer desinfecção química uma vez ao dia, após o fim dos trabalhos. Deverão permanecer secos quando não tiverem em uso;
9. O reservatório de água deve ser preenchido somente com água estéril;
10. O armazenamento do equipamento deve ser feito sempre pendurado e destampado em local fechado, seco e ventilado, cujo interior deve sofrer limpeza semanal.
11. O pessoal que manuseia o equipamento deverá fazer uso de luvas, avental, óculos e máscara.

ANEXO – 6**TÉCNICA PARA COLETA DE SANGUE**

1. Fazer as coletas de sangue em sítios anatômicos diferentes do membro superior.
2. Fazer assepsia do local a ser puncionado com gazes estéreis e solução de Clorexidina Degermante, completar a assepsia com gazes estéreis e Clorexidina Alcoólica 0,5%.
3. Trocar as luvas.
4. Não tocar mais no local a ser puncionado.
5. Puncionar com seringa descartável estéril de 20 ml, marca BECTON DICKINSON(Juiz de Fora, Brasil).
6. Utilizar agulha descartável estéril 0,70x25/22G1, marca BECTON DICKINSON(Juiz de Fora, Brasil).
7. Coletar 10 ml de sangue imediatamente antes da introdução do colonoscópio.
8. Retirar o lacre da tampa do equipamento automatizado BacT/ALERT[®]SA BIOMÉRIEUX(Organon Teknika, Scarborough, Canadá) de hemocultura e fazer assepsia do mesmo com álcool 70%.
9. Trocar a agulha utilizada na coleta por outra agulha descartável estéril 0,70x25/22G1, marca BECTON DICKINSON(Juiz de Fora, Brasil).
10. Espetar a tampa do equipamento automatizado BacT/ALERT[®] SA BIOMÉRIEUX(Organon Teknika, Scarborough, Canadá) de hemocultura desprezando 10 ml de sangue no mesmo.
11. Desprezar os 5 ml restantes em frasco estéril.
12. Identificar ambos os frascos com o nome do paciente e registrar como primeira coleta.
13. Repetir cinco minutos após a retirada do colonoscópio os itens 2, 3,4,5,6,7,8,9,10 e 11.

14. Identificar ambos os frascos com o nome do paciente e registrar como segunda coleta.

ANEXO – 7

TÉCNICA DO PROCESSO ELETROFORESE - LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE / SC

1. Matriz – Gel de Agarose 1%
2. Voltagem – 100volts
3. Corante – Brometo de Etídio
4. Visualização – Luz Ultravioleta

- Correr em gel de 1% agarose por 1 hora a 100Vots o produto resultado da amplificação com aproximadamente 410bp.
- Corar com corante intercalante Brometo de etídio
- Visualizar sob luz ultravioleta.
- O surgimento de bandas na placa de gel de agarose é indicativo da presença de DNA.

ANEXO – 8 PLANILHA - TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM COLONOSCOPIA

PACIENTE	SEXO	IDADE	INDICAÇÃO	MENOS 30MIN	PROCEDIMENTO	COLONOSCOPIA	HEMOC 1º COL	HEMOC 2º COL	PCR 1º COL	PCR 2º COL
01	f	37	I.U. repetição	s	n	normal	neg	neg	neg	pos
02	m	31	oncol	s	s	anastomose	neg	neg	pos	pos
03	m	76	enteror	s	n	divert	neg	neg	neg	neg
04	m	65	enteror	s	s	normal	neg	neg	neg	neg
05	f	73	enteror	s	n	normal	neg	neg	neg	pos
06	m	35	enteror	n	s	polipos	neg	neg	neg	pos
07	f	74	oncol	s	n	normal	neg	neg	neg	pos
08	f	31	enteror	s	s	normal	neg	neg	pos	pos
09	m	35	dor abd	s	n	normal	neg	neg	pos	pos
10	f	65	dor abd	n	s	polipos	neg	neg	pos	pos
11	m	25	dii	s	s	dii	neg	neg	pos	pos
12	m	74	prolapso	s	s	normal	neg	neg	pos	pos
13	m	52	dor abd	s	s	polipos	neg	neg	neg	neg
14	m	63	dor abd	s	s	normal	neg	neg	pos	pos
15	m	64	enteror	n	s	normal	neg	neg	neg	pos
16	f	49	constipação	s	s	polipos	neg	neg	pos	pos
17	f	70	dor abd	s	n	normal	neg	neg	neg	neg
18	f	52	enteror	s	n	normal	neg	neg	neg	neg
19	f	48	enteror	s	s	normal	neg	neg	neg	pos
20	f	49	dor abd	n	n	normal	neg	neg	neg	pos
21	f	58	oncol	n	s	néoplasia	neg	neg	pos	pos
22	f	42	dor abd	s	n	normal	neg	neg	neg	neg
23	f	52	oncol	s	n	normal	neg	neg	neg	neg
24	f	65	enteror	n	s	angiодisplasia	neg	neg	neg	pos
25	f	51	dor abd	n	s	dii	neg	neg	neg	neg
26	f	66	constipação	s	n	divert	neg	neg	pos	pos
27	f	62	oncol	n	s	divert/polipos	pos	neg	neg	neg
28	m	70	enteror	n	s	polipos	neg	neg	neg	neg
29	f	59	polipos	s	s	polipos	neg	neg	pos	pos
30	f	50	dor abd	s	n	normal	neg	neg	neg	neg
31	m	51	dor abd	s	n	normal	neg	neg	neg	neg
32	m	40	enteror	s	s	polipos	neg	neg	pos	pos
33	m	37	fistula anal	s	n	fistula	neg	neg	neg	neg
34	f	51	constipação	s	n	normal	neg	neg	neg	pos
35	f	58	dor abd	s	n	divert	neg	neg	pos	pos
36	m	59	alt. Hab.intest.	n	s	divert/polipos	neg	neg	pos	pos
37	m	46	dor abd	s	n	divert	neg	neg	neg	pos
38	f	49	dii	s	s	dii	neg	neg	pos	pos
39	m	76	dor abd	s	n	normal	neg	neg	pos	pos
40	m	41	enteror	s	s	normal	neg	neg	pos	pos
41	m	52	check-up	s	s	polipos	neg	neg	pos	pos
42	m	70	enteror	s	s	polipos	neg	neg	pos	pos
43	f	38	polipos	s	n	normal	neg	neg	pos	pos
44	f	72	oncol	s	s	polipos	neg	neg	neg	neg
45	f	50	enteror	s	n	divert	neg	neg	neg	neg
46	f	46	tb intest	n	n	normal	neg	neg	neg	neg
47	m	32	dor abd	s	n	normal	pos	neg	neg	neg
48	m	39	prolapso	s	s	normal	neg	neg	pos	pos
49	m	71	enteror	s	n	normal	neg	neg	neg	neg
50	f	75	dor abd	s	s	divert/polipos	neg	neg	neg	neg

