

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA - CEA - USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO DO PROJETO: "Efeito da ingestão de leite fermentado na microbiota intestinal durante a antibioticoterapia".

PESQUISADORA: Jane H. Atobe

ORIENTADORA: Elsa M. Mamizuka

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

FINALIDADE: Doutorado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Carmen Diva Saldiva de André

Rinaldo Artes

Jane H. Atobe

Elsa M. Mamizuka

Júlia Keiko Mukai

Frederico Zanqueta Poleto

Simone Curti

DATA: 30/04/2002

FINALIDADE DA CONSULTA: Assessoria na análise do experimento.

RELATÓRIO ELABORADO POR: Frederico Zanqueta Poleto

Simone Curti

1. Introdução

O *Lactobacillus casei Shirota* é um microrganismo encontrado no intestino sendo comumente reconhecido como benéfico. Esse microrganismo está contido na composição do Yakult. Os benefícios que têm sido observados são: estimular a imunidade do sistema gastrointestinal, aumentar a capacidade de digestão da lactose, prevenir prisões de ventre e diminuir os efeitos colaterais dos antibióticos.

O objetivo do estudo é comparar crianças de 1 a 15 anos que ingeriram antibióticos do tipo *beta-lactâmicos* com suplementação de Yakult e um placebo. Devido aos benefícios citados e como normalmente o uso de antibióticos desse tipo está associado à ocorrência de diarreia, espera-se que os indivíduos que ingeriram esse microrganismo tenham uma menor incidência desse mal estar.

2. Descrição do experimento e das variáveis

O estudo foi realizado com as crianças de 1 a 15 anos internadas no Hospital Universitário da USP, ou que freqüentavam uma creche localizada próxima das instalações da Universidade de São Paulo.

Os critérios de inclusão foram:

- autorização dos pais ou responsáveis da criança para realização o estudo;
- ausência de diarreia na admissão, neuropatia grave, desnutrição severa, alergia ao leite de vaca;
- presença de alguma infecção em que o tratamento fosse indicado com antibiótico do tipo *beta-lactâmico*;
- início da administração do Yakult ou placebo (leite fermentado mas sem o lactobacilo) em até 5 dias após o início do uso do antibiótico;
- não terem ocorrido mudanças na administração ou no tipo de antibiótico durante o período de observação;
- realizar pelo menos 3 exames de fezes durante o estudo.

Foram realizados exames de fezes antes do início do uso do antibiótico, de 72 em 72 horas depois da cura, e após 7 dias da cura. Em alguns casos os pacientes obtiveram alta do hospital e foram orientados a manter o processo de uso do antibiótico e do tratamento suplementar (Yakult ou placebo). Também foi recomendado que não ingerissem iogurtes ou qualquer tipo de produto fermentado.

O experimento foi duplo cego, ou seja, para cada criança que entrou no estudo foi realizado um sorteio aleatório para definir quem faria parte do grupo Yakult ou do placebo. Durante o período de observação, esse resultado não era de conhecimento nem do paciente, nem do médico e nem dos pesquisadores.

As amostras de fezes foram enviadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, onde foi realizada a contagem dos 11 tipos mais importantes de bactérias. Essas bactérias estão presentes em todas as pessoas e são importantes para uma harmonia intestinal.

As variáveis de interesse são o log das contagens dessas bactérias.

3. Situação do projeto

Até o momento, participaram do projeto 51 indivíduos, sendo que 32 realizaram todos os exames de fezes - desses, 14 ingeriram Yakult e 18 placebo. Dezenove não deram continuidade até o final do acompanhamento mas possuem o exame de fezes inicial e pelo menos um intermediário.

Os pesquisadores apresentaram uma análise de variância (ANOVA) com 1 fator (tempo de observação) com medidas repetidas, para cada tipo de bactéria e cada um dos grupos (Yakult e placebo) separadamente. Foram considerados três períodos em que foi observado o log da contagem da bactéria (variável resposta): no exame inicial, a média nos exames intermediários e após 1 semana da cura da infecção. Também foram feitos gráficos de perfis e comparações múltiplas pelo método de Tukey.

4. Sugestões do CEA

Recomenda-se que após construir os gráficos de perfis individuais¹, os indivíduos que apresentarem observações discrepantes sejam investigados, pois caso sejam dados que foram digitados ou medidos incorretamente devem ser retirados do estudo. Observações que foram afetadas por fatores que não representem os objetivos do estudo ou não tenham sido controlados devem ser avaliadas, e caso se encontre um motivo, deve-se eliminá-las para não incorrer em comparações de quantidades que não tenham a mesma natureza ou adicionar vícios ao estudo.

Ao invés de comparar médias do log da contagem das bactérias nos 3 instantes - inicial (*I*), intermediário (*M*) e final (*F*) -, pode-se considerar também duas outras possibilidades para variável resposta:

$$M - I \text{ e } F - I \quad \text{ou} \quad \frac{M - I}{I} \text{ e } \frac{F - I}{I}.$$

No primeiro caso, estamos considerando como variável resposta a diferença do log no instante médio para o inicial e a final em relação ao inicial. Isso implica que estamos comparando a variação do log das médias no instante intermediário em relação ao inicial, em relação à variação do log das médias no instante final em relação ao inicial. Já no segundo caso, ao invés de compararmos as variações absolutas estamos comparando as variações percentuais. Em ambos os casos estamos considerando na análise a magnitude inicial do indivíduo, pois ela poderia estar influenciando nos resultados das comparações se utilizássemos simplesmente as médias em cada instante.

Seria mais adequado ao invés de se fazer uma ANOVA com medidas repetidas para cada grupo, analisar todos os dados conjuntamente considerando grupo como um novo fator, ou seja, uma ANOVA com um fator (tempo de observação) de repetição e outro fator hierárquico (grupos, ver Neter et al, 1996). Afinal, o objetivo do estudo é a comparação dos dois grupos, que não foi realizada, na análise apresentada. Essa análise pode ser realizada usando a função Repeated Measures no SPSS 10.0.

¹ São gráficos onde cada linha representa um indivíduo, o eixo horizontal são os períodos e o vertical a variável resposta de interesse.

Um modelo que pode ser mais adequado pela presença de valores faltantes é o modelo de efeitos aleatórios (Diggle et al, 1994). Essa análise pode ser feita usando a função PROC MIXED do programa SAS versão 8.0.

Deve-se considerar a hipótese de se utilizar como covariável o número de dias de enfermidade antes do primeiro exame, pois segundo a pesquisadora, essa variável pode afetar os resultados.

Outras covariáveis que talvez influam no estudo e devem ser controladas são: número de dias que o indivíduo tomou o antibiótico antes de começar a tomar o Yakult ou placebo, idade do paciente (contínua ou em categorias), tipo de doença e/ou grau de internação e local (Hospital Universitário ou creche).

Adicionalmente, uma outra análise que pode ser feita é a análise de sobrevivência (Kleinbaum, 1996). Nela a variável resposta seria o tempo até a cura do paciente. Pode ser que no momento da cura, não sejam detectadas diferenças significativas no log da contagem das bactérias, mas, no entanto, um dos grupos esteja chegando até a cura mais rapidamente que o outro. Vários programas estão disponíveis para realizar essa análise: SPSS versão 8.0, SAS versão 8.0, S-Plus 2000 e R 1.5.0. O R pode ser obtido gratuitamente no site <http://www.r-project.org>.

Como o prazo de término do doutorado está chegando ao final (dezembro de 2002), sugerimos tentar ampliar a amostra o máximo possível até o início de julho deste ano. O trabalho pode ser inscrito para participar da triagem dos projetos que serão analisados no segundo semestre de 2002.

Referências bibliográficas:

DIGGLE, P., LIANG, K. e ZEGER, S. L. (1994). **Analysis of Longitudinal Data**. New York: Oxford. 253p.

KLEINBAUM, D. G. (1996). **Survival Analysis: a self-learning text**. New York: Springer. 324p.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIN, C. J. e WASSERMAN, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. Chicago: Irwin. 1408p.