ISSN 2448-3877

SBAC

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

Brazilian Journal of Clinical Analyses

Volume 51 - Nº 01 | Ano 2019

PNCQ conquista a Acreditação, segundo os requisitos da norma ABNT NBR ISO 17034:2017 como **Produtor de Material de Referência Certificado.**

Essa Acreditação constitui a expressão formal do reconhecimento da competência do PNCQ para a produção dos Materiais de Referência Certificados, conforme o escopo de Acreditação.


Certificado de Acreditação

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE LTDA - PNCQ
Programa Nacional de Controle de Qualidade Ltda. - PNCQ
Rua Vicente Licínio, 191 – Tijuca – Rio De Janeiro – RJ

Coordenação Geral de Acreditação

O PNCQ é acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO como Produtor de Material de Referência em conformidade com a ABNT NBR ISO 17.034:2017 sob o número 0012

MRC
Material de Referência Certificado

O Material de Referência Certificado do PNCQ é acompanhado por um certificado com valores de propriedade e incertezas definidas.



O PNCQ é pioneiro na produção de MRC no segmento da Bioquímica Clínica.

Estão disponíveis os MRC de Bioquímica: **Ácido Úrico, Cálcio, Cloro, Colesterol, Creatinina, Glicose, Magnésio, Potássio, Sódio, Triglicerídeos e Ureia.**

PNCQ®
Programa Nacional de Controle de Qualidade
Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Tel/Fax: 55 (21) 2569 - 6867
e-mail: pncq@pncq.org.br
Rua Vicente Licínio, 191 - Tijuca - Rio de Janeiro/RJ
CEP: 20270-340

www.pncq.org.br

Nossas **Certificações:**

O PNCQ é acreditado pela Cgcre do INMETRO como Provedor de Ensaio de Proficiência em conformidade com a ISO/IEC 17043 sob o número 0013

O PNCQ é acreditado pela Cgcre do INMETRO como Produtor de Material de Referência em conformidade com a ABNT NBR ISO 17034:2017 sob o número 0012

Habilitação ANVISA REBLAS Provedor de Ensaio de Proficiência

BPF Certificado ANVISA Boas Práticas de Fabricação

Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a ABNT NBR ISO 9001:2015 sob o número 23.008/04

Volume 51/*Volume 51*

RBAC
Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

Número 1/*Number 1*

Sumário/*Contents*

EDITORIAL/*EDITORIAL*

4 Personagem da História da Saúde V: Robert Koch
Personalities of History of Health V: Robert Koch
Neufeld PM

ARTIGO DE REVISÃO/*REVIEW*

9 Etiologia e epidemiologia da *tinea capitis:* relato de série de casos e revisão da literatura
Etiology and epidemiology of tinea capitis*: case-serie report and literature review*
Silva CS, Neufeld PM, Gouvêa EH, Abreu PA

17 The pathways of cell cycle regulation in retinoblastoma
As vias de regulação do ciclo celular em retinoblastoma
Freitas RM

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO/*UPDATE*

25 Febre amarela
Yellow fever
Silva AC, Araújo CMC, Barbosa MPG, Frota NQ, Sá PBS, Sousa TL, Timbó VS, Texeira AB

ARTIGO ORIGINAL/*ORIGINAL ARTICLE*

29 Perfil de resistência, etiologia e prevalência de patógenos isolados em uroculturas de gestantes atendidas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis, Rio Grande do Sul
Resistance profile and prevalence of isolated pathogens from urine cultures of pregnant women attended in a clinical analysis laboratory in the Veranópolis city, Rio Grande do Sul
Pancotto C, von Ameln Lovison O, Cattani F

34 Avaliação microscópica do sedimento urinário no exame de urina de rotina: comparação entre dois métodos
Microscopic evaluation of urinary sediment on routine urinalysis: comparison between two methods
Batista DRMR, Lima APD, Santos GN, Martins RR, Silbiger VN, Ururahy MAG

40 Etiologia e perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados de hemoculturas no Hospital das Clínicas da UFPE no período de janeiro a dezembro de 2014
Etiology and resistance profile of microorganisms isolated from blood cultures at the University Hospital of UFPE in the period from january to december 2014
Oliveira WV, Santos WS, Gomes BS, Lima JLC

46 Sepse neonatal - perfil microbiológico e sensibilidade antimicrobiana em um hospital no Nordeste do Brasil
Neonatal sepsis - microbiological profile and antimicrobial sensitivity in a hospital in the Northeast of Brazil
Sousa NA, Coelho CGV, Mesquita CHS, Pires FGB, Rosa PB, Brito ILP

Volume 51/*Volume 51*

RBAC
Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

Número 1/*Number 1*

Sumário/*Contents*

52 Influência do tempo de centrifugação em testes de coagulação: tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial
Influence of the centrifuge time in coagulation tests: prothrombin time and partial thromboplastin time
Oliveira BR, Cruz BR, Moss MF, Borato DCK

58 A importância da análise sedimentoscópica diante dos achados físico-químicos normais no exame de urina
The importance of urinary sediment analysis accompanying normal physicochemical test findings
Nóbrega BP, Lima LJL, Fonseca DV, Tenório APO, Tenório PP, Lopes MR

65 Análise comparativa da técnica de baciloscopia no diagnóstico da tuberculose pulmonar frente ao GeneXpert em amostras de pacientes da cidade de Recife, Pernambuco
Comparative analysis of the bacilloscopy technique in the diagnosis of pulmonary tuberculosis against GeneXpert in samples of patients in the city of Recife, Pernambuco
Silva NS, Almeida KRH, Medeiros Neto CA, Araújo AA, Oliveira SR

70 Avaliação do controle glicêmico por meio da A1c, glicemia média estimada e glicemia de jejum em pacientes diabéticos
Evaluation of glycemic control by A1c, estimated average glycemia and fissue glycemia in diabetic patients
Freitas DHF, Dias MC, Costa SHN, Silva AMTC

76 Validação do teste sorológico para toxoplasmose em papel filtro
Validation of serological test for toxoplasmosis in filter paper
Oliveira SR, Oliveira KR, Silveira MB, Rezende HHA, Nascente FM, Castro AM, Avelar JB

COMUNICAÇÃO BREVE/*SHORT COMMUNICATION*

81 *Efetividade da administração de Omalizumabe para tratamento de pacientes com urticária crônica espontânea*
Effectiveness of Omalizumabe administration for treatment of patients with spontaneous chronic urticaria
Souza DL, Muniz JP, Sakae TM, Menezes MM

87 **INSTRUÇÕES AOS AUTORES/*INSTRUCTIONS FOR AUTHORS***

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

Editor Emérito/*Honorary Editor*
Mateus Mandu de Souza (RJ)

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

RBAC
Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

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

Volume 51 - Número 1 - 2019
Edição online - ISSN 2448-3877

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

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

DIRETORIA EXECUTIVA/*EXECUTIVE BOARD*

Luiz Fernando Barcelos (RS)
Presidente/*President*

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

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

Mauren Isfer Anghebem (PR)
Secretária/*Secretary*

André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)
Tesoureiro/*Treasurer*

Paulo Aparecido Brandão Pinto (SP)
Tesoureiro Adjunto/*Assistent Treasurer*

Conselho Fiscal/*Fiscal Board*
Titulares/Holders
Vanderlei Eustáquio Machado (MG)
Alverne Passos Barbosa (GO)
Jurandi David da Silva (PE)

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

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

Afiliações/*Affiliations*

ISQua · IFCC · Clinical and Laboratory Standards Institute · Confederation Latinoamericana de Bioquímica Clínica · Asociación Mercosur de Normalización · ONA · ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

Comitê Editorial/*Editorial Board*

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

Citologia Clínica/*Clinical Citology*
Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Carlos Eduardo de Queiroz Lima (PE), Rita Gorete Amaral (GO), Alexandre Sherlley Casimiro Onofre (SE), Silvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade/*Quality Control*
José Abol Corrêa (RJ), Luiz Fernando Barcelos (RS), Mateus Mandu de Souza (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Gabriel de Souza Lima Oliveira (SP)

Endocrinologia/*Endocrinology*
Carlos Alberto Camargo (SP), Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia/*Toxicology*
Regina Helena Queiroz (SP), Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia Clínica/*Clinical Microbiology*
Antônio Márcio Lopes (MG), Raimundo Diogo Machado (RJ), Estevão José Colnago (RJ), Amauri Braga Simonetti (RS), Cássia Maria Zoccoli (SC), Carmen Paz Oplusti (SP), Raissa Mayer R. Catão (PB)

Imunologia Clínica/*Clinical Immunology*
Mateus Mandu de Souza (RJ), Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira (SP), Adelaide José Vaz (SP), Silvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto Pucca (SP)

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

Micologia Clínica/*Clinical Micology*
Paulo Murillo Neufeld (RJ), Maria José Gianini (SP), Regina Célia Candido (SP), Rosane Rhan (MT)

Biologia Molecular/*Molecular Biology*
Mario Hiroyuki Hirata (SP), Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Marcelo Ávilla Mascarenhas (RS), Kelly Melo (SP), Maria Elizabeth Menezes (SC)

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

Entidades mantidas pela SBAC
Entities maintained by the SBAC

PNCQ – Programa Nacional de Controle de Qualidade/*National Program of Quality Control*
Coordenador/*Coordinator:*
Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

SNA / DICQ – Sistema Nacional de Acreditação/ *National System of Acreditation*
Coordenador/*Coordinator:*
André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)

CEPAC – Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas
Post Graduation Center
Coordenadora/*Coordinator:*
Maria Elizabeth Menezes (SC)

CB-36 – ABNT
Superintendente/*Superintendent:*
Humberto Marques Tiburcio (MG)

CSM-20
Coordenador Técnico/*Technical Coordinator*
Luiz Fernando Barcelos (RS)

Comissões Institucionais/
Institutional Comissions

Coordenador Geral/*General Coordinator*
Luiz Fernando Barcelos (RS

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

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

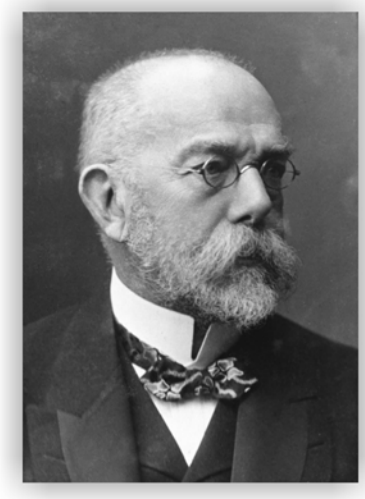
Ensino/*Education*
Paulo Murillo Neufeld (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Mateus Mandu de Souza (RJ)

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

Personagem da História da Saúde V: Robert Koch

Personalities of History of Health V: Robert Koch

Robert Heinrich Herman Koch foi um microbiologista alemão, nascido em 11 de dezembro de 1843, nas montanhas altas de Harz, em Clausthal, em Hanover, na região alemã da Baixa Saxônia. Era o terceiro filho de Mathilde Julie Henriette Biewend (1818-1871) e Hermann Koch (1814-1877), que tiveram 13 filhos, 11 homens e duas mulheres. Seu pai era engenheiro de mineração e, juntamente com Alfred Nobel, participou dos primeiros testes de explosão com nitroglicerina, nas montanhas onde Koch nascera. Em 1867, Koch casou com Emmy Adolfine Josephine Fraatz, filha de um pastor evangélico de sua cidade natal, nascendo, em 1868, sua única filha, Gerttrude Koch. Em 1893, divorciou-se de Emmy Fraatz, casando com Hedwig Freiberg (1872-1945), uma jovem atriz de teatro.



Robert Koch (1843-1910)

Koch foi considerado uma criança prodígio, já que, aos 5 anos de idade, aprendeu a ler sozinho, por meio de jornais trazidos por seu pai. Seus estudos iniciais foram realizados no ginásio de Clausthal, tendo sido bastante atuante tanto em sua vida escolar quanto desportiva. Durante os anos de infância e adolescência, acompanhava seu pai em longos passeios e viagens, o que desenvolveu em Koch um vívido interesse pelas ciências naturais. Uma figura importante na vida de Koch foi seu tio materno Eduard Biewend, que também estimulou seu interesse pela natureza, por coleções de insetos e outros animais, além de tê-lo introduzido no mundo da fotografia.

Sua vida profissional teve início em 1862, aos 19 anos, quando se matriculou na Universidade de Göttingen, para estudar medicina. Em 1866, graduou-se com *maxima cum laude.* A Universidade de Gottingen era um local onde lecionavam importantes nomes da medicina da época e que tiveram uma profunda influência sobre o jovem estudante Robert Koch, como o patologista Wilhelm Krause, o fisiologista Geoge Meissner, o químico Friedrich Wöhler e o histologista e anatomista Jakob Henle. Com a orientação de Krause, Koch levou a cabo seus estudos sobre a inervação do útero e, sob a supervisão de Meissner, estudou o ácido succínico, redundando em sua tese de graduação. Henle, com sua teoria do *Contagium Animatum*, que propunha serem as doenças causadas por entidades vivas transmissíveis, impactou cientificamente Koch de forma indelével. Em decorrência desse intenso convívio acadêmico, aos 22 anos, Koch publicou dois substanciais artigos. Em 1865, ainda como estudante, ganhou um prêmio pela sua dissertação

Recebido em 12/06/2019
Aprovado em 12/06/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900863

acerca da inervação uterina. Nesse mesmo ano, foi indicado para o cargo de assistente do Museu de Patologia da universidade onde estudava, o que lhe deu grande experiência em patologia e microscopia. A premiação que venceu permitiu que Koch fosse até Hanover conhecer o fisiopatologista mais renomado da Alemanha, Rudolf Virchow. Inclusive, por um curto intervalo de tempo, Koch estudou com Virchow em Berlim.

Após formado, em 1866, Koch foi trabalhar como médico assistente em diversas cidades provinciais, incluindo Hamburg. Nessa cidade, no entanto, Koch ficou apenas três meses, seguindo posteriormente para Langenhagen, onde trabalhou como médico num hospital psiquiátrico até 1868. Após o nascimento de sua filha, Koch deixou Langenhagen e se transferiu para Rakwitz, desenvolvendo uma prática médica de sucesso. Quando a Guerra Franco-Prussiana irrompeu, em 1870, Koch se alistou como médico-cirurgião, aproveitando a oportunidade do conflito para estudar as doenças que acometiam aos soldados no front. Ao dar baixa, em 1872, assumiu a posição de *Kreisphysikus* (médico distrital), na cidade de Wöllstein. Entre 1872 e 1880, Koch praticou medicina geral, bem como inspeção sanitária e controle de epidemias. Nessa cidade, no dia do seu aniversário, sua esposa o presenteou com um microscópio. Isso o estimulou a montar um laboratório rudimentar num quarto de sua casa, com o microscópio presenteado, um micrótomo, uma estufa e uma câmara escura, e a começar a investigar sobre as doenças infecciosas. A partir desse momento, Koch iniciou seu trabalho revolucionário na bacteriologia e imunologia médica.

Com um microscópio mais potente, adquirido pelo próprio Koch, ele deu início às suas pesquisas sobre o Antraz (Carbúnculo), que era uma doença prevalente em animais de produção naquela época. Assim, ainda em Wöllstein, em 1876, Koch descreveu o ciclo biológico do *Bacillus anthracis*, provando que esse organismo era o agente causal do Antraz. Em seu estudo, Koch adaptou o método do botânico Ferdinand Cohn, cultivando o *Bacillus anthracis* por muitas gerações no laboratório, demonstrando seu estágio de esporo e injetando-o em cobaias saudáveis. Koch inoculou cutaneamente o sangue de um animal enfermo, que havia sido necropsiado, em um animal sem a doença, que a desenvolveu em todas as suas fases clínicas. Koch apresentou seus resultados a Cohn, na Universidade de Breslau, que concordou em reproduzir o experimento no Instituto de Fisiologia de Plantas. Dessa forma, independentemente, Koch e Cohn desenharam o que viram no microscópio e anotaram o que observaram no teste com animais (camundongos e coelhos), encontrando os mesmos resultados acerca do agente causal e da doença. Uma contribuição importante ainda foi dada pelo patologista Julius Cohnheim, que ensinou Koch a corar as bactérias de seu estudo. A pesquisa foi publicada em 1876, no *Jornal de Botânica*, do qual Cohn era editor-chefe, sendo a primeira evidência direta da relação entre a presença tecidual de uma bactéria e a doença por ela desencadeada. Koch foi depois convidado a se estabelecer em Breslau para continuar suas pesquisas em bacteriologia, e os anos em que esteve radicado nessa cidade (1877 a 1880) foram extremamente fecundos e produtivos.

As descobertas sobre bactérias e suas patologias continuaram com a identificação de *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. isolados de feridas infecciosas em animais e *Vibrio cholerae*. Koch identificou vários estados da doença bacteriana como septicemia, gangrena, abscesso e advogava a teoria de que as bactérias existiam como espécies distintas e que cada uma produzia uma única síndrome clínica. Assim, segundo ele, somente estudando um patógeno específico é que se poderia entender uma doença específica.

Nesse período de pesquisa com o Antraz, Koch desenvolveu uma técnica refinada de microscopia, bem como um elaborado desenho de inoculações em

animais de laboratório para o estudo das etiologias e patologias das doenças infecciosas, o que permitiu visualizar os microrganismos, isolá-los e mantê-los artificialmente em meios de cultura e estudar sua patogenia e lesões decorrentes da destruição tecidual. Koch também estabeleceu os princípios da moderna pesquisa microbiológica, introduzindo lâminas de microscopia e lamínulas, exame por gota suspensa, fixação e coloração de bactérias, meios de cultura líquidos e sólidos, iluminação artificial, lentes de imersão e condensador em microscópios, acoplamento de máquina fotográfica em microscópios para obtenção de fotomicrografias e de técnicas de desinfecção/esterilização, empregando vapor d'água. Além disso, Koch também se preocupou com o método científico, definindo o tamanho de amostra, utilização de grupos controles e reprodutibilidade de experimentos.

Em 1880, Koch foi nomeado para o Departamento Imperial de Saúde (Kaiserlich Gesundheitsamt), deixando Breslau e indo para Berlim, levando seu método de trabalho microbiológico, adaptado das propostas de Cohn e Cohnheim. Em Berlim, ele se juntou ao *staff* do Departamento Imperial de Saúde, dando continuidade às suas investigações para o estabelecimento de culturas puras, que naquele período eram laboriosas e difíceis de serem obtidas com as técnicas disponíveis. Apesar das inúmeras tentativas de Theodor Albrecht Edwin Klebs e Joseph Jackson Lister, suas técnicas em meio líquido para a obtenção de culturas puras tinham baixo rendimento. No entanto, observando o crescimento fúngico em fatias de batata, Koch percebeu que o crescimento sobre o vegetal exibia colônias isoladas e puras. Desse modo, ele decidiu inocular, em seus meios de cultura sólidos à base de gelatina, as amostras de bactérias que estavam em meios líquidos, obtendo, assim, colônias isoladas e puras, como as observadas nas fatias de batata. Essa técnica de plaqueamento para purificação de culturas, publicada juntamente com as técnicas de incubação e coloração de bactérias, em 1881, tornou-se o fundamento do trabalho microbiológico. Também deram importantes contribuições ao trabalho de Koch e à microbiologia, alguns de seus assistentes, como Walter Hesse, que introduziu o ágar como meio de cultura sólido, e Julius Petri, que desenvolveu um recipiente com tampa (Placa de Petri), onde o meio sólido poderia ser vertido, ficando protegido de contaminação. Relativamente à desinfecção e esterilização, Koch observou, empregando diversas substâncias químicas, que algumas delas inativavam definitivamente e outras inibiam temporariamente o crescimento microbiano. Essa observação foi importante para construção da ideia do trabalho asséptico em microbiologia, bem como para os conceitos de droga bactericida e bacteriostática, que seriam estabelecidos na futura era dos antibióticos.

Em 1881, Koch participou, em Londres, do VII Congresso Médico internacional, apresentando suas técnicas microbiológicas, as quais fizeram enorme sucesso, com importantes comentários de personalidades da pesquisa microbiológica da época, como Louis Pasteur e Joseph Lister. Nesse congresso, a tuberculose foi um dos principais assuntos tratados e Koch retornou para Berlim firmemente determinado a dar sua contribuição para o entendimento desse que era um dos mais antigos flagelos da humanidade. Apesar de estudos anteriores sobre a tuberculose já terem definido que se tratava, de fato, de uma doença infecto-contagiosa, faltava ainda a demonstração do agente. Começando seus experimentos em agosto de 1881, Koch, em menos de oito meses, apresentou seus exitosos resultados sobre essa enfermidade, na Sociedade de Fisiologia de Berlim, em 24 de março de 1882. Ao abrir sua conferência, disse Koch:

"Em função das minhas inúmeras observações, considero provado que, em todos os casos de tuberculose, em pessoas e animais, é encontrado o que chamei de bacilo da tuberculose. Um microrganismo que, através de suas características peculiares, diferencia-se de todas as outras bactérias conhecidas."

Com sua pesquisa em bacteriologia consolidada no Departamento Imperial de Saúde Pública, Koch desenvolveu um método que continha coloração (modificada de Paul Ehrlich) para visualização tecidual do bacilo da tuberculose, cultura, empregando meio de cultivo sólido dentro de placas idealizadas por Julius Petri, e sequência de etapas e procedimentos propostos por Jakob Henle para o isolamento em cultura pura do agente etiológico.

Nesse ano de 1882, Koch, em artigo sobre o bacilo da tuberculose, publicou seus Postulados modificados, cujos estudos foram iniciados com os experimentos com o Antraz, onde foram empregados os postulados formulados por Henle, em 1840, e adaptados por ele, em 1877. A enunciação final de seus Postulados, todavia, foi apresentada à comunidade científica, em 1884 e em 1890, em conferências e publicações. Os Postulados de Koch foram aplicados para estabelecer a causalidade da tuberculose, tornando-se, a partir de então, de amplo uso para um grande número de doenças infecciosas. Nesse sentido, a etiologia de uma dada infecção poderia ser determinada da seguinte forma:

1. O patógeno deve ser isolado de animais doentes e nunca de animais saudáveis;

2. O patógeno deve ser recuperado do corpo do animal doente em cultura pura;

3. O patógeno isolado em cultura pura deve reproduzir a doença ao ser inoculado em um animal susceptível;

4. O mesmo patógeno inoculado em um animal susceptível deve ser isolado a partir das lesões em cultura pura.

Em 1883, Koch foi enviado ao Egito como líder da Comissão Alemã do Cólera, para investigar um surto naquele país. No Egito, Koch descobriu que o agente dessa enfermidade era o vibrião colérico e mostrou sua relação com a doença e seus modos de transmissão. Além de determinar a etiologia, ele também obteve culturas puras dessa bactéria, levando-as para estudos na Alemanha. Estudando o cólera, Koch foi ainda à Índia. Como prevenção e controle da doença, Koch advogava a necessidade de uma estreita vigilância sobre a água de abastecimento e o esgoto sanitário. Outras doenças investigadas por Koch na Itália, África do Sul, Índia, Indonésia incluíram a malária, malária grave (quadro de febre hemoglobinúrica), peste, peste bovina e tripanossomíase.

Devido à experiência adquirida na prática médica e microbiológica e em viagens e intercâmbios, em 1885, Koch foi indicado para o cargo de professor de bacteriologia na Universidade de Berlim e, em 1891, foi proposta a construção de um Instituto que levaria seu nome, para a realização de suas pesquisas e experimentos. Importa mencionar que Koch foi uma personalidade que influenciou e congregou diversos alunos, assistentes e outros pesquisadores a seguirem investigando e estudando a bacteriologia, e nomes como Gaffky, Eberth, Löffler, von Behring, Pfeiffer, Welch, Petri, Kitasato, Ehelich e Wasserman ficaram historicamente ligados à pesquisa de Koch. Gram, Ziehl e Neelsen foram outros importantes nomes igualmente associados ao trabalho de Koch. Um verdadeiro exército de "caçadores de micróbios" surgiu incentivados pelo exemplo de Koch e dezenas de bactérias foram descritas a partir do estudo de doenças como gonorreia, tétano, difteria, tifo, pneumonia e peste bulbônica, entre outras.

Em 1890, durante o X Congresso Médico Internacional, em Berlim, Koch anunciou ter encontrado um inóculo que poderia proteger e até mesmo curar a tuberculose. De acordo com Koch, esse inóculo, chamado de tuberculina, poderia ser empregado como uma terapia vacinal. Apesar de suas observações, a tuberculina não era, de fato, eficiente na propedêutica da tuberculose como ele, inicialmente,

divulgara. O fracasso da tuberculina no tratamento da tuberculose, por falta de rigor científico de Koch, levou a comunidade científica a criticá-lo duramente, o que abalou seu prestígio acadêmico dentro e fora da Alemanha. A tuberculina, no entanto, seria usada, no futuro, como prova diagnóstica em procedimentos cutâneos e não para tratamento da tuberculose, que só se estabeleceu com o descobrimento dos antibióticos, por Alexander Fleming, em 1939.

Um outro equívoco de Koch foi pensar que a tuberculose bovina não era perigosa para humanos. Em seus estudos iniciais, em 1882, Koch considerou que as bactérias da tuberculose humana e bovina eram organismos diferentes. Em 1884, contudo, reconsiderou e determinou que eram organismos idênticos e que, apesar disso, não traziam maiores riscos à população humana. Ele expos essa crença em muitas conferências na Inglaterra e Estados Unidos, o que fez com que os médicos e a vigilância sanitária dos países negligenciassem o leite retirado de vacas com tuberculose, permitindo que fossem consumidos por crianças e adultos. Em alguns poucos anos, um grande contingente de pessoas adoeceu, por ingestão de leite contaminado. Em 1898, entretanto, Theobald Smith e a Real Comissão Inglesa demonstraram que os bacilos não eram iguais, bem como estabeleceram a relação do leite contaminado com o bacilo de origem bovina e a doença em humanos. Disso decorreu a necessidade de se controlar essa zoonose, sendo, então, proposta, por vários pesquisadores e instituições de saúde pública, a pasteurização do leite e a erradicação da tuberculose bovina.

Em dezembro de 1905, Koch foi laureado com o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por seus estudos e pesquisas sobre a tuberculose. Devido ao intenso trabalho e as inúmeras viagens que fazia, sua saúde veio se deteriorando com o tempo. Em decorrência do agravamento de seu estado cardiológico, em 27 de maio de 1910, Koch sofreu um infarte fulminante, no terraço de um hotel em Baden-Baden, na Alemanha. Conforme sua vontade, foi cremado e suas cinzas depositadas no Instituto de Doenças Infecciosas de Berlim.

BIBLIOGRAFIA

- Akkermans R. Historical profile: Robert Heinrich Herman Koch. Lancet Respir Med. 2014; 2(4):264-5.
- Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the golden age of bacteriology. Int J Infect Dis. 2010;14(9):e744-51.
- Daniel TM. Robert Koch and pathogenesis of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2005;9(11): 1181-2.
- Grzybowski A, Pietrzak K. Robert Koch (1843-1910) and dermatology on his 171st birthday. Clin Dermatol. 2014;32(3):448-50.
- Lakhani SR. Early clinical pathologist: Robert Koch (1843-1910). J Clin Pathol. 1993;46(7):596-8.
- Lakhtaka R. The legacy of Robert Koch: Surmise, search, substantiate. Sultan Qaboos Univ Med J. 2014;14(1):e37-41.
- Münch R. Robert Koch. Microbes Infect. 2003;5(1):69-74.
- Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. Thorax. 1982; 37(4):246-51.
- Schutz MG. Robert Koch. Emerg. Infect Dis. 2011;17(3):548-9.

Paulo Murillo Neufeld, PhD
Editor-Chefe da Revista Brasileira de Análises Clínicas

Etiologia e epidemiologia da *tinea capitis*: relato de série de casos e revisão da literatura

Etiology and epidemiology of tinea capitis*: case-serie report and literature review*

Carolinne Serafim da Silva[1]
Paulo Murillo Neufeld[2]
Emanuela Heiderick Gouvêa[3]
Paula Alvarez Abreu[3]

Resumo
Dermatofitose é uma micose superficial, causada por fungos filamentosos denominados dermatófitos, que são capazes de degradar estruturas queratinizadas. Os agentes dessas infecções em humanos pertencem a três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton.* O objetivo deste trabalho é revisar os estudos epidemiológicos e relatos de casos de *tinea capitis*, a partir de artigos publicados entre 2000 e 2018. Com base nos dados analisados, o gênero masculino foi o mais afetado pela *tinea capitis* e a faixa etária mais relatada foi a de indivíduos menores de 10 anos. As principais espécies isoladas foram: *T. tonsurans* e *M. canis*, sendo o primeiro mais encontrado nas regiões norte, nordeste e centro-oeste, e o segundo, nas regiões sudeste e sul do Brasil. Nos relatos de casos foram reportadas lesões com diferentes características, sendo algumas mais inflamatórias, eritematosas, com pústulas, placas de alopécia ou descamativas do que outras. Dor e prurido foram sintomas observados em alguns casos. A griseofulvina e os derivados azólicos foram os principais fármacos empregados na terapia, ainda que em associação em alguns casos. As avaliações dos tratamentos empregados nos casos de *tinea capitis* devem ser minuciosamente realizadas, visto que há relatos de casos em que a reposta terapêutica não é eficiente, agravando as lesões e prolongando o tempo de tratamento.

Palavras-chave
Tinea capitis; epidemiologia; etiologia

INTRODUÇÃO

Dermatofitoses são micoses superficiais, causadas por fungos filamentosos denominados dermatófitos, que são capazes de degradar estruturas queratinizadas como pêlos, unhas e pele. Os agentes etiológicos associados a essa infecção em humanos pertencem a três gêneros principais, a saber: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*.[1] Transmitida por contágio direto ou indireto, as dermatofitoses são de ocorrência mundial e consideradas o terceiro distúrbio de pele mais frequente em crianças menores de 12 anos e o segundo mais frequente na população adulta.[1,2]

O quadro clínico das dermatofitoses inclui lesões tipicamente cutâneas, conhecidas como *tineas*, sendo a sua designação atribuída de acordo com a área afetada: *tinea capitis* (região do couro cabeludo), *tinea corporis* (região do corpo/pele glabra), *tinea manum* (região das mãos), *tinea cruris* (região inguinal), *tinea pedis* (região dos pés) e *tinea unguium* (unhas das mãos e dos pés).[3]

A *tinea capitis* é uma dermatofitose que acomete o couro cabeludo, sobrancelhas e cílios, afetando, principalmente as crianças.[4] Esses processos são ocasionados, basicamente, por espécies de fungos antropofílicos, ou seja, que parasitam, preferencialmente, a queratina dos seres humanos. Entre essas espécies, destacam-se *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*, entretanto, espécies como *Microsporum canis*, apesar de zoofílicas, também podem acometer os humanos.[5,6] Inicialmente, essa condição se manifesta como uma lesão circular, semelhante a um anel, de coloração avermelhada e escamosa, acompanhada de alopécia, que pode se tornar agudamente inflamada, formando lesões ulceradas.[7]

A transmissão pode ocorrer por relação direta com pessoas e animais infectados ou por meio de objetos e contato

[1]*Fundação Técnico-Educacional Souza Marques – Rio de Janeiro-RJ, Brasil.*
[2]*Laboratório de Micologia Médica e Forense, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Rio de Janeiro-RJ, Brasil.*
[3]*Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Campus Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Macaé-RJ, Brasil.*

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 04/10/2018
Artigo aprovado em 05/10/2018
DOI: 10.21877/2448-3877.201800781

com locais onde os esporos dos fungos tenham sido depositados, e tanto crianças como adultos podem ser portadores assintomáticos.[8] O diagnóstico primário é baseado na microscopia ótica, sendo a cultura necessária para a identificação definitiva do agente etiológico e para a instituição do tratamento específico com antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos.

Relativamente à sua distribuição geográfica mundial, os dermatófitos são microrganismos oriundos, fundamentalmente, de grandes centros urbanos. Uma avaliação epidemiológica envolvendo 16 países na Europa demonstrou que 35% a 40% dos indivíduos analisados apresentavam infecção dermatofítica no couro cabeludo. Outro estudo, realizado com crianças em creches, nos Estados Unidos, revelou que 22% a 50% delas apresentavam infecção por dermatófitos também nesse sítio anatômico.[9,10]

Na América do Sul, um estudo realizado na cidade de Valparaíso, Chile, observou que, dentre os 1.004 pacientes diagnosticados com micoses superficiais, as dermatofitoses eram as mais prevalentes.[11] Em 2010, uma pesquisa realizada na Venezuela, com crianças de uma unidade escolar, constatou que o *Microsporum canis* e o *Trichophyton rubrum* foram as espécies mais isoladas de *tinea capitis*.[12]

As dermatofitoses assumem especial importância em saúde pública dada a sua elevada prevalência e fácil disseminação por contato direto com humanos ou animais infectados ou indireto com objetos contaminados, além de longos períodos requeridos para o tratamento e a tendência de desenvolvimento de resistência aos fármacos de uso clínico. Neste aspecto, o conhecimento sobre a patogênese dos dermatófitos se faz importante,[13] assim como o entendimento sobre a epidemiologia sobre suas infecções. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi revisar os estudos epidemiológicos sobre *tinea capitis* em relação aos seus agentes etiológicos e à população afetada e discutir a importância clínica do tema para o Brasil com a apresentação de uma série de casos dessa condição.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada envolveu uma busca realizada nas bases de dados *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e Google Acadêmico (*Scholar Google*). Para obtenção das informações, foram considerados artigos publicados em Inglês e Português, no período de 2000 até 2018, utilizando-se os descritores: *tinea capitis* e epidemiologia.

As referências obtidas foram analisadas, excluindo-se aqueles artigos que não se vinculavam à proposta do estudo, sendo incluídos aqueles que tratassem de estudos epidemiológicos de *tinea capitis* ou relatos de casos no Brasil. Ao final da pesquisa, vinte artigos foram considerados relevantes para a revisão, sendo 16 estudos epidemiológicos específicos de *tinea capitis* e cinco relatos de caso.

Na revisão dos trabalhos científicos, foram analisados a epidemiologia da micose, as principais espécies de fungos envolvidas, o local e período em que foram identificados os casos, o sexo dos pacientes e os métodos de diagnóstico empregados. Em relação aos estudos de casos, foram avaliados os agentes, as características dos pacientes, o tipo de lesão, o método de diagnóstico e o tratamento quimioterápico e, a partir desse conjunto de informações, foi realizada uma comparação entre os estudos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos de *tinea capitis*

As investigações foram realizadas em amostras de couro cabeludo de casos suspeitos de *tinea capitis*, nas regiões sul, sudeste, norte, nordeste e centro-oeste do Brasil, num intervalo de tempo de 1983 a 2017. (Tabela 1). O número de amostras analisadas variou de 11 a 1.332, de acordo com o tempo e local de realização dos estudos. No tocante à distribuição da *tinea capitis,* a prevalência dessa infecção fúngica é variável, pois sua ocorrência depende de características geográficas, como temperatura e umidade, socioeconômicas do local, bem como das particularidades de cada paciente.[14]

Alguns estudos avaliaram um número bastante grande de pacientes como o realizado em Pernambuco, com 1.332 indivíduos, em Porto Alegre com 1.283 pacientes, em Cuiabá com 985, em Botucatu com 596 e em Fortaleza com 534. Estes estudos são bastante importantes para análise sobre a epidemiologia da doença, e, tendo sido realizado em diferentes regiões do Brasil, facilita o entendimento sobre a doença.[14-18]

Na maioria dos artigos revisados foi observado maior número de casos no sexo masculino em todas as regiões. Entretanto, em um estudo no estado do Ceará, dois no Amazonas, um na Paraíba e um em Santa Catarina foram observados mais casos no sexo feminino.[18-22] O sexo masculino, tradicionalmente, é o mais acometido pelas tinhas de couro cabelo e na literatura não há relatos sobre os motivos pelos quais tal grupo de fungo tem incidência maior sobre o sexo masculino, mas hipoteticamente pode estar associado a alguma imunodeficiência ou imunossupressão, ou pelo maior contato com animais infectados.[23- 25]

Nos últimos anos, a prevalência de espécies envolvidas com as dermatofitoses vem mudando, sendo que, quando se consideram as espécies que mais causam infecções em todo o mundo, observa-se um destaque para *T. rubrum* como principal agente de dermatofitoses nas unhas e pele enquanto *que M. canis*, *T. tonsurans* e *T. violaceum* são predominantemente envolvidos em *tinea capitis*.[26,27]

Tabela 1 - Comparação dos estudos epidemiológicos de *tinea capitis* no Brasil

Local	Período	Nº de amostras	Agentes etiológicos	Métodos de diagnóstico	Sexo (%)	Citação
Goiânia GO	Janeiro de 1999 a Julho de 2002	164	*Trichophyton tonsurans* 66,2% *Trichophyton mentagrophytes* 13,6% *Microsporum canis* 10,1% *Trichophyton rubrum* 10,1%	Exame direto (KOH 40%) e cultura em ágar Sabouraud sem antibiótico, ágar Sabouraud com cloranfenicol e Mycosel	Masculino: 57% Feminino: 43%	Dias et al.; 2003
Vitória ES	Setembro a Dezembro de 2009	11	*Microsporum canis* 81,8% *Trichophyton rubrum* 18,2%	Exame direto e cultura em ágar Sabouraud + cloranfenicol + cicloheximida	Masculino: 61% Feminino: 39%	Gütler et al.; 2005
João Pessoa- PB	Outubro de 1999 a Fevereiro de 2000	53	*Trichophyton rubrum* 37,7,8% *Trichophyton tonsurans* 28,3,1% *Microsporum canis* 24,5% *Trichophyton verrucosum* 7,55% *Trichophyton mentagrophytes* 1,9%, Outros 0,05%	Exame direto (KOH 20%) + ágar Sabouraud com cloranfenicol + Mycobiotic ágar	Masculino: 47% Feminino: 52%	Aquino et al.; 2003
Porto Alegre-RS	Agosto de 1998 a Fevereiro de 2006	1.283	*Microsporum canis* 62,2% *Trichophyton mentagrophytes* 18,2% *Trichophyton rubrum* 5,7% *Epidermophyton floccosum* 2% *Trichophyton tonsurans* 0,3% Outros 17,3%	Exame direto (KOH 20%) e em ágar Sabouraud dextrosado + cloranfenicol e Mycobiotic ágar	Não relatou	Aquino et al.; 2007
Recife- PE	Junho a Dezembro de 2005	132	*Trichophyton rubrum* 73,4% *Trichophyton tonsurans* 13,3% *Microsporum canis* 13,3%	Exame direto KOH (20%) e cultura de ágar Sabouraud	Masculino: 51,5% Feminino: 48,5%	Damázio et al., 2006
Itajaí - SC	Janeiro de 2014 a Junho de 2016	131	*Trichophyton mentagrophytes* 90,5% *Microsporum canis* 9,5%	Exame direto (KOH 20%) e ágar Sabouraud dextrosado	Masculino: 45% Feminino: 54%	Fajardo et al., 2017
Manaus AM	Março a Novembro de 2003	228	*Trichophyton tonsurans* 66,677% *Microsporum canis* 100%	Exame direto (KOH 40%) Mycobiotic ágar Sabouraud com cloranfenicol	Masculino: 35,55% Feminino: 64,45%	Oliveira et al; 2006
Fortaleza CE	Junho de 1996 a Dezembro de 1998	534	*Trichophyton rubrum* 49,6% *Trichophyton tonsurans* 34,4% *Microsporum canis* 7% *Trichophyton mentagrophytes* 6,2% *Outros* 2,8%	Exame direto KOH a 30% + tinta Parker+ ágar Sabouraud modificado a 2% de glicose + ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol	Masculino: 42,9% Feminino: 57,1%	Brilhante et al., 2000
Amazonas - AM	Março de 1996 a Novembro de 2005	48	*Trichophyton tonsurans* 85,12% *Trichophyton rubrum* 3,84% *Microsporum gypseum* 3,84% *Trichophyton mentagrophytes* 2,40% *Microsporum canis* 2,40% *Trichophyton sp.* 1,92% *Epidermophyton floccosum* 0,48%	Exame direto (KOH 30%) + ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximida	Masculino: 38% Feminino: 62%	Cortez et al., 2012
Novo Airão AM	Maio de 1995 a Julho de 1997	105	*Trichophyton tonsurans 64,2%* *Trichophyton mentagrophytes* 20,6% *Microsporum canis* 15,2%	Exame direto (KOH a 30%) e cultura em ágar Sabouraud dextrosado	Masculino: 7% Feminino: 23%	Sousa et al; 2001
Cuiabá MT	Março de 2006 a Dezembro de 2010	985	*Trichophyton tonsurans* 70,5% *Trichophyton rubrum* 19,4% *Microsporum canis* 10,1%	Exame direto (KOH a 20%) e cultura em ágar Sabouraud dextrosado	Masculino: 65% Feminino: 35%	Araújo et al.; 2012
Botucatu SP	Janeiro de 1983 a Dezembro de 2003	596	*Microsporum canis* 88,2% *Trichophyton tonsurans* 4,7% *Trichophyton rubrum* 3,3% *Microsporum gypsem* 1,9% *Trichophyton mentagrophytes* 1,6% *Trichophyton spp.* 0,5%	Exame direto (KOH 20%) + ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e actidione	Masculino: 58,2% Feminino: 41,8%	Marques et al.; 2005
Pernambuco	Janeiro de 2014 a junho de 2017	1.332	*Trichophyton* spp. ~70% *Microsporum canis* ~17% Outros ~13%	Exame direto (KOH a 20%) e cultura em ágar Sabouraud dextrosado + cloranfenicol	Masculino: 57,5% Feminino: 42,5%	Silva et al., 2018
São Paulo, SP	Março de 2013 a Maio de 2015	30	*Microsporum canis* 56,6% *Trichophyton tonsurans* 36,8% *Microsporum gypseum* 3,3% *Trichophyton mentagrophytes* 3,3%	Exame direto e cultura (meio e reagentes do exame direto não especificados)	Masculino 64,17% Feminino 35,83%	Veasey et al., 2017

Hidróxido de sódio (KOH) e Agár Sabouraud dextrose (SDA)

Nesta revisão foi observado que as principais espécies associadas à *tinea capitis* foram *T. tonsurans* e *M. canis*, já que foram as espécies mais identificadas nas amostras clínicas positivas para *tinea capitis* na maioria dos estudos (Tabela 1). Secundariamente, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* foram os dois dermatófitos mais encontrados na terceira ou quarta posição. Numa investigação em João Pessoa, *T. verrucosum* foi relatado na quarta posição, representando 10% dos casos estudados.[21]

É importante mencionar que *Trichopphyton* spp. foi o agente mais isolado de amostras de couro cabeludo, em diversos estudos, contudo, dependendo das condições geográficas e do período analisado, as espécies de *Trichophyton* apresentavam variações de prevalência locais. Dentre essas espécies, *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foram os organismos responsáveis pela maior parte das infecções no país, sendo que *T. tonsurans* foi o principal agente em vários estudos nas regiões norte, nordeste e centro-oeste.[16,19,20,28,29] No Sul e no Sudeste do Brasil, todavia, o dermatófito mais isolado foi o *M. canis.*[9,15,17,31]

Soares e colaboradores (2017) demonstraram em sua revisão da literatura que *T. tonsurans* tem sido o principal agente identificado causando *tinea capitis*, seguido *M. canis*, sendo que a substituição do *M. canis,* que já foi no passado o principal agente etiológico, parece estar relacionado ao clima, mudanças de hábitos, urbanização e aspectos socioeconômicos.[30]

Conforme pesquisa de Schechtman RC (2015), a temperatura e umidade relativa elevadas condicionam favoravelmente a distribuição geográfica do *T. tonsurans.*[32] A distribuição de *T. tonsurans* é ainda facilitada por sua grande adaptação à queratina do ser humano e capacidade de burlar as defesas inatas do hospedeiro, permanecendo como uma infecção assintomática ou residual com exacerbações clínicas eventuais.[17,33,34]

Dentro do gênero *Microsporum* tem sido relatado que *M. canis* é o principal agente de *tinea capitis* nas regiões sul e sudeste do Brasil. Por se tratar de uma espécie zoofílica, a infecção pode ser adquirida pelo contato com animais infectados, constituindo cães e gatos os principais reservatórios e fontes de infecção. Relativamente à dermatofitose animal, lesões cutâneas evidentes são observadas com facilidade em cães, entretanto, lesões diminutas ou quadros assintomáticos são mais encontrados em gatos, o que representa uma dificuldade no controle epidemiológico da doença.[27]

Nesta revisão de casos, pacientes com menos de 10 anos foram preponderantes. Segundo Brilhante e colaboradores (2000), os indivíduos menores de 10 anos são os mais susceptíveis às dermatofitoses quando em contato próximo com cães e gatos, ressaltando a transmissão zoonótica nessa faixa etária.[18] No caso da infecção por *T. tonsurans,* por se tratar de uma espécie antropofílica, a transmissão se faz, geralmente, de pessoa-a-pessoa ou por meio de compartilhamento de objetos de uso pessoal.[8]

O estudo micológico para a identificação das espécies de dermatófitos consiste no exame microscópico direto da amostra clínica com hidróxido de potássio (KOH), o que possibilita a visualização de estruturas fúngicas nos fios de cabelos, seguido de cultivo em ágar de Sabouraud dextrosado, para o isolamento dos dermatófitos, permitindo a determinação da espécie fúngica envolvida na infecção. Nos trabalhos aqui avaliados, houve diferenças em relação à concentração de KOH, que variou entre 20% a 40%. Essa faixa de concentração, todavia, está em concordância com aquela (10% a 40%) geralmente preconizada para a observação tecidual de dermatófitos (Tabela 1). O meio de cultivo padrão para o isolamento de dermatófitos é o ágar de Sabouraud dextrosado, apesar de outros meios, como o Ágar Mycosel, terem sido empregados por alguns autores. Esse meio apresenta em sua formulação um antibacteriano (cloranfenicol) e um antifúngico (cicloheximida). O cloranfenicol é utilizado para evitar o crescimento bacteriano indesejado. A cicloheximida, por sua vez, é importante para inibir o crescimento de fungos contaminantes, sem impedir o crescimento dos fungos patogênicos, como os dermatófitos e os dimórficos, o que facilita o isolamento destes fungos em amostra clínica.[29, 30]

Estudos de casos clínicos de *tinea capitis*

Nesta pesquisa, casos clínicos de *tinea capitis* no Brasil foram revisados e diversos hospedeiros foram relatados, tais como recém-nascidos, crianças e adultos. As lesões exibiram diferentes características clínicas com variado quadro inflamatório, acompanhado de eritema, descamação, prurido, alopecia e/ou supuração (Tabela 2). Estudos demonstraram que o tipo e a intensidade da lesão dependem da interação entre os agentes etiológicos e os hospedeiros acometidos. As lesões com características mais inflamatórias estão relacionadas, comumente a espécies zoofílicas, como o *M. canis* e o *T. mentagrophytes*.[8] Por apresentarem características inflamatórias mais evidentes, as espécies zoofílicas provocam lesões extremamente inflamadas, com perda de cabelo e lesão do tipo *Kerion di Celsi*. Já as espécies antropofílicas (*T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* e *M. audouinii*) provocam, em geral, lesões menos agressivas e que tendem à cronicidade.[7]

No caso relacionado a uma criança de 4 meses de idade, a *tinea capitis* causada por um *T. tonsurans* apresentava-se assintomática, o que dificultou o manejo e o controle da infecção nesse paciente. Observou-se uma microepidemia entre os familiares e o fungo foi isolado da residência da família, facilitando a reinfecção.[33] Em crianças e

Tabela 2 - Análise e comparação dos relatos de casos clínicos de *tinea capitis*

Características do paciente	Tipo de lesão	Agente etiológico	Tratamento	O caso se destaca porque...	Citação
Paciente do sexo feminino com 65 anos	Placas de alopecia com pontos negros, reação inflamatória moderada.	*Trichophyton violaceum*	Terbinafina, oxiconazol e shampoo de cetoconazol	Foi o único caso de *tinea capitis* por *T. violaceum* em adulto descrito	Rodrigues et al., 2008
Paciente do sexo feminino, negra, com 5 anos	Lesões com placa de alopecia sem prurido, exame dermatoscópico mostrou pêlos em "vírgula" e cabelos em "saca-rolhas"	*Trichophyton tonsurans*	Itraconazol	Diagnosticar *tinea capitis* independente do agente usando o dermatoscópio que é um método rápido, não invasivo e com baixo custo.	Pinheiro et al.; 2012.
Dois meninos de 6 e 8 anos com lesões no couro cabeludo	Lesões escamosas com placas de alopecia e prurido	*Microsporum audouinii*	Griseofulvina e fluconazol	Primeira vez que o fungo africano foi reportado no Brasil	Brito-Santos et al., 2017
Bebê de 4 meses com lesões no couro cabeludo	Placas de tonsuras circulares, múltiplas, bem delimitadas e pruriginosas	*Trichophyton tonsurans*	Griseofulvina	Se tratar de uma microepidemia familiar, em que o agente estava sendo mantido na residência da família	Salci, et al., 2011
Paciente do sexo masculino com 3 anos de idade	Placa elevada, edematosa, de limites precisos, dolorosa, recoberta por crostas hemáticas na periferia, supurativa e localizada no couro cabeludo	*Microsporum gypseum*	Griseofulvina	A apresentação desse relato visa chamar a atenção pois apesar da baixa incidência de infecção por *Microsporum gypseum* na cidade do Rio de Janeiro, ainda há casos sendo relatados	Melo-Monteiro et al., 2003

lactentes, essa infecção é clinicamente importante por se tratar de indivíduos que apresentam normalmente grande susceptibilidade a infecções fúngicas, e pela possibilidade de disseminação do agente a outras crianças em creches ou mesmo no ambiente familiar.

No relato de *tinea capitis* por *M. audouinii*[35] o caso apresentou relevância pela determinação desse fungo como o agente etiológico, pois o *M. audouinii*, até então, só tinha sido isolado em países europeus.[7] Recentemente, contudo, o fungo foi recuperado de lesões em duas crianças, no estado do Rio de Janeiro, e que nunca tinham deixado o país. Esse foi o primeiro relato do isolamento de *M. audouinii*, no Brasil.

Conforme relatado na literatura, parece que o *M. audouinii* sempre esteve presente em território nacional e a falta de publicação sobre seu isolamento se deveu, possivelmente, a confusões na distinção entre ele e o *M. canis,* ou que, mesmo após a identificação do patógeno como *M. audouinii*, o caso não tenha sido reportado ao Ministério da Saúde ou a outros órgãos de vigilância em saúde ou ainda publicados em revista científica por pesquisadores nacionais.[35]

Relativamente ao diagnóstico, Pinheiro e colaboradores (2012)[7] apresentaram um relato de caso do uso do dermatoscópio como um método não invasivo e de baixo custo para auxiliar no diagnóstico de *tinea capitis*, independentemente do agente, sendo demonstrada a presença de pêlos em "vírgula" e cabelos em "sacarrolhas" e pelo método direto e cultura foi identificado *T. tonsurans.*

Os antifúngicos reportados nos casos clínicos aqui apresentados foram a griseofulvina, derivados azólicos (fluconazol, oxiconazol, itraconazol, cetoconazol) e a terbinafina, e, em alguns casos, foi utilizada associação de mais de um antifúngico (Tabela 2). Griseofulvina foi utilizada na maioria dos casos clínicos aqui reportados. O mecanismo de ação da griseofulvina se dá pela ligação da tubulina, que é uma proteína que forma os microtúbulos do fuso acromático, inibindo o processo de mitose do fungo. Desde muito tempo, a griseofulvina tem sido usada para o tratamento da *tinea capitis*, devido à sua eficácia e boa tolerância, especialmente em crianças, o baixo custo e mínimos efeitos colaterais.[27] Contudo, uma desvantagem de sua utilização é a necessidade de um tratamento de longa duração (6-12 semanas), o que leva, muitas vezes, a uma redução na taxa de adesão terapêutica e, consequentemente, à recidiva das lesões.[11]

O cetoconazol, o itraconazol, o fluconazol e a terbinafina são antifúngicos que inibem enzimas da via de biossíntese do ergosterol, levando à redução da conversão de lanosterol em ergosterol, principal esterol presente na membrana celular dos fungos.[8] A diminuição na síntese de ergosterol faz com que haja a desestabilização da mem-

brana, alteração da permeabilidade e inibição do crescimento fúngico.[36] Estudos mais recentes demonstraram que, apesar desses fármacos terem perfis de eficácia semelhantes aos da griseofulvina, essa parece ser mais efetiva frente a infecções por *Trichophyton* do que por *Microsporum.*[16,37]

No caso relatado por Melo-Monteiro e colaboradores, (2003), o estudo visou chamar atenção porque apesar da baixa incidência de *M. gypseum* no Rio de Janeiro, nos últimos anos têm sido relatados dermatofitoses provocadas por este agente. O caso estava associado a um paciente do sexo masculino de 3 anos de idade que apresentou uma forma clínica de *tinea* do couro cabeludo denominada de *Kerion Celsi*, caracterizada pela presença de placas edematosas com aspecto bem delimitado, dolorosas, com pústulas e abscessos que drenam pus e são provocados, geralmente, pelo *M. gypseum*. O tratamento de escolha neste caso foi a administração por via oral de griseofulvina para melhora do paciente. Griseofulvina é geralmente o tratamento de escolha para *tinea capitis* por espécies de *Microsporum.*[38] Por outro lado, infecções por *Trichophyton* são prioritariamente tratadas com terbinafina ou alternativas como fluconazol e itraconazol.[39]

Por fim, estudos em distintas regiões do mundo mostraram a diferença na etiologia de *tinea capitis*. Algumas espécies são endêmicas em algumas regiões geográficas, como *T. violaceum* no leste europeu, África, Ásia e América do Sul, e *T. soudanense* na África e Ásia. *Microsporum canis* já é o agente mais prevalente em países desenvolvidos, e pode estar associado ao contato com animais, já que o fungo é zoofílico.[40] Aqui, estudos epidemiológicos e de casos foram relatados por espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas. Apesar de ser comum a infecção no ser humano por dermatófitos zoofílicos e geofílicos, é rara a infecção animal por dermatófitos antropofílicos.[41]

Por se tratar de micoses em que o fungo está presente na natureza, podendo levar a infecção, estudos que avaliam dermatófitos isolados do solo no Brasil também são de grande importância,[42,44] já que o crescimento destes organismos pode ser influenciado por fatores ambientais, pH e presença de resíduos de queratina humana ou animal no solo, por exemplo,[41] sendo, desta forma, fundamental entender os fatores bióticos e abióticos que podem influenciar na epidemiologia das dermatofitoses.[45]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta revisão da literatura, foram avaliados estudos epidemiológicos e relatos de caso sobre *tinea capitis* no Brasil, sendo observado que o gênero masculino foi o mais afetado e a faixa etária com maior incidência de infecções foi aquela de indivíduos menores de 10 anos.

No que diz respeito ao padrão ecológico dos dermatófitos, foram observadas infecções por fungos antropofílicos e zoofílicos. As espécies *T. tonsurans*, *M. canis* e *T. rubrum* foram responsáveis por grande parte das dermatofitoses no couro cabeludo, variando a prevalência conforme a região do país. A observação da incidência de *tinea capitis* por *T. tonsurans* e/ou por *M. canis* é de fundamental importância no que se refere à epidemiologia e ao tratamento das dermatofitoses, visto que a literatura especializada relata que há diferenças na distribuição geográficas das espécies e na susceptibilidade aos antifúngicos.

As avaliações dos procedimentos propedêuticos devem ser realizadas criteriosamente, pois há relatos de reposta terapêutica não eficiente com complicação das lesões e prolongamento do tempo de tratamento. Deve-se também interromper a cadeia de transmissão da infecção. Para tanto, é necessário fazer um correto diagnóstico da etiologia para possibilitar a instituição de adequadas medidas de controle, que incluem o tratamento com o antifúngico específico, exame de familiares para a pesquisa de portadores assintomáticos, principalmente nos casos de infecção pelo *T. tonsurans*, e cuidados com a limpeza e higienização do ambiente, objetos compartilhados e animais domésticos.

Abstract

Dermatophytosis is a superficial mycosis, caused by filamentous fungi called dermatophytes, which are capable of degrading keratinized structures. The agents of these infections in humans belong to three genera: Microsporum, Trichophyton *and* Epidermophyton*. The objective of this study is to review the epidemiological studies and reports of tinea capitis cases in Brazil, based on articles published between 2000 and 2018. Based on the data analyzed, the male gender was the most affected by* Tinea capitis *and the most reported age group was of individuals with less than 10 years. The main species isolated from the samples were:* T. tonsurans *and* M. canis*, being the first one most found in the north, northeast and center-west regions and the second one found in the southeastern and southern regions of Brazil. In the case reports, lesions with different characteristics were reported, being some more inflammatory, erythematous, with pustules, others with plaques of alopecia or desquamative than others. Pain and itching were symptoms observed in some cases. Griseofulvin and azole derivatives were the main drugs used in therapy, although in association in some cases. The evaluations of the treatment employed in the cases of* Tinea capitis *should be thoroughly done since there are reports of cases in which the therapeutic response is not efficient, aggravating the lesions and prolonging the treatment time.*

Keywords

Tinea capitis; *epidemiology; etiology, dermatophytes*

REFERÊNCIAS

1. Gianelli M, Araujo MAR, Proença NG, Zaitz C. Dermatofitose: estudo epidemiológico prospectivo. An Bras Dermatol. 2010;63:9-12.
2. Zaraa I, Hawilo A, Aounallah A, Trojjet S, El Euch D, Mokni M, Ben Osman A. Inflammatory Tinea capitis: A 12-year study and a review of the literature. Mycoses. 2013 Mar;56(2):110-6.
3. Cortez AC, de Souza JV, Sadahiro A, de Oliveira JA. Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. Rev Iberoam Micol. 2012 Oct-Dec;29 (4):223-6.

4. Oliveira ACP, Guilhermetti E, Kioshima ES, Pedra MR, Svidzinski TIE. Tinea capitis em Maringa, Paraná: Um estudo de 11 anos. An Bras Dermatol. 2002;77:321-8.
5. Weitzman EO, Pontes ZBVS, Oliveira NMC, Carvalho MFP, Guerra MFL, Santos JP. Frequência de dermatofitoses em João Pessoa-Paraíba-Brasil. An Bras Dermatol. 2010;74(2):127-32.
6. Summerbell RJ. Dermatofitoses e outras micoses superficiais. In: Mandell GL, Gordon Douglas R, Bennett JE (eds) Enfermidades Infecciosas. Princípios e prática. p. 3137-3149, 2010.
7. Pinheiro AM, Lobato LA, Varella TC. Dermoscopy findings in tinea capitis: case report and literature review. An Bras Dermatol. 2012 Mar-Apr;87(2):313-4.
8. Hernández T, Machado S, Carvalho C, Selores M. Tinhas do couro cabeludo na idade pediátrica. Nascer e Crescer. 2004;13:23-6.
9. Gürtler TGR, Diniz LM, Nicchio L. Tinea capitis micro-epidemic by Microsporum canis in a day care center of Vitória - Espírito Santo (Brazil). An Bras Dermatol. 2005 June;80(3):267-72.
10. Zaitz C. Dermatofitoses. In: Zaitz C, Campbell I, Marques SA, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de micologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010, cap. 15, p. 157-167.
11. Cruz OFL, Silva MRR, Vilela NA, Silva ER, Silva HM, Jesuíno RS. Etiologia das dermatofitoses em pacientes do Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Rev. Patol. Trop. n. 21, p.189-197, 2011.
12. Perelli A, Calzolaio V, González L, Guatache P, Guaina O. Presencia de dermatofitos em niños de uma unidad educativa Del município Naguanagua, edo. Carabobo, Venezuela. Durante el período de 2009. Academia Biomédica Digital. v. 10, n. 43, 2010.
13. Peres NT, Maranhão FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. An Bras Dermatol. 2010 Sep-Oct;85(5):657-67.
14. Silva KA, Gomes BS, Magalhães OMC, Lacerda Filho AM. Etiologia das dermatofitoses diagnosticadas em pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica no Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, entre 2014-2017. RBAC. 2018;1 (50):33-7.
15. Aquino VR, Constante CC, Bakos L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. An. Bras. Dermatol. [Internet]. 2007 June; 82(3):239-244. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962007000300005&lng=en.
16. Araújo SM, Fontes CJ, Leite Júnior DP, Hahn RC. Fungal agents in different anatomical sites in Public Health Services in Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012;54(1):5-10.
17. Marques SA, Camargo RMP, Fares AHG, Takashi RM, Stolf HO. Tinea capitis: epidemiologia e ecologia dos casos observados entre 1983 e 2003 na Faculdade de Medicina de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. An Bras Dermatol. 2005;80:597-602.
18. Brilhante RS, Paixão GC, Salvino LK, Diógenes MJ, Bandeira SP, Rocha MF, et al. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: Trichophyton tonsurans as important emerging pathogen of tinea capitis. Rev Soc Bras Med Trop. 2000 Sep-Oct;33(5):417-25. [Article in Portuguese].
19. Oliveira JAA, Barros JÁ, Cortez ACA, Oliveira JSRL. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro de 2003. An Bras Dermatol. 2006;81(3):238-43.
20. Cortez AC, de Souza JV, Sadahiro A, de Oliveira JA. Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. Rev Iberoam Micol. 2012;29(4): 223-6.
21. Aquino PMLP, Lima EO, Farias NMP. Tinea capitis em João Pessoa: visão socioeconômica. An Bras Dermatol. 2003;6(78): 713-17.
22. Fajardo AD, Silva, RR, Costa, APM, Rossetto AL, Cruz RCB. Estudo Epidemiológico das infecções fúngicas superficiais em Itajaí, Santa Catarina. RBAC. 2017;49(4):396-400
23. Gürtler T, Machado S, Carvalho S, Selores M. Tinhas do Couro Cabeludo na Idade Pediátrica. Nascer e Crescer. 2008;13:23-6 .
24. Lacaz CS, Porto E, Heins Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação: Fungos, Actinomicetos, Algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier. p.278 -281, 1998.
25. Nelson MM, Martin AGH. Superficial fungal infections: dermatophytosis, onychomycosis, tinea nigra, Piedra. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. The McGraw-Hill Companies, United States of American, 6ª edition, cap. 205, v. 2, p. 1989-2005, 2003.
26. Zhan P, Liu W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. Mycopathologia. 2017 Feb;182(1-2):77-86.
27. Rodrigues GS, Oliveira FM, Pereira EF, Cruz RCB. Tinea capitis em adulto por Trichophyton violaceum no Brasil: relato de um caso e revisão da literatura. An Bras Dermatol. 2008;83(6):544-8.
28. Proença NG. Dermatophytosis in childhood: clinical and therapeutic aspects. Rev Paul Med. 1990 Nov-Dec;108(6):279-84. [Article in Portuguese].
29. Sousa FHC, Fernandes NC. Tinea capitis por Trichophy tontonsurans em crianças: papel dos portadores assintomáticos. An Bras Dermatol 2001;76(2):179-86.
30. Soares DM, Rocha RC, Silva NF, Costa NG, Lima EO. Tinea capitis: revisão de literatura. Braz. J. Surg. Clin. Res. 2017;20(1):159-63. Acessível em: https://www.mastereditora.com.br/download-2446
31. Veasey JV, Miguel BAF Mayor SAS, Zaitz C, Muramatu LH, Serrano JÁ. Epidemiological profile of tinea capitis in São Paulo City. An Bras Dermatol. 2017 Mar-Apr;92(2):283-284
32. Schechtman RC, Silva ND, Quaresma MV, Bernardes Filho F, Buçard AM, Sodré CT. Dermatoscopic findings as a complementary tool in the differential diagnosis of the etiological agent of tinea capitis. An Bras Dermatol. 2015 May-Jun;90(3 Suppl 1):13-5.
33. Salci TP, Salci MA, Marcon SS, Salineiro PHB, Svidzinski TIE. Trichophyton tonsurans in a family microepidemic. An Bras Dermatol. 2011 Sep-Oct;86(5):1003-6.
34. Damázio PMRBC, Lacerda HR, Lacerda Filho AM, Magalhães OMC, Neves RP. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(4):484-6.
35. Brito-Santos F, Figueiredo-Carvalho MHG, Coelho RA, Sales A, Almeida-Paes R. Tinea Capitis by Microsporum audouinii: Case Reports and Review of Published Global Literature 2000-2016. Mycopathologia. 2017 Dec;182(11-12):1053-60.
36. de Oliveira JAA, Barros JA, Cortez ACA, Oliveira JSRL. Micoses superficiais na cidade de Manaus/AM. Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 81, p. 238-43, 2005.
37. Lopes JO, Matte SW, Werlang J, Silva C, Eidt M. Tinha por Trichophyton violaceum no Rio Grande do Sul. Rev. AMRIGS. 1994; 38:224-5.
38. Melo-Monteiro C, Martins CJ, Monteiro CS, Paiva MB, Fagundes RO. Kerion Celsi por Microsporum gypseum. An. Bras. Dermatol. [Internet]. 2003 June;78(3):319-321. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962003000300008&lng=en.
39. Nenoff P, Reinel D, Krüger C, Grob H, Mugisha P, Süß A, Mayser P. Tropical and travel-related dermatomycoses: Part 1: Dermatophytoses. Hautarzt. 2015 Jun;66(6):448-58.
40. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses. 2008 Sep;51 Suppl 4:2-15. Erratum in Mycoses. 2009 Jan;52(1):95.
41. Pinheiro Ade Q, Moreira JL, Sidrim JJ. Dermatophytoses in the urban environment and the coexistence of man with dogs and cats. Rev Soc Bras Med Trop. 1997 Jul-Aug;30(4):287-94. [Article in Portuguese]
42. Possatto Takahashi J, Pelegrini A, de Queiroz Moreira Pereira C, Souza MC. Levantamento de fungos queratinofílicos em solo de parques e praças públicas no município de São Bernardo do Campo. Revista de Biologia e Ciências da Terra [Internet]. 2011;11(1):47-53. Recuperado de: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50021097005.

43. Pontes ZB, Oliveira AC, Guerra FQ, Pontes LR, Santos JP. Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of Paraiba State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013 Nov-Dec;55(6):377-83. doi: 10.1590/S0036-46652013000600002.

44. da Silva Pontes ZB, Oliveira AC. Dermatophytes from urban soils in João Pessoa, Paraíba, Brazil. Rev Argent Microbiol. **v**. 40, n. 3, p. 161-3, 2008.

45. Segal E, Frenkel M. Dermatophyte infections in environmental contexts. Res Microbiol. 2015 Sep;166(7):564-9.

Correspondência

Paula Alvarez Abreu

Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé
Macaé-RJ, Brasil.
abreu_pa@yahoo.com.br

The pathways of cell cycle regulation in retinoblastoma

As vias de regulação do ciclo celular em retinoblastoma

Renata Mendes de Freitas[1]

Resumo
O retinoblastoma é um tumor ocular infantil ocasionado, frequentemente, pela inativação bialélica do gene *RB1* acometendo crianças até os 5 anos de idade. A proteína retinoblastoma (pRB), codificada pelo gene supressor tumoral *RB1*, é responsável por regular a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Essa proteína forma um complexo com o fator transcricional E2F fazendo com que o ciclo celular permaneça no estágio G0/G1. Com a fosforilação de quinases dependentes de ciclinas, a fosforilação da proteína RB é ativada e o complexo formado com o E2F é desfeito, havendo o avanço do ciclo celular para a fase S e a proliferação celular. Todo esse controle da proliferação celular é regulado não só pelo complexo formado pela proteína RB e E2F, mas também por outras proteínas que participam e/ou interferem neste mecanismo de controle da divisão celular, como, por exemplo, as proteínas mdm2, mdm4, p21.

Palavras-chave
Retinoblastoma; proteínas de ciclo celular; proteína do retinoblastoma

INTRODUÇÃO

Retinoblastoma (RB) is an ocular tumor that affects retinal cells usually diagnosed in children up to 5 years of age. The prevalence is one in 15,000 - 20,000 born, being considered a rare neoplastic type, despite being the most frequent eye cancer in childhood.[1,2] Some scholars try to associate the higher incidence in developing countries, the level of education of the parents, the socioeconomic profile of the families, the professional qualification of the health care team and maternal nutritional conditions, emphasizing, for example, the amount of folic acid consumed during pregnancy.[3,4] The relationship between race, gender and ocular laterality in cases of retinoblastoma is not found in the studies conducted.[5]

This tumor type is associated with the biallelic loss of the *RB1* tumor suppressor gene, which may be hereditary or sporadic, where the inhibition of retinoblastoma protein (pRB) function, encoded by the *RB1* gene, is determinant in the genesis of retinoblastoma.[6] The loss of *RB1* deregulates transcriptional factors associated with transcriptional activation of genes and triggers cellular apoptosis. In many types of cancers, loss of pRB can alter E2F and allow the deregulated maintenance of the cell cycle, but tumorigenesis can be prevented by p53-mediated surveillance.[7] In addition, in human tumors this event was also associated with the amplification of proteins encoded by the *MDM2* and *MDM4* genes, and could act as therapeutic targets for the treatment of retinoblastoma.[6]

Each component of this complex regulatory pathway pRB-E2F and associated genes in retinoblastoma will be addressed below.

THE TUMOR SUPPRESSOR GENE *RB1*

In 1986, the *RB1* gene was identified and cloned as the first tumor suppressor by Friend et al.[8] This gene, located in the chromosomal region 13q14, comprises more than 178,143 kb of genomic DNA and is composed of 27 exons that transcribe a messenger RNA of 4,772 kb. The complete gene sequence was reported by Toguchida et al. (1993).[9,10]

The *RB1* gene encodes a nuclear protein of 928 amino acids called pRB, belonging to the pocket family, with ability to regulate gene transcription and act as regulator of the G1/S phases of the cell cycle.[11] pRB is also involved in the transcriptional regulation of genes that act on apoptosis, differentiation and cell adhesion.[12,13] The major cellular

[1]*Doutorado - Fundação Oswaldo Cruz - (Estágio PNPD) - Rio de Janeiro-RJ, Brasil.*

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Laboratório de Epidemiologia de Malformações Congênitas Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Suporte financeiro: CAPES

Recebido em 27/05/2019
Artigo aprovado em 29/05/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900853

functions of pRB are conserved in mammalian cells, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans.*[14]

Tracking for mutations in the *RB1* gene should occur in all exons, with single base substitutions and large deletions being the most recurrent mutations. Many of these mutations are of the nonsense and frameshift type.[15] Most of the base substitutions originate from the transition from a cytosine to thymine (C> T) in the CGA codon into the amino acid arginine, generating a UGA stop codon, resulting in the loss of pRB function.[1,16]

Mutations detected in the *RB1* gene may increase the quality of clinical management of retinoblastoma and allow predictions of risk for all family members.[17]

Complete depletion of the *RB1* gene leads to increased chromosomal instability manifested in aneuploidy or polyploidy.[18] This phenomenon is attributed to centromeric dysfunction and failure to recruit components of the condensin II complex, which are proteins responsible for keeping both chromatid sisters together, leading to the defect of chromosome separation during mitosis.[18]

However, tumorigenesis occurs when surveillance pathways are inactivated, such as the p53 protein, that prevents the induction of apoptosis in the loss of pRB function.[19]

THE RETINOBLASTOMA PROTEIN (PRB)

The RB protein (pRB) acts as a regulator of G1/S phases of the cell cycle and has the ability to regulate the gene transcription of genes that participate in apoptosis, differentiation and cell adhesion.[12,13]

This protein belongs to a family of proteins, encoded by three different genes: the *RB1* gene, which encodes pRB; the *RBL1* gene, located in the chromosomal region 20q11.2, which encodes p107, and the *RBL2* gene, located on the long arm of chromosome 16, which encodes p130.[19,20] All members of the RB family of proteins have a conserved region, called pocket, which interacts with the LXCXE motif, found in viral proteins, used to bind to pRB. Deletions or point mutations in this domain make the oncoproteins incapable of inactivating pRB and potentiate cells in tumor targets.[21]

These proteins, known as "pocket", are formed by three domains: N-terminal, A/B pocket and C-terminal.[20] Protein functionality is related to elongation factor 2 (E2F) binding domains.[10]

Cells expressing the mutant pRB, lacking the LXCXE interaction domain, showed abnormal chromatin structures, including decondensation of chromatin and loose chromosomes.[22] These data indicate that pRB also regulates chromatin remodeling, predominantly in the G0 and G1 phases of the cell cycle.[23]

The p107 and p130 proteins exert the function of regulating the repression of E2F target genes. However, such proteins are little mutated in human cancers.[13] Studies in mice showed that *RB1* is an essential gene to the cells, and knockout mice die during the embryonic development. On the other hand, knockout mice, for the genes of the p107 and p130 proteins, usually develop suggesting that such proteins cannot replace all the functions of pRB and that this is in fact vital for the survival of the organism.[13]

In the quiescent phase of the cells (G0), the most abundant protein is p130; subsequently, cells are stimulated to initiate the cell cycle, and the pRB and p107 proteins are induced.[20] Thus, when the two begin to have their levels of expression increased, the levels of p130 are decreasing (Table 1). Some studies point to p130 as a partial transcriptional repressor called DREAM, and function to repress the functions of E2F target genes during the G0 phase.[20,24]

Table1 - Specific types of RB-E2F complexes prevalent during the cell cycle.

RB family member	Transcription Factors	Cell cycle stages
pRB	1, 2, 3	G0, G1, S
p107	4, 5	G1, S, G2
p130	4, 5	G0, G1

Source: Adapted from Henley SA and Dick FA.[20]

The initiation of gene transcription in eukaryotes requires that transcriptional protein factors, together with RNA polymerase, form a basal transcription apparatus to initiate gene transcription.[25]

THE TRANSCRIPTIONAL FACTOR IN THE CONTROL OF THE CELL CYCLE:

The E2F transcription factor was initially identified as the cellular component required for the anterior region (E1A region) of the adenovirus protein, in order to mediate the transcriptional activation of the viral promoter region (E2 region).[26]

Chellappan et al. (1991) deduced the mechanism of regulation of E2F by activation of the adenovirus E1A region, allowing the understanding that the transcription factor is inhibited when associated with the RB protein. This observation was the first to suggest that E2F could be related to the development of cancer. [27] It was later identified that pRB is target of other viral oncoproteins, including SV40 of T antigen and human papillomavirus (HPV) E6 and E7 proteins.[28,29]

Subsequent studies have demonstrated that E2F controls the transcription of genes that are essential for cell division.[29]

This means that the HPV E7 viral protein is capable of binding to pRB and making it inactive; this way, the E2F factor becomes free, generating a stimulus for cell proliferation. In

addition, the association of E7 protein with pRB leads to an increase in p53 that causes cell cycle arrest or induces apoptosis.[30] In the context of HPV infection, the E6 oncoprotein initiates the degradation of p53, leading to loss of control of cell proliferation and blockade in the activation of apoptosis.[30]

The ratio of pRB to cell cycle progression is associated with eight members of the E2F transcriptional factor family (E2F1 to E2F8) that are central regulators of cell cycle progression. The pRBs form heterodimers with a subunit encoded by DP - DP1 and DP2 family members, generating a DNA binding specificity, mainly determined by the E2F subunit.[12,13]

The factors E2F1, E2F2 and E2F3 are associated with transcriptional activation and have pRB as the target; E2F4 and E2F5 are transcriptional repressors and are targets of p107 and p130, whereas E2F6, E2F7 and E2F8 are independent repressors of pRB.[23] E2F1 plays an important role in the induction of apoptosis and is often found amplified in human cancers.[13]

Although the accepted model for the pRB-E2F complex reinforces that cyclin-dependent kinases (CDKs) phosphorylated pRB release the E2F transcription factors, during the G1/S cell cycle transition, it was observed that the pRB-E2F1 complexes persist associated beyond the S phase, independently of pRB phosphorylation. This complex will occupy promoter regions of apoptotic genes of proliferating cells.[31]

Thus, these observations indicate that phosphorylation of pRB by CDKs during the G1/S transition causes the release of most E2F factors to induce cell cycle gene transcription, but the pRB-E2F1 complexes remain stable thanks to the interaction of this complex to the promoter regions of apoptotic genes, repressing their expression.[31,32]

DeGregori (1997) suggests that E2F1-induced apoptosis is not simply a consequence of abnormality in S phase, but represents an intrinsic property of E2F1 in activating genes that initiate programmed cell death. It is possible that this ability of E2F1 causes direct or indirect interaction with other proteins participating in the apoptotic pathway, including p53. Thus, the results presented by him suggest the ability of E2F1 to induce an accumulation of p53, acting in the G1 phase of the cell cycle, promoting cell differentiation and control.[33]

Studies have suggested that E2F can bind to multiple promoter sites, allowing the ability to dynamically regulate the coding of genes that are important for DNA repair, chromatin remodeling, chromosomal segregation.[34]

THE CELL CYCLE ACTIVATION BY CDK

The proteins of the RB family are activated by phosphorylation of cyclin-dependent kinases (CDKs), which are divided into three classes - CDK2, CDK4 and CDK6. CDK2 associate with cyclins of type A and E; the CDK4 and CDK6 classes are associated with D-type cyclins (D1, D2 and D3) and are responsible for initiating pRB phosphorylation.[20] They act to maintain the cells in the G1 phase of the cell cycle, since they favor the maintenance of the pRB-E2F complex.[20] The CDK2/cyclin E complex promotes the progression of the G1 phase cycle to S phase, and CDK2/cyclin A is responsible for maintaining cell cycle progression after S phase.[6]

In its active form, pRB is hypophosphorylated in G0/G1 and associated with the transcriptional factor E2F, blocking the cell cycle. Extracellular factors that direct cell mitogenesis induce the activation of CDK2 and CDK4/CDK6-dependent cyclin-dependent kinases (CDKs) that promote phosphorylation of pRB.[28]

Once phosphorylated, the RB protein has its binding to E2F factor weakened and the dissociation of these molecules occurs, thereby allowing the onset and progression to the S-phase of the cell cycle.[29,35] The entire mechanism can be observed in Figure 1.

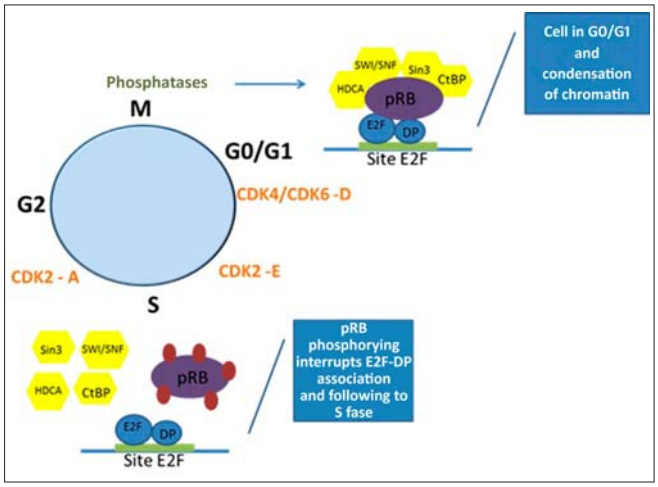


Figure 1. Mechanism of regulation of the pRB-E2F complex in cell cycle control. In G0/G1, the pRB-E2F complex is found with the active pRB bound to the transcriptional factor so that the cell cycle is halted in the G0/G1 phases and with highly condensed chromatin. With the activation of CDK4, CDK6 and CDK2-E in the G1 phase, the pRB-E2F complex is released and the cell cycle progresses through the S phase. The pRB is again activated by phosphatases, that allow the hypophosphorylation of the protein and stop the cell cycle in G0/G1.

The inactivation of pRB promotes genomic instability and results in deletions, duplications and chromosomal rearrangements[35] and compromises the ability of cells to terminate the cell cycle, being highly susceptible to oncogenic gene proliferation.[12]

The literature shows that pRB is functionally impaired in many tumors as a result of *RB1* mutations or mutations that increase phosphorylation of the protein or by the expression of viral oncoproteins targeting pRB.[16] Inactivation

of pRB by oncogenic proteins is induced by viral infection and *RB1* gene expression is suppressed via methylation of the DNA promoter region.[22]

With cell cycle progression, CDK activity is decreased by allowing the phosphatase 1 (PP1) protein to dephosphorylate pRB, promoting hypophosphorylation and allowing a new formation of the pRB-E2F complex, which represses gene transcription and cell cycle progression.[13]

This negative regulation of cell cycle progression is the main mechanism by which pRB represses tumor development. However, pRB interacts with hundreds of proteins that are critical to multiple processes beyond cell cycle control.[13]

MAINTAINING DNA INTEGRITY

The signaling pathway of the p53 protein, encoded by the *TP53* gene, located on chromosome 17, is usually inactivated in several types of cancers; approximately 50% of all tumor types have mutations in the *TP53* gene, and those with wild type p53 often show mutations in other signaling pathway genes that allow cell cycle surveillance.[36]

During a DNA damage response, the *TP53* gene prevents cell proliferation through various mechanisms, such as cell cycle arrest and activation of apoptosis.[37]

In retinoblastoma, it is common for the *TP53* gene not to be mutated, but other associated genes,[38,39] in which the deregulation of p53 stems from increased expression of regulatory genes such as *MDM2* and *MDM4*.[40] The mdm2 and mdm4 proteins can prevent the effect of p53, playing a role of p53 regulators, inhibiting cell cycle control and preventing apoptosis.[37]

Increased expression of *MDM2* and *MDM4* genes can be activated by somatic amplifications in tumors or germ polymorphisms, leading to a predisposition of individuals to cancer.[40]

In addition to the increased expression of the p53 signaling pathway antagonist genes, there are several splicing variants in the formation of messenger RNAs of the *MDM2* and *MDM4* genes leading to p53 repression.[36]

CDKIS ACTIVATION AND CELL CYCLE ARREST

The mechanism of activation of CDKs can be regulated by inhibitory proteins known as CDKI - cyclin-independent kinase inhibitor, mainly acting in the control of the G1 and S phases of the cell cycle. There are two classes of CDKI: the CIP family and KIP, which consists of the p21, p27, p57, p18 and p19 proteins. These members bind cyclin and CDK subunits, inhibiting kinase activity (Figure 2).[18]

The *CDKN1B* gene, located in the chromosomal region 12p13, encodes the p27 kinase inhibitor, which

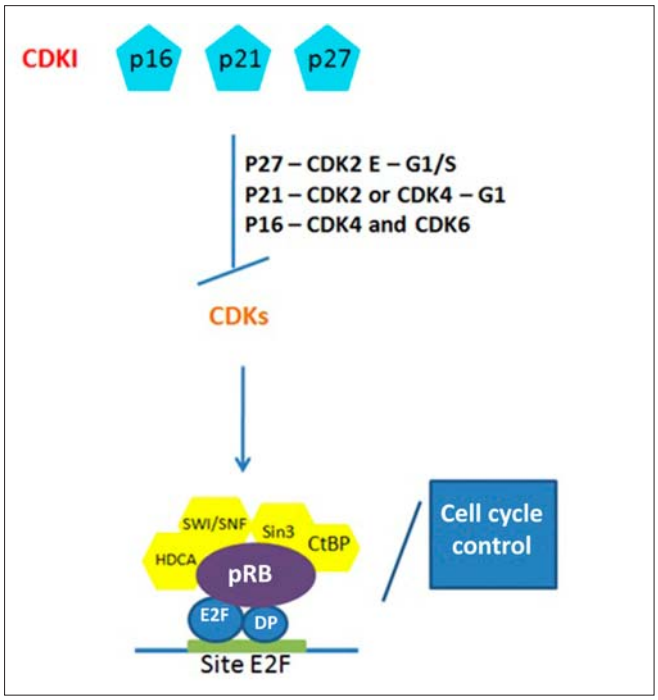


Figure 2. Regulation of CDKs by action of CDKIs and restoration of pRB-E2F complex in cell cycle control. The main CDKIs in the control of CDKs in the pathogenic pathway of retinoblastoma and cell cycle arrest due to hypophosphorylation of pRB and formation of the pRB-E2F complex.

inhibits the CDK2/E complex, negatively regulating cell cycle progression in the G1/S phases and promoting cycle arrest in G1 phase.[18] In this way, p27 controls proliferation, differentiation, cell adhesion and apoptosis. In G1 the expression levels of p27, for example, are relatively high and CDK2/E activity is low, preventing DNA synthesis.[18]

The low expression of *CDKN1B* is related to tumorigenesis and the advancement of the clinical stage in several tumors, such as prostate, gastric, laryngeal, colorectal and breast. Some SNPs (single nucleotide polymorphism) in the gene are associated with reduced transcription rate and low levels of p27.[41] Such SNPs may affect the normal functioning of *CDKN1B* by altering the efficiency of transcription and protein levels, leading to cell cycle deregulation and neoplastic behavior.[41]

Some studies have shown increased susceptibility to cancer with the identification of polymorphism rs2066827.[41] Landa et al. (2010)[42] suggests that this polymorphism (T326G, V109G, rs2066827) in the *CDKN1B* gene is associated with reduced transcription rate and low protein levels with susceptibility to thyroid and prostate cancer.[42]

P27 was identified in the association of multiple endocrine neoplasm syndrome type 1 (MEN-1) with mutations of loss of germline function in the *CDKN1B* gene in mice. Expression studies for p27 showed an absence or reduced presence in normal and pathological tissues

of these mice.[43] *In vitro* cell culture studies have demonstrated that the mutant p27 protein retains some properties of the wild-type protein, such as nuclear localization and interaction with CDK2/E, but is highly unstable and rapidly degraded.[43]

The key role of the *CDKN1B* gene in the regulation of cell cycle proliferation and as a tumor suppressor has been demonstrated in knockout mice that showed gigantism due to increased cell number and increased tumorigenesis.[44]

Another CDK control gene is *CDKN1A,* located in the chromosomal region 6p21.2, which encodes the cyclin-dependent inhibitory kinase (CDKI) p21, which associates with the CDK2 or CDK4 complexes, inhibiting the activity of these complexes and regulating the progression of the cycle cells in G1.[23] In addition, p21 protein may also play a regulatory role in S phase during cell duplication and DNA repair.[45] This signaling control is mediated by p53, which induces p21 expression in response to DNA damage, disrupting cell cycle progression in the transition from G1 phase to S phase by inhibition of CDKs.[45]

Sheikh et al. (1994)[46] have demonstrated in a study of breast cancer cells that mechanisms regulating p21 expression involve p53-dependent and p53-independent signaling pathways. In ovarian cancer cells, it has been observed that the induction of p21 expression can occur by activation of protein kinase C (PKC) in cells lacking p53.[47]

A study (2001) demonstrated that p21 expression is associated with the presence of metastases and probably with great genetic instability.[48]

The *CDKN2A* gene, located in the chromosomal region 9p21.3, generates variant transcripts that differ in the first exon and at least three alternatively processed variants encoding different proteins have been described, two of which encode structurally related isoforms that function as inhibitors of CDK4 kinase. The remaining transcript contains an open reading frame (denominated ARF) which specifies a protein that is structurally unrelated to the products of the other variants. This ARF product functions as a stabilizer of the p53 protein, since it can interact and inhibit mdm2, a protein responsible for the degradation of p53 (Figure 3).[49]

Despite the structural and functional differences between the CDK inhibitory isoforms and the ARF product encoded by this gene, through the regulatory roles of CDK4 and p53 in cell cycle G1 progression, they share a common functionality in the control of G1. This gene is often mutated or deleted in a wide variety of tumors, and is known to be a major tumor suppressor gene.[49] The activating signals of p16 are diverse, including those that promote cell cycle arrest due to the presence of DNA damage or to those associated with tumorigenesis.[50]

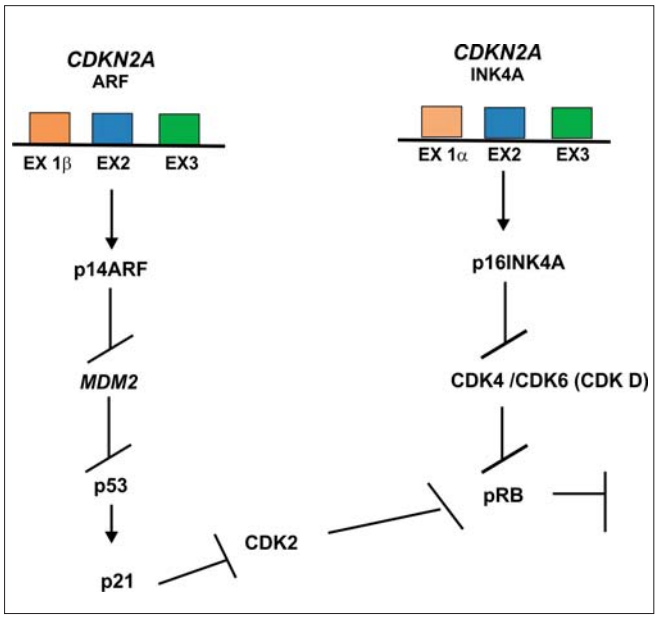


Figure 3. p14^{ARF} inhibiting mdm2 also blocks the activity of p53 but activates p21 that will inhibit CDK2 and block pRB. A p16 is a CDK inhibitor that limits the activity of CDK4 and CDK6 complexes, disrupting their interaction with D-type cyclins. Thus, p16 regulates the phosphorylation of pRB by inhibiting CDK4 or by releasing specific CDK6 inhibitors, resulting in non-phosphorylated pRB, keeping the cells in the G1 phase.[1,26]

REGULATORS GENES OF THE P53 ACTIVATION PATHWAY

The *MDM2* gene, mapped in the 12q15 chromosomal region, is the major regulator of p53, keeping the protein at appropriate levels in normal cells. After stress, p53 is activated and induces apoptosis.[51]

The mdm2 acts as a ubiquitin ligase that binds to p53 for its destruction via proteosomes, preventing apoptosis from occurring in cells. Cells with damaged DNA activate protein kinases, which phosphorylate p53 and reduce binding with mdm2 allowing apoptosis.[31,39] Thus, an increase in mdm2 levels has been observed in a broad spectrum of human cancers.[45,52]

The expression of mdm2 has been shown in previous studies, resulting in a decrease in E2F1 levels, causing mdm2 to inhibit the apoptosis promoted by the transcriptional factor. In this way, mdm2 is a negative regulator of E2F1 and also of p53.[52,20]

Nutlin-3a consists of an inhibitor of mdm2. A recent study showed that this substance causes p53 and p21 accumulation and pRB hypophosphorylation, which led to cell cycle arrest in some cell lines.[20] On the other hand, in other strains, nutlin-3a downregulated pRB and resulted in apoptosis independent of E2F1. Thus, nutlin-3a is considered a potential therapeutic agent that could suppress and/or kill tumor cells. However, the mechanism by which this substance

acts by inducing hypophosphorylation of pRB in some cells is not well understood.[20]

Another gene, *MDM4*, located at 1q32, regulates the stability of p53 in a process dependent on mdm2. The mdm4 protein, belonging to the same mdm2 family, shares several structural and functional properties, including a highly conserved p53 binding domain capable of inhibiting p53 transactivation.[52]

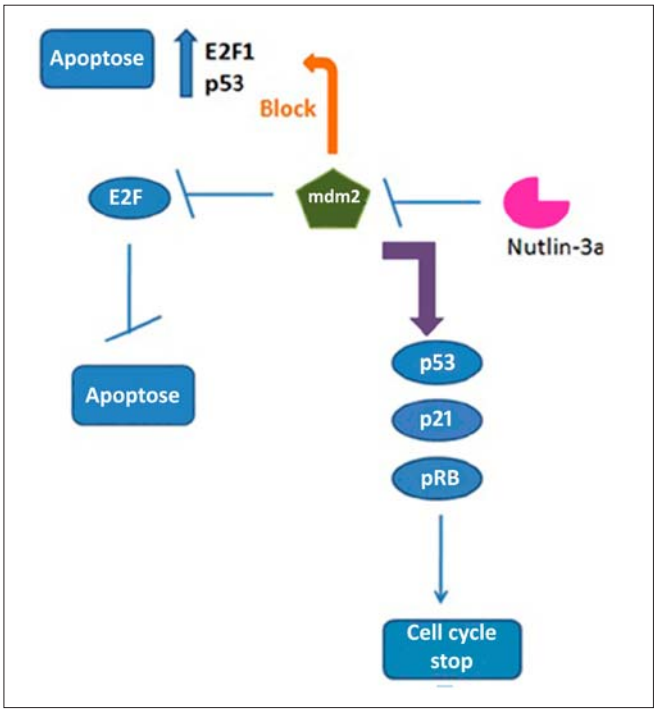


Figure 4. Regulation of Nutlin-3a in mdm2, E2F, p53, p21, pRB, apoptosis and cell cycle arrest. Nutlin-3a when it blocks mdm2, also blocks E2F and consequently apoptosis. Thus, with the blockade of mdm2, the accumulation of p53, p21, pRB occurs, restoring the formation of the pRB-E2F complex, stopping the cell cycle and enabling the activation of apoptosis.

In addition to binding to p53 and blocking apoptosis, mdm4 has the ability to increase the stability of p53 by binding to mdm2 through a conserved domain so that the interaction between mdm2-mdm4 complexes inhibits targeted p53 degradation by mdm2.[52]

The mdm4 protein also regulates pRB levels by mdm2-mediated ubiquitination, being inhibited by mdm4 due to competition between mdm2-mdm4 by binding sites in the C-terminal domain of pRB.[39] Polymorphisms and mutations in MDM4 have been frequently studied because of the impact on the regulation of p53 and pRB and the association of risk for some types of cancer.[53]

CONCLUSION

In most cancers, these pathways are impaired by mutations in TP53, inactivation of the CDKN2A gene or

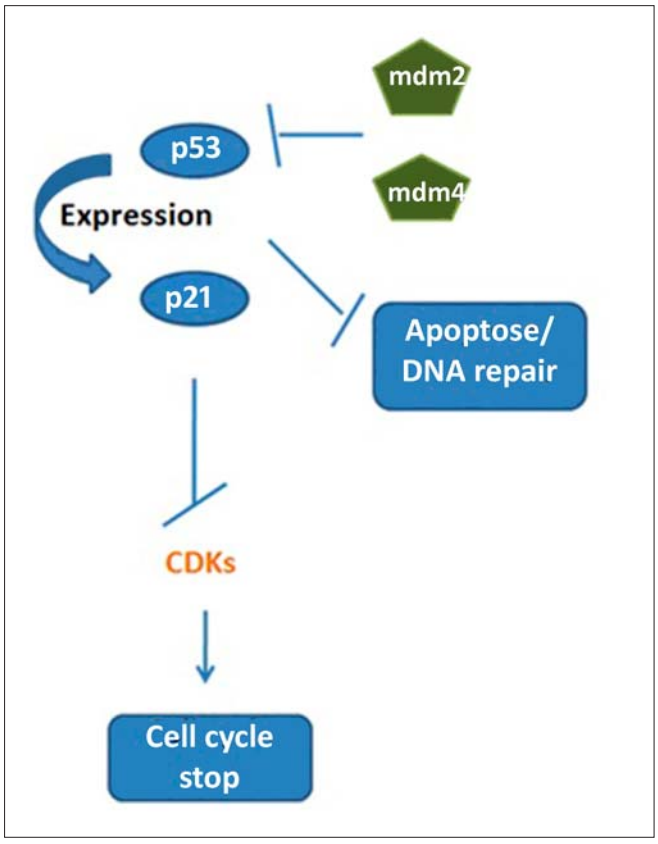


Figure 5. Normally, p53 activates p21 expression leading to inactivation of CDKs and cell cycle arrest. The mdm2 and mdm4 proteins when blocking p53 also block apoptosis and DNA repair.

amplification of MDM2. Nutlin-3a-like molecules weaken the mdm2-p53 interaction by impairing the survival of tumor cells in retinoblastoma.[54] Expression of MDM4 in the absence of MDM2 suggested a mode of regulation of p53. With the absence of MDM2, the effects of Nutlin-3a were related to inhibition of tumorigenesis mainly by blocking the mdm4-p53 interaction.[54] Previous studies have shown that the high level of MDM2 expression is crucial for the proliferation and survival of retinoblastoma cells.[54]

Many functions of pRB are related to genomic instability, cancer associated with poor prognosis, tumor heterogeneity and development of therapeutic resistance. Signaling pathways that influence pRB and retinoblastoma have been shown here. All components are critical for understanding cell cycle control and activation of apoptosis. Loss-of-function mutations in each molecule comprising this large pathway can generate responses that alter cellular behavior, leading to uncontrolled cell proliferation, chromosomal instability and tumorigenesis.[54]

Abstract

Retinoblastoma is a childhood ocular tumor often caused by the biallelic inactivation of the RB1 *gene affecting children up to 5 years of age. A retinoblastoma protein (pRB), encoded by the tumor suppressor gene* RB1*, is responsible for the regular progression of the G1 phase to the*

phase S of the cell cycle. This protein forms a complex with the transcriptional factor E2F causing the cell cycle to remain in the G0/G1 stage. With a phosphorylation of cyclin-dependent kinases (CDK), the phosphorylation of the RB protein is activated and the complex formed with E2F is disrupted, with the advancement of the cell cycle to an S phase and cell proliferation. All the control of cell proliferation is regulated not only by the complex formed by RB and E2F proteins, but also by other proteins that participate in and/or interfere in this cell division control mechanism, such as mdm2, mdm4 and p21 proteins.

Keywords
Retinoblastoma protein; retinoblastoma; cell cycle proteins

REFERENCES

1. Mohd Khalid MK, Yakob Y, Md Yasin R, Wee Teik K, Siew CG, Rahmat J, et al. Spectrum of germ-life RB1 gene mutations in Malaysian patients with retinoblastoma. Mol Vis. 2015; 21:1185-90.
2. Scollon S, Anglin AK, Thomas M, Turner JT, Wolfe Schneider K. A comprehensive review of pediatric tumors and associated cancer predisposition syndromes. J Genet Couns. 2017;26(3):387-43.
3. Orjuela MA, Cabrera-Muñoz L, Paul L, Ramirez-Ortiz MA, Liu X, Chen J, et al. Risk of retinoblastoma is associated with a maternal polymorphism in dihydrofolate reductase (DHFR) and prenatal folic acid intake. Cancer. 2012 Dec 1;118(23):5912-9.
4. Rodriguez-Galindo C, Orbach DB, VanderVeen D. Retinoblastoma. Pediatr Clin North Am. 2015 Feb;62(1):201-23.
5. Selistre SGA, Maestri MK, Santos-Silva P, Schüler-Faccini L, Guimarães LSP, Giacomazzi J, et al. Retinoblastoma in a pediatric oncology reference center in Southern Brazil. BMC Pediatr. 2016; 16:48.
6. Knudsen ES, Knudsen KE. Tailoring to RB: tumor suppressor status and therapeutic response. Nat Rev Cancer. 2008;8(9):714-24
7. Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, Mills N, Fuller C, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. Nature. 2006 Nov 2;444(7115):61-6.
8. Benavante CA, Dyer MA. Genetics and epigenetics of human retinoblastoma. Annu Rev Pathol. 2015;10:547-62
9. Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, Eagle JR, Tucker S, Yandell DW et al. Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. Genomics. 1993;17(3):535-43.
10. Kalsoom S, Wasim M, Afzal S, Shahzad MS, Ramzan S, Awan AR, et al. Alterations in the RB1 gene in Pakistani patients with retinoblastoma using direct sequencing analysis. Mol Vis. 2015 Sep 17;21:1085-92.
11. Dyson N. The regulation of E2F by pRB- family proteins. Genes Dev. 1998;12(15):2245-62.
12. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. Genes Dev. 2016;30(13):1492-502.
13. Vélez-Cruz R, Johnson DG. The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: pushing back against genome instability on multiple fronts. Int J Mol Sci. 2017 Aug 16;18(8). pii: E1776).
14. Sage J. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. Genes Dev. 2012 Jul 1;26(13):1409-20.
15. Ottaviani D, Alonso C, Szijan I. Uncommon RB1 somatic mutations in a unilateral retinoblastoma patient. Medicina (B Aires). 2015;75 (3):137-41.
16. Mateu E, Sánchez F, Nájera C, Beneyto M, Castell V, Hernández M, et al. Genetics of retinoblastoma: a study. Cancer Genet Cytogenet.1997;95(1):40-50.
17. Ahani A, Akbari MT, Saliminejad K, Behnam B, Akhondi MM, Vosoogh P, et al. Screening for large rearrangements of the *RB1* gene in Iranian patients with retinoblastoma using multiplex ligation-dependent probe amplification. Mol Vision. 2013;19:454-62.
18. Huang PH, Cook R, Mittnacht S. RB in DNA repair. Oncotarget. 2015;6(25):20746-7.
19. Di Fiore R, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R. *RB1* in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. J Cell Physiol. 2013 Aug;228(8):1676-87.
20. Henley SA, Dick FA. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. Cell Div. 2012 Mar 14;7(1):10.
21. Dahiya A, Gavin MR, Luo RX, Dean DC. Role of the LXCXE binding site in Rb function. Mol Cell Biol. 2000;20(18):6799-805.
22. Uchida C. Roles of pRB in the regulation of nucleosome and chromatin structures. Biomed Res Int. 2016;2016:5959721.
23. Longworth MS, Dyson NJ. pRB, a local chromatin organizer with global possibilities. Chromosoma. 2010 Feb;119(1):1-11.
24. Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. Cell Death Differ. 2018 Jan; 25(1):114-132.
25. Pimentel M, Rebouças CS, Gallo C. Genética Essencial. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2013.
26. Yee AS, Reichel R, Kovesdi I, Nevins JR. Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multicomponent complex. EMBO J. 1987 Jul;6(7):2061-8.
27. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins Jr. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. Cell. 1991 Jun 14;65(6):1053-61.
28. Sellers WR, Kaelin WG Jr. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of Human Cancer. J Clin Oncol. 1997;15(11):3301-12.
29. Bell LA, Ryan KM. Life and death decisions by E2F-1. Cell Death Differ. 2004;11(2):137-42.
30. Fischer M, Uxa S, Stanko C, Magin TM, Engeland K. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. Sci Rep. 2017 Jun 1;7(1):2603.
31. Indovina P, Pentimalli F, Casini N, Vocca I, Giordano A. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: Cell fate control and implications for cancer therapy. Oncotarget. 2015 Jul 20;6(20):17873-90.
32. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013;14(5):297-306.
33. Perri F, Pisconti S, Della Vittoria Scarpati G. P53 mutations and cancer: a tight linkage. Ann Transl Med. 2016 ;4(24):522.
34. Crosby ME, Almasan A. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. Cancer Biol Ther. 2004;3(12):1208- 11.
35. Ganguly A, Shields CL. Differential gene expression profile of retinoblastoma compared to normal retina. Mol Vis. 2010;16:1292-30.
36. McEvoy JD, Dyer MA. Genetic and epigenetic discoveries in human retinoblastoma. Crit Rev Oncog. 2015; 20(3-4): 217-25.
37. Jiao Y, Jiang Z, Wu Y, Chen X, Xiao X, Yu H. A functional polymorphism (rs937283) in the MDM2 promoter region is associated with poor prognosis of retinoblastoma in Chinese Han population. Sci Rep. 2016 Aug 10;6:31240.
38. Kato MV, Shimizu T, Ishizaki K, Kaneko A, Yandell DW, Toguchida J, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 17 and mutation of the p53 gene in retinoblastoma. Cancer Lett. 1996 Aug 23;106(1):75-82.
39. McEvoy J, Ulyanov A, Brennan R, Wu G, Pounds S, Zhang J, et al. Analysis of MDM2 and MDM4 single nucleotide polymorphisms, mRNA splicing and protein expression in retinoblastoma. Plos One. 2012; 7(8), e42739.
40. de Oliveira Reis AH, de Carvalho IN, de Sousa Damasceno PB, Ferman SE, Lucena E, Lopez-Camelo JS, et al. Influence of MDM2 and MDM4 on development and survival in hereditary retinoblastoma. Pediatr Blood Cancer. 2012 Jul 15;59(1):39-43.
41. Lu Y, Gao K, Zhang M, Zhou A, Zhou X, Guan Z, et al. Genetic association between CDKN1B rs2066827 polymorphism and susceptibility to cancer. Medicine (Baltimore). 2015;94(46): e1217.
42. Landa I, Montero-Conde C, Malanga D, De Gisi S, Pita G, Leandro-Garcia LJ, et al. Allelic variant at -79(C>T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. Endocr Relat Cancer. 2010 Jun 1;17(2):317-28.

43. Tonelli F, Giudici F, Giusti F, Marini F, Cianferotti L, Nesi G, et al. A heterozygous frameshift mutation in exon 1 of CDKN1B gene in a patient affected by MEN4 syndrome. Eur J Endocrinol. 2014;171 (2):K7-K17.
44. Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Li Ge, et al. A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. Cancer Res. 2004;64 (6):1997-9.
45. Chen R, Liu S, Ye h, Li J, Du Y, Chen L, et al. Association of p53 rs1042522, MDM2 rs2279744, and p21 rs1801270 polymorphisms with retinoblastoma risk and invasion in a Chinese population. Sci Rep. 2015 Aug 20;5:13300
46. Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Shao ZM, Ordonez JV, Fontana JA. Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. Oncogene. 1994;9(12):3407-15.
47. Akashi M, Osawa Y, Koeffler HP, Hachiya M.. p21WAF1 expression by an activator of protein kinase C is regulated mainly at the post-transcriptional level in cells lacking p53: important role of RNA stabilization. Biochem J. 1999 Feb 1;337(Pt 3):607-16.
48. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli M, Paladini G, et al. Quantitative p21waf1/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. Int J Cancer. 2001 Mar 20;95(2):128-34.
49. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. Nat Rev Cancer. 2015 Jul;15(7):397-408. Erratum in: Nat Rev Cancer. 2015 Aug;15(8):509.
50. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Arjona D, Lomas J, de Campos JM, et al. CpG island. Methylation status and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumors. Br J Cancer. 2003 Jan 13;88(1):109-14.
51. Aberg E, Saccoccia F, Grabherr M, Ore WYJ, Jemth P, Hultqvist G. Evolution of the p53-MDM2 pathway. BMC Evol Biol. 2017 Aug 3;17(1):177.
52. Strachan GD, Rallapalli R, Pucci B, Lafond TP, Hall DJ. A transcriptionally inactive E2F-1 targets the MDM family of proteins for proteolytic degradation. J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):45677-85.
53. Reincke S, Govbakh L, Wilhelm B, Jin H, Bogdanova N, Bremer M, et al. Mutation analysis of the MDM4 gene in German breast cancer patients. BMC Cancer. 2008 Feb 15;8:52.
54. Qi DL, Cobrinik D. MDM2 but not MDM4 promotes retinoblastoma cell proliferation through p53-independent regulation of MYCN translation. Oncogene. 2017 Mar 30;36(13):1760-1769.

Correspondência
Renata Mendes de Freitas
Av. Brasil, 4353, Manguinhos
Pavilhão Leônidas Deane, 6º andar, sala 617
21040-900 - Rio de Janeiro-RJ, Brasil

Febre Amarela

Yellow Fever

Aridyana Caroline da Silva[1]
Camilla Maria Campelo de Araújo[1]
Maria Patrícia Gomes Barbosa[1]
Nauily Queiroz Frota[1]
Patrícia Bruna da Silva Sá[1]
Tayná Linhares de Sousa[1]
Vanessa dos Santos Timbó[1]
Andréa Bessa Texeira[2]

Resumo
A Febre Amarela é uma doença infecciosa aguda, caracterizada por febre. Não é transmissível e tem duração de no máximo 12 dias. As manifestações clínicas revelam as fases evolutivas da doença. Este trabalho consiste em um artigo de atualização, no qual foi realizado um estudo bibliográfico interpretativo e descritivo baseado na literatura atual sobre a Febre Amarela no Brasil. Esta doença é causada por um arbovírus que pertence à família *Flaviviridae*. A expansão da área de vacinação é muito discutida atualmente. Segundo o Ministério da Saúde, em 2016, foram confirmados seis casos de Febre Amarela no Brasil. Conforme a Sociedade Brasileira de Infectologia, a fisiopatologia desta doença é a mesma no ciclo urbano e no silvestre. O seu diagnóstico pode ser dividido em clínico e laboratorial, pois são as duas formas de confirmar a doença em indivíduos. As medidas preventivas consistem, principalmente, na imunização, medidas de proteção e no controle do vetor. Esta pesquisa fornece dados atuais em bases confiáveis, podendo ser utilizada para futuros trabalhos.

Palavras-chave
Febre Amarela; etiologia; epidemiologia; diagnóstico

INTRODUÇÃO

A Febre Amarela é uma doença infecciosa aguda, caracterizada por febre, não é transmissível e tem duração de no máximo 12 dias. As manifestações clínicas revelam as fases evolutivas da doença. A gravidade dessa patologia é variável, a forma grave pode levar à morte, caracterizada por insuficiência hepática e renal.(1)

Os primeiros casos de febre amarela foram descritos no Brasil a partir do século XVII, e, após décadas, ainda são encontrados inúmeros relatos da doença, de modo sazonal e em várias regiões do país. Atualmente, o número estimado de casos graves na América do Sul, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é de 84.000-170.000, com aproximadamente 29.000- 60.000 mortes anualmente.(2)

A partir deste contexto, com o objetivo de trazer um informe atual sobre a doença, este artigo de atualização foi elaborado.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho consiste em um artigo de atualização. Tendo como apoio, pesquisas realizadas em bases de dados na internet, nos sites *Scientific Electronic Library Online* – SciELO e Google acadêmico, incluindo revistas, artigos, sites e notas do Ministério da Saúde. Assim, foi realizado um estudo bibliográfico interpretativo e descritivo baseado na literatura atual sobre a Febre Amarela no Brasil.

Os descritores utilizados em busca, nos periódicos, foram: Febre Amarela, etiologia, epidemiologia, diagnóstico.

AGENTE ETIOLÓGICO

A Febre Amarela é causada por um arbovírus que pertence à família *Flaviviridae.* A doença é endêmica, ocorrendo apenas nas florestas tropicais do continente africano e da América Latina, provocando um grande impacto para a saúde pública.(2)

O *Aedes aegypti* é o vetor da infecção no ciclo urbano, sendo comumente encontrado nas cidades brasileiras. Já no ciclo silvestre os vetores são os mosquitos *Haemagogus* ou *Sabethes*, que vivem nas copas das árvores. Eles são também reservatórios do vírus e contaminam os primatas não humanos (PNH), que são apenas hospedeiros.(3)

[1]*Estudante. Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza – Fametro. Fortaleza-CE, Brasil.*
[2]*Docente. Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza – Fametro. Fortaleza-CE, Brasil.*

Instituição: Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza – Fametro. Fortaleza-CE, Brasil.

Recebido em 30/05/2018
Artigo aprovado em 07/11/2018
DOI: 10.21877/2448-3877.201800731

O vírus da Febre Amarela é um vírus RNA do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*. Adrian Stokes isolou esse vírus pela primeira vez em 1927, de um paciente de Gana. Algumas doenças, como dengue e encefalite de St. Louis são causadas por outros vírus da mesma família. Nas diversas cepas encontradas na América do Sul e no continente africano existem diferenças relacionadas ao genótipo.[2]

Em decorrência do último surto de Febre Amarela no Brasil, em 2017, pesquisas foram realizadas e demonstraram que os vírus pertencem ao subtipo genético da linhagem Sul Americana 1E. Porém, após aprofundamento na análise do genoma, foi descoberta a variação nas sequências genéticas associadas a proteínas que estão envolvidas no processo de replicação do vírus. Ou seja, puderam-se identificar modificações no código genético dos vírus.[4]

EPIDEMIOLOGIA

Um dos fatores muito discutidos atualmente diz respeito à expansão da área de vacinação, baseando-se na detecção do vírus pelo ciclo de transmissão silvestre e a inclusão da vacina destinada ao público infantil em todo o país. Isso constitui uma alternativa voltada para a redução dos riscos de reurbanização da doença, principalmente por se tratar do controle da infestação pelo *Aedes aegypti*.[1]

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde evidenciam 326 casos da doença e 156 óbitos no Brasil, referentes ao período de 2000 a 2012. Já no período de 2016 até março de 2017, 448 casos e 144 óbitos foram confirmados no país. Só no estado de Minas Gerais foram contabilizados 349 casos e 118 óbitos confirmados. Áreas que não eram consideradas endêmicas, como o estado do Espírito Santo, registraram 93 casos e 22 óbitos e o estado do Rio de Janeiro, três casos confirmados e um óbito, relativos ao período inicial do ano de 2017.[1]

A maior parte dos casos envolve, principalmente, a região sudeste e são de moradores das zonas rurais ou que tiveram contato com áreas silvestres.[5]

FISIOPATOLOGIA

Conforme a Sociedade Brasileira de Infectologia, a fisiopatologia da Febre Amarela é a mesma no ciclo urbano e silvestre. No urbano, a doença é uma antroponose, pela qual não se identificam animais como importância epidemiológica. O principal vetor é o *Aedes aegypti.* No ciclo silvestre, a Febre Amarela é uma zoonose, transmitida por mosquitos de hábitos silvestres, dos gêneros *Haemagogus* (*H. janthinomys* e *H. albomaculatus*) e *Sabethes* (*S. chloropterus*). A fonte de infecção primordial são primatas, principais hospedeiros e amplificadores do vírus, especialmente os macacos dos gêneros *Allouata* (macaco guariba), *Cebus* (macaco prego), *Atelles* e *Callithrix.* Além deles, mamíferos podem também ser reservatórios, como alguns marsupiais e roedores. Os seres humanos não imunes podem, acidentalmente, se infectar, penetrando em áreas enzoóticas.[6]

A Sociedade Brasileira de Infectologia ainda informa que 90% dos casos são assintomáticos ou oligossintomáticos. Quando sintomática (Tabela 1), pode ser leve, moderada, grave e maligna, com letalidade entre 5% a 10%, podendo atingir 50% nos casos graves, com manifestações icterohemorrágica e hepatorrenal. Cada uma das formas apresenta um estado clínico. Na forma leve, o quadro clínico é autolimitado com febre e cefaleia com duração de dois dias. Na forma moderada, o paciente apresenta, por dois a quatro dias, sinais e sintomas de febre, cefaleia, mialgia e

Tabela 1 - Quadros clínicos da Febre Amarela

Classificação	Sintomas	Alterações Laboratoriais	Tratamento
leve	Febre Mialgia Dor de cabeça Perda de apetite Bradicardia	Leucopenia AST e ALT < 2 x o limite normal Plaquetas normais	Dipirona Fluidoterapia oral (ORT) 60 ml/kg/dia Visitas ambulatoriais diárias
Moderada	Os anteriores, mais: Dor abdominal Vômitos Icterícia leve	Leucopenia Contagem baixa de plaquetas AST e ALT <10x Bilirrubina <5x	Admissão na enfermaria Controle de diurese Fluidos IV, se necessário Reavaliação clínica a cada 4 horas Análises laboratoriais diárias
Grave/maligna	O acima, mais: Dor abdominal intensa Vômito frequente Icterícia Sangramento Órgão e falha do sistema (oligúria, AKF, diminuição do nível de consciência)	Leucopenia Contagem de plaquetas severamente baixa AST e ALT> 10x Bilirrubina aumentada Aumento do PT / aPTT Níveis de fibrinogênio deprimido D-dímero aumentado Aumento de ureia e creatinina Hipoglicemia	Admissão na UTI Hidratação e euvolemia Hemodiálise Intubação Endotraqueal Transfusão de hemoderivados, se necessário

Adaptado de Novaes[2]

artralgia, congestão conjuntival, náuseas, astenia e alguns fenômenos hemorrágicos como epistaxe, podendo haver subicterícia. Nos quadros graves, após cinco a seis dias de período de incubação, o início dos sintomas é rápido e perdura por quatro a cinco dias com febre alta, acompanhada da diminuição da pulsação, cefaleia intensa, mialgia acentuada, icterícia, epistaxe, dor epigástrica e hematêmese e melena. A forma maligna é a mais grave, ocorre toxemia abrupta, náuseas, icterícia, hemorragias diversas e encefalopatia. Em torno de cinco a sete dias instala-se insuficiência hepatorrenal e coagulação intravascular disseminada. Apresenta alta letalidade, em torno de 50%. Além disso, podem ocorrer óbitos por lesões cardíacas tardias.[6]

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

No início da doença, a realização do método clínico isoladamente não é suficiente para diagnóstico, pois a clínica da Febre Amarela assemelha-se com outras doenças virais.[2]

Nas manifestações clínicas são considerados dados epidemiológicos, tais como visitas a áreas de risco, há 15 dias sem ter sido vacinado previamente ou ter sido vacinado dentro dos últimos trinta dias.[2]

Em quadros mais avançados, apresentam características clínicas com maiores indicativos à presença da Febre Amarela, como o aumento rápido das transaminases, em aproximadamente 48 a 72 horas, com predomínio de AST/TGO. Conforme é observado, o agravamento da doença pelos resultados do laboratório precede o agravamento clínico.[2]

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico é confirmado utilizando um método que consiste na amplificação molecular do vírus no sangue (método que assegura sensibilidade e especificidade, que pode até mesmo permitir a diferenciação do vírus silvestre da cepa vacinal), classicamente pode ocorrer até o quinto dia viral. Contudo, devem ser considerados casos nos quais a viremia chega a persistir até o décimo dia.[2]

Testes específicos para detecção de IgM e IgG são recomendados a partir do quinto dia. São testes sorológicos, que identificam a presença de anticorpos contra o vírus produzidos pelo organismo do paciente em resposta à infecção. Em caso de morte, o diagnóstico pode ser confirmado em vários tecidos em até 24 horas ou por imunohistoquímica.[2]

TRATAMENTO

Até o momento não existe nenhum antiviral específico para o tratamento da doença, portanto um suporte clínico hospitalar adequado é a maneira mais eficaz de diminuir a taxa de mortalidade.[7]

É importante informar aos pacientes com suspeita de Febre Amarela que a doença pode se agravar rapidamente. Quando isso acontece devem ser evitados medicamentos potencialmente hepatotóxicos, devendo ser administrados medicamentos com menor ação potencial no fígado, como a dipirona.[2]

PREVENÇÃO/CONTROLE

As medidas preventivas consistem, principalmente, na imunização, medidas de proteção e no controle do vetor:[8] a vacinação é uma das medidas mais eficazes de controle e prevenção da doença, pois estimula o sistema imunológico a produzir anticorpos capazes de destruir os micro-organismos patógenos.

A vacinação contra a Febre Amarela é disponibilizada em todo o Brasil, nas secretarias de saúde dos municípios, principalmente nos estados com maior incidência da doença, devendo ser administrada pelo menos dez dias antes do contato com áreas de risco de infecção pelo vírus.

As medidas de proteção a serem tomadas incluem o uso de roupas que cubram uma maior área corporal (Ex: calças, blusas de mangas compridas, botas) e o uso de repelentes sempre que for adentrar matas, ou regiões com risco de infecção.

O controle vetorial consiste em evitar que haja contato entre o doente e o mosquito transmissor, sendo necessária a utilização de telas em seu local de permanência, pois ele pode se tornar uma fonte de infecção. Ações de combate para controle vetorial devem ser realizadas nos municípios com maior taxa transmissão, e em áreas próximas, para que haja diminuição das taxas de infecção. As ações devem seguir as orientações do programa nacional de controle da dengue.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste artigo de atualização sobre Febre Amarela trazem informações recentes sobre seu agente etiológico, epidemiologia da doença nos últimos anos no Brasil, fisiopatologia com seus sinais e sintomas, diagnóstico clínico e laboratorial mais utilizados, medidas de tratamento, prevenção e controle. Esta pesquisa fornece dados atuais em bases confiáveis, podendo ser utilizada para futuros trabalhos.

Abstract

Yellow Fever is an acute infectious disease, characterized by fever. It is not transferable and lasts for a maximum of 12 days. The clinical manifestations reveal the evolutionary phases of the disease. This work consists of an update article, where an interpretative and descriptive bibliographic study was carried out based on the current literature on

Yellow Fever in Brazil. This disease is caused by an arbovirus belonging to the family Flaviviridae. *The expansion of the vaccination area is much discussed today. According to the Ministry of Health, in 2016, six cases of yellow fever were confirmed in Brazil. According to the Brazilian Society of Infectology, the pathophysiology of Yellow Fever is the same in the urban and wild cycle. The diagnosis of yellow fever can be divided into clinical and laboratory, as they are the two ways to confirm the disease in individuals. Preventive measures consist mainly of immunization, protective measures and vector control. This research provides current data on a reliable basis and can be used for future work.*

Keywords
Yellow Fever; etiology; epidemiology; diagnosis

REFERÊNCIAS

1. Cavalcante KRLJ, Tauil LP. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, 26(3):617-620, jul-set 2017.
2. Litvoc MN, Novaes CTG, Lopes MIBF. Yellow Fever. Rev Assoc Med Bras (1992). 2018 Feb;64(2):106-113.
3. Informe Técnico Vacina Febre Amarela - Setembro 2015.
4. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Ministério da Saúde. Febre amarela: IOC atua no diagnóstico laboratorial de casos. 2018. <https://portal.fiocruz.br/noticia/febre-amarela-ioc-atua-no-diagnostico-laboratorial-de casos>. Acesso em 29 de abril de 2018.
5. Ministério Da Saúde. Febre Amarela. <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42327-ministerio-da-saude-atualiza-casos-de-febre-amarela-2>. 2017.
6. Febre Amarela - Informativo Para Profissionais De Saúde. Sociedade Brasileira de infectologia. Associação Médica Brasileira (AMB). São Paulo. (atualizado em 13/02/2017).
7. Prefeitura Belo Horizonte - nota técnica. Fluxo Assistencial de Pessoa com Suspeita de Febre Amarela na Rede SUS-BH. 04/2017.
8. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará - Nota técnica para profissionais da saúde. Febre Amarela - janeiro 2018

Correspondência
Aridyana Caroline da Silva
Rua Conselheiro Estelita, 500 - Centro
60010-260 - Fortaleza-CE, Brasil

Perfil de resistência, etiologia e prevalência de patógenos isolados em uroculturas de gestantes atendidas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis, Rio Grande do Sul

Resistance profile and prevalence of isolated pathogens from urine cultures of pregnant women attended in a clinical analysis laboratory in the Veranópolis city, Rio Grande do Sul

Camila Pancotto[1]
Otávio von Ameln Lovison[2]
Fernanda Cattani[3]

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de ITU, analisando a faixa etária bem como o perfil de resistência aos antimicrobianos a partir da urocultura de gestantes. **Métodos:** Foi realizado um estudo observacional, descritivo e transversal por meio da análise de 538 laudos de urocultura de gestantes atendidas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis, Rio Grande do Sul, no período de abril de 2014 a abril de 2017. Os dados foram coletados a partir do sistema laboratorial Jalis e transcritos para uma planilha utilizando o programa Microsoft Office Excel® 2010. **Resultados:** Dos 538 laudos de uroculturas de gestantes analisados, 137 (25,5%) apresentaram crescimento bacteriano. Analisando a prevalência dos microrganismos, *Escherichia coli* foi o agente predominante (65%), apresentando maior resistência a ampicilina (53,4%) e a sulfametoxazol + trimetoprim (22,5%). **Conclusão:** A realização da urocultura durante o pré-natal é de extrema importância para garantir um diagnóstico precoce de ITU e iniciar uma antibioticoterapia adequada, a fim de evitar complicações maternas e fetais.

Palavras-chave

Escherichia coli; farmacorresistência bacteriana; gravidez; infecções urinárias

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é caracterizada pela presença e multiplicação de bactérias desde a uretra até os rins, ocasionando lesões de graus variáveis.[1-3] É uma patologia muito frequente que acomete pessoas de todas as idades, desde o recém-nascido até o idoso. A maior susceptibilidade feminina a desenvolver ITU ocorre devido às suas características anatômicas, dentre elas o menor comprimento da uretra e a maior proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal.[4,5]

Quanto à localização anatômica, as ITUs são classificadas como baixa (cistite) ou alta (pielonefrite). A cistite é o tipo mais comum de ITU, onde ocorre a inflamação da bexiga. Os principais sintomas incluem disúria, urgência para urinar, dor e piúria.[6-8] Entretanto, a forma mais grave de ITU é a pielonefrite, que pode tornar-se crônica, provocando lesão tecidual nos rins. Os sinais e sintomas clínicos incluem dor nas costas, febre, mal-estar, náuseas e vômitos.[6,9]

Durante a gestação ocorrem diversas alterações anatômicas, fisiológicas e hormonais na mulher que podem contribuir para o aparecimento de ITU. Observa-se que a urina da gestante apresenta um pH mais alcalino, tornando favorável o crescimento das bactérias presentes no trato urinário.[9] Além disso, a diminuição da capacidade dos rins de concentrar a urina, que passam a excretar menores quantidades de potássio e maiores de glicose, juntamente com os aminoácidos e produtos da degradação de hormônios, reduzindo a atividade antibacteriana desse fluido fornecendo um meio propício para a proliferação bacteriana.[10-12]

A ITU pode ser classificada como sintomática ou assintomática. A presença de crescimento bacteriano

[1]*Biomédica. Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves (CNEC) - Bento Gonçalves-RS, Brasil.*
[2]*Farmacêutico bioquímico. Especialista em Microbiologia Clínica. Mestre em Ciências Farmacêuticas. Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brasil.*
[3]*Biomédica. Docente da Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves (CNEC) - Bento Gonçalves-RS, Brasil.*

Instituição: Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves (CNEC) - Bento Gonçalves-RS, Brasil.

Recebido em 27/11/2018
Artigo aprovado em 29/05/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900799

compatível com ITU na urocultura com ausência de sintomas denomina-se bacteriúria assintomática (BA). Deve-se dar uma atenção especial aos casos de BA durante a gestação, devido ao fato de que, quando não tratada corretamente, aumenta em 30% as chances de evoluir para quadros de pielonefrite e pode ser associada a complicações maternas e perinatais durante a gestação.[13,14]

As complicações maternas decorrentes da ITU são secundárias à lesão tecidual provocada pelas endotoxinas bacterianas, dentre elas destacam-se a pré-eclâmpsia, anemia, endometrite, corioamnionite e choque séptico.[15-17] Também podem ser observadas complicações perinatais como trabalho de parto pré-termo, ruptura prematura da membrana amniótica, recém-nascidos com baixo peso, restrição de crescimento intrauterino, paralisia cerebral, retardo mental durante a infância e óbito perinatal.[2,9,15]

Com relação à etiologia das ITUs, as bactérias Gram-negativas são as mais frequentes, sendo *Escherichia coli* responsável, em alguns casos, por mais de 80% das ITUs.[1,18,19] Outras bactérias Gram-negativas são isoladas com menor frequência, tais como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, bactérias do gênero *Enterobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*. Verifica-se também a ocorrência de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.[5,18,20]

O diagnóstico precoce e um tratamento apropriado são indispensáveis para evitar o comprometimento do prognóstico materno e fetal. Deve-se levar em conta que, durante a gestação, o arsenal terapêutico antimicrobiano e as possibilidades de profilaxia são restritas, devido à resistência bacteriana e à toxicidade que alguns fármacos provocam em relação ao embrião/feto e placenta.[1,17] Desse modo, é essencial ter conhecimento sobre o microrganismo causador da infecção e sua susceptibilidade aos antimicrobianos, a fim de proporcionar um tratamento eficaz para as gestantes e combater o surgimento da resistência bacteriana.[12-19]

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência de ITU, analisando a faixa etária bem como o perfil de resistência aos antimicrobianos a partir da urocultura de gestantes atendidas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis, Rio Grande do Sul, no período de abril de 2014 até abril de 2017, através da consulta ao banco de dados.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e transversal realizado por meio da análise de laudos de urocultura de gestantes atendidas em um laboratório de análises clínicas de economia mista (rede pública e privada) da cidade de Veranópolis, RS, no período de abril de 2014 até abril de 2017. A coleta de dados foi obtida por meio da consulta ao sistema laboratorial Jalis e os resultados foram transcritos para uma planilha utilizando o programa Microsoft Office Excel® 2010. Foram consideradas apenas as informações indispensáveis ao estudo como a idade, resultado da urocultura e resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) das gestantes.

As semeaduras das amostras de urina foram realizadas pelo laboratório coparticipante em meio de cultura ágar CLED utilizando-se uma alça calibrada de 1μL (0,001 mL), após foram incubadas em estufa bacteriológica por um período de 24-48 horas à temperatura de 35 ± 1ºC. A avaliação do crescimento bacteriano foi realizada segundo as recomendações do documento *Cumitech 2C - Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections*[21] da Sociedade Americana de Microbiologia (ASM). O crescimento avaliado como relevante foi repicado para o meio cromogênico (ChromID CPS - Biomérieux), incubado de 4-6 horas e posteriormente encaminhado para o antibiograma e provas bioquímicas de identificação (Sistema Bactray I e II ou III - Laborclin), quando necessário.

O antibiograma foi realizado em ágar Mueller-Hinton (Biomérieux) utilizando a técnica de disco-difusão, e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliado de acordo com o tamanho dos halos de inibição, segundo o documento M100 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) do ano corrente, sendo classificados como sensível, intermediário ou resistente.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, conforme o parecer nº 2.407.865.

RESULTADOS

Foram analisados os laudos de 538 uroculturas de gestantes, das quais 137 amostras (25,5%) apresentaram crescimento bacteriano positivo. Dentre as 137 gestantes com urocultura positiva, a faixa etária variou entre 14 a 41 anos, com a média de idades igual a 22,6 anos e desvio padrão de 6,9 (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição por idade das gestantes com uroculturas positivas realizadas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis-RS, no período de abril de 2014 a abril de 2017

Faixa etária	N	%
14 a 17 anos	25	18,2%
18 a 21 anos	33	24,1%
22 a 25 anos	22	16,1%
26 a 29 anos	21	15,3%
30 a 33 anos	23	16,8%
34 a 37 anos	9	6,6%
38 a 41 anos	4	2,9%
Total	137	100,0%

Das 137 uroculturas positivas, 89 apresentaram crescimento de *E. coli* (65%). A segunda bactéria mais prevalente foi o *S. saprophyticus*, que correspondeu a 9,5% (13), seguida por *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*, cujas prevalências foram de 4,4% (6) (Figura 1).

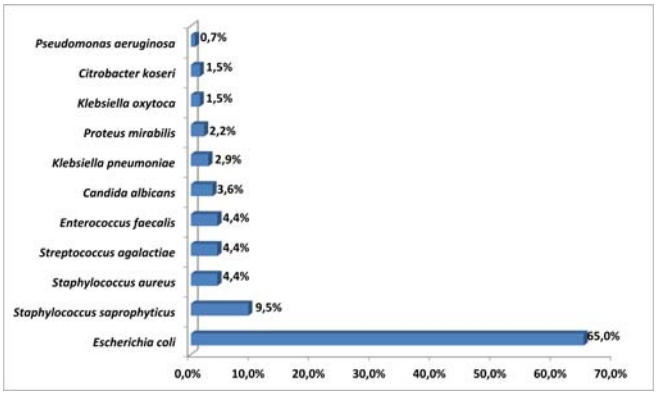


Figura 1. Agentes patogênicos isolados em 137 amostras de uroculturas de gestantes realizadas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis - RS, no período de abril de 2014 a abril de 2017.

A Tabela 2 mostra o perfil de resistência da *E. coli* frente aos antimicrobianos testados pelo laboratório de análises clínicas durante o período do estudo. Pode-se observar uma elevada resistência à ampicilina (53,4%), seguidos de sulfametoxazol + trimetoprim (22,5%), ampicilina + sulbactam (20,4%), nitrofurantoína (15,3%) e amoxicilina + clavulanato (15,3%).

Tabela 2 - Perfil de resistência bacteriana da *E. coli* isoladas nas amostras de uroculturas realizadas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis-RS, no período de abril de 2014 a abril de 2017

Antibióticos	n	%	Total
Ampicilina	47	53,4%	88
Sulfametoxazol + Trimetoprim	20	22,5%	89
Ampicilina + Sulbactam	11	20,4%	54
Nitrofurantoína	13	15,3%	85
Amoxicilina + Clavulanato	13	15,3%	85
Cefalexina	5	14,7%	34
Piperacilina + Tazobactam	4	6,7%	60
Cefotaxima	2	6,3%	32
Ceftriaxona	5	6,3%	80
Norfloxacina	5	6,3%	80
Ceftazidima	2	6,1%	33
Ciprofloxacina	5	5,8%	86
Gentamicina	4	4,6%	87
Aztreonam	2	4,2%	48
Cefepima	2	2,5%	81
Amicacina	0	0,0%	81
Imipenem	0	0,0%	58
Meropenem	0	0,0%	58
Ertrapenem	0	0,0%	39

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo, 25,5% das uroculturas foram positivas, ficando acima do valor relatado pelo Ministério da Saúde[22] que destacou uma prevalência de ITU em gestantes entre 17% a 20%. Entretanto, estudos semelhantes realizados por Nascimento et al.[2] e Oliveira et al.[18], constataram uma prevalência de 29% e 38,4%, respectivamente, de gestantes com uroculturas positivas.

Com relação à idade das gestantes foi observada uma média de 22,6 anos, sendo importante ressaltar o elevado percentual de menores de 18 anos (18,2%) com uroculturas positivas. Resultados similares a esse também foram descritos na literatura.[2,15,19]

Dentre os microrganismos causadores de ITU, *E. coli* foi o uropatógeno mais prevalente (65%). Silva et al.[15] e Filho et al.[4] encontraram resultados semelhantes em seus estudos, com um percentual de 67,9% e 69,9%, respectivamente. Fato que pode ser explicado pela presença de fatores de virulência que auxiliam na adesão e invasão bacteriana nas células do trato urinário, como as fimbrias tipo 1, expressas pela maioria da cepas de *E. coli*, e as fimbrias P, que se ligam a receptores específicos no tecido do epitélio renal.[10,18]

As enterobactérias fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal, tendo fácil acesso à uretra, sendo desse modo consideradas como os principais agentes causadores de ITU.[20] Além da *E. coli*, outros isolados como *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. agalactiae* foram observados neste estudo. Resultados similares foram descritos na literatura, porém com prevalências diferentes, reforçando o fato de que a espécie e a prevalência destes uropatógenos podem apresentar variação conforme o local estudado.[12,19,23]

O *S. saprophyticus* é responsável por até 15% dos casos de ITU não complicada, principalmente em mulheres jovens e sexualmente ativas.[5,11,24] No presente estudo, este microrganismo foi identificado como a segunda maior causa de ITU em gestantes (9,5%), sendo assim compatível com o que foi relatado por outros autores.[5,13,24]

De acordo com o Ministério da Saúde,[22] os medicamentos indicados para o tratamento de ITU durante a gestação são a ampicilina, amoxicilina, cefalexina e nitrofurantoína. Porém, ao avaliar o perfil de resistência da *E. coli,* foi possível constatar que esse microrganismo apresenta uma elevada taxa de resistência à ampicilina (53,4%). Valores próximos a esse foram encontrados por Silva et al.,[15] Schenkel et al.[19] e Filho et al.,[4] sendo de 45,5%, 44,9% e 44%, respectivamente. Entretanto, um estudo realizado no Peru (2012) obteve uma resistência ainda maior, chegando a 60,4%.[25] Em vista disso, apesar de ser considerada uma opção segura durante a gravidez, seu uso empírico deve ser desencorajado, devido ao risco de falha terapêutica.

As taxas de resistência ao sulfametoxazol + trimetoprim (22,5%) e à nitrofurantoína (15,3%) foram similares a um estudo realizado no interior do Rio Grande do Sul (2017), apresentando um percentual de resistência de 29% e 16%, respectivamente.[26] Entretanto, outro estudo realizado em São Paulo (2016) mostrou que 50% das cepas de *E. coli* eram resistentes ao sulfametoxazol + trimetoprim e 6,8% à nitrofurantoína.[20] Desse modo, pode-se ressaltar que o perfil de resistência aos antimicrobianos pode variar de acordo com a cultura local de prescrição e utilização dos mesmos, bem como disponibilidade na rede pública e perfil socioeconômico da população estudada.

Observou-se ainda que a gentamicina apresentou taxa de resistência de 4,6%. Dados semelhantes a este foram descritos por Santos et al.[10] e Silva et al.,[15] que encontraram uma resistência de 4,4% e 6,5%, respectivamente. Entretanto, um estudo realizado na Índia demonstrou que 87,4% das cepas de *E. coli* eram resistentes ao antimicrobiano citado.[27] Este fármaco é indicado pelo Ministério da Saúde para o tratamento de pielonefrite em casos de resistência aos antimicrobianos de primeira escolha, porém seu uso deve ser monitorado devido ao seu potencial nefrotóxico.[22,27]

Vale ressaltar a importância da realização de estudos como esse, que avaliam os principais agentes etiológicos causadores de ITU e o perfil de resistência aos antimicrobianos em uma determinada região, de modo que estas informações possam auxiliar no tratamento mais efetivo das gestantes e colaborar com novas pesquisas sobre o tema.

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que *E. coli* é o principal microrganismo causador de infecção do trato urinário, seguido por *S. saprophyticus* e *S. aureus*. Verificou-se também uma elevada resistência do principal agente etiológico à ampicilina e ao sulfametoxazol + trimetoprim.

A prevalência de uroculturas positivas observada neste estudo demonstra a importância da realização deste exame durante o pré-natal, a fim de garantir um diagnóstico precoce de ITU, identificando seu agente etiológico e traçando o perfil de resistência aos antimicrobianos, visando à obtenção de um tratamento eficaz e seguro para as gestantes.

Abstract

Objective: *The objective of this study was to determine the prevalence of UTI, analyzing the age range as well as the profile of antimicrobial resistance from the urine culture of pregnant women.* ***Methods:*** *An observational, descriptive and transversal study was carried out through analysis of 538 urine culture exam reports of pregnant women attended in a laboratory of clinical analyses in the city of Veranópolis, Rio Grande do Sul, in the period from April 2014 to April 2017. The data were collected from the laboratorial system Jalis and transcribed to a spreadsheet using the Microsoft Office Excel® 2010 program.* ***Results:*** *Of 538 reports of pregnant women urine cultures analyzed, 137 (25,5%) presented bacterial growth. Analyzing the prevalence of the microorganisms,* Escherichia coli *was the predominant agent (65%), showing a higher resistance to ampicillin (53,4%) and to sulfametoxazol + trimetoprim (22,5%).* ***Conclusion:*** *The urine culture realization during the prenatal is of extreme importance to guarantee an early diagnosis of UTI and to begin an appropriate antibiotic therapy, in order to avoid maternal and fetal complications.*

Keywords

Escherichia coli*; drug resistance, bacterial; pregnancy; urinary tract infections*

REFERÊNCIAS

1. Carvalho CI. Infecção do trato urinário associado às gestantes e o perfil do profissional farmacêutico no tratamento farmacoterapêutico. FACIDER Revista Científica. 2015;7(1):1-18
2. Nascimento WLS, Oliveira FM, Araújo GLS. Infecção do trato urinário em gestantes usuárias do Sistema Único de Saúde. Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde. 2012; 16(4):111-23.
3. Lacerda WC, Vale JS, Lacerda, WC, Cardoso, JLMS. Infecção urinária em mulheres: revisão da literatura. Saúde em Foco. 2015;7(1):282-95.
4. Filho AC, Camargo AS, Barbosa FA, Lopes TF, Motta YR. Estudo do perfil de resistência antimicrobiana das infecções urinárias em gestantes atendidas em hospital terciário. Rev Bras Clin Med. 2013;11(2):102-7.
5. Costa LC, Belém LF, Silva PMF, Pereira HS, Júnior EDS, Leite TR, et al. Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos. RBAC. 2010;42(3):175-80.
6. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.
7. Engelkirk PG, Duben-Engelkirk J, Burton GRW - Microbiologia para ciências da saúde. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
8. Braggiato CR, Lazar CAEL. Infecção do trato urinário não complicada na mulher: relato de caso e revisão da literatura. Rev Fac Cienc Med Sorocaba. 2016;18(4):231-4.
9. Duarte G, Marcolin AC, Quintana SM, Cavalli RC. Infecção urinária na gravidez. Rev Bras Ginecol Obstet. 2008;30(2):93-100.
10. Santos TKP, Sanches IT, Pittner E, Sanches HF. Identificação e perfil antimicrobiano de bactérias isoladas de urina de gestantes atendidas na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Prudentópolis, Paraná. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina. 2012;33(2):181-92.
11. Coelho F, Sakae TM, Rojas PFB. Prevalência de infecção do trato urinário e bacteriúria em gestantes da clínica ginecológica do Ambulatório Materno Infantil de Tubarão-SC no ano de 2005. Arquivos Catarinenses de Medicina. 2008;37(3):44-51.
12. Pereira AC, Bordignon JC. Infecção urinária em gestantes: perfil de sensibilidade dos agentes etiológicos de gestantes atendidas pelo SUS na cidade de Palmas - PR. RBAC. 2011;43(2):96-9.
13. Darzé OISP, Barroso U, Lordelo M. Preditores clínicos de bacteriúria assintomática na gestação. Rev Bras Ginecol Obstet. 2011;33(8): 196-200.
14. Ferreira RG, Inácio MM, Marot RP, Gonçalves CF, Cardoso M, Amaral WN, et al. Infecção urinária multirresistente na gravidez. Femina. 2017;45(4):249-56.
15. Silva LM, Macedo CFC, Vasconcelos DP, Gomides MDA, Sadoyama G. Escherichia coli isoladas de infecção urinária em gestantes: perfil de resistência aos antimicrobianos. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia. 2014;0(19): 231-9.
16. Pagnonceli J, Colacite J. Infecção urinária em gestantes: revisão da literatura. Uningá Review. 2016;26(2):26-30.
17. Mata KS, Santos AAP, Silva JMO, Holanda BL, Silva FCL. Complicações causadas pela infecção do trato urinário na gestação. Espaço para a Saúde. 2014;15(4):57-63.

18. Oliveira RA, Ribeiro EA, Gomes MC, Coelho DD, Tomich GM. Perfil de suscetibilidade de uropatógenos em gestantes atendidas em um hospital no sudoeste do estado do Pará, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2016;7(3):43-50.
19. Schenkel DF, Dallé J, Antonello VS. Prevalência de uropatógenos e sensibilidade antimicrobiana em uroculturas de gestantes do Sul do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2014;36(3):102-6.
20. Freitas BVL, Germino RV, Trino LM, Diório SM, Fusaro AE. Prevalência e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de uropatógenos em pacientes atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. RBAC. 2016;48(4):375-80.
21. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. Cumitech 2C - Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. 1ª ed. Washington, USA: ASM Press; 2009.
22. Ministério da Saúde. Gestação de alto risco: Manual Técnico. 5ª ed. Brasília: Editora MS; 2012.
23. Pigosso YG, Silva CM, Peder LD. Infecção do trato urinário em gestantes: incidência e perfil de suscetibilidade. Acta Biomed Bras. 2016;7(1):64-73.
24. Kline KA, Ingersol MA, Nielsen HV, Sakinc T, Henriques-Normark B, Gatermann S, et al. Characterization of a novel murine model of Staphylococcus saprophyticus urinary tract infection reveals roles for Ssp and SdrI in virulence. Infect Immun. 2010;78(5):1943-51.
25. Luján DA, Luján LM, Mamani E. Resistência a antibióticos de cepas Escherichia coli isoladas de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade - cidade de Lima, Peru. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. 2012;14(1):17-20.
26. Salton G, Maciel MJ. Prevalência e perfil de resistência de bactérias isoladas em uroculturas de pacientes de uma cidade do interior do Rio Grande do Sul. Ciência & Saúde. 2017;10(4):194-9.
27. Sibi G, Kumari P, Neema K. Antibiotic sensitivity pattern from pregnant women with urinary tract infection in Bangalore, India. Asian Pac J Trop Med. 2014;7(1):S116-20.

Correspondência
Camila Pancotto
Rua Arlindo Franklim Barbosa, 460 - São Roque
95700-000 - Bento Gonçalves-RS, Brasil

Avaliação microscópica do sedimento urinário no exame de urina de rotina: comparação entre dois métodos

Microscopic evaluation of urinary sediment on routine urinalysis: comparison between two methods

Danilo Rafael Meira Ribeiro Batista[1]
Antonnyo Palmielly Diógenes Lima[2]
Goretti Nascimento Santos[3]
Rand Randall Martins[4]
Vivian Nogueira Silbiger[3]
Marcela Abbott Galvão Ururahy[3]

Resumo

Objetivo: O objetivo foi avaliar a concordância entre o método de sedimentoscopia proposto pela Associação Brasileira de Normas Técnicas e o método proposto pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. **Métodos:** A partir da urina de nove indivíduos, foram obtidas 72 amostras analisadas por ambos os métodos. Cada amostra foi examinada por quatro avaliadores. A concordância entre os métodos foi medida através do coeficiente de correlação de Pearson (r) para as variáveis contínuas e o coeficiente de concordância kappa (k) para as categóricas. **Resultados:** Houve concordância entre os métodos para a quantificação de cilindros leucocitários (97,2%, κ = 0,61, p<0,01), e presença de cristais de oxalato de cálcio (77,8%, κ = 0,43, p=0,04), cilindros hialinos (88,9%, κ = 0,51, p=0,04), sais de uratos amorfos (83,3%, κ = 0,59, p=0,03), fios mucosos (83,3%, κ = 0,48, p=0,04) e leveduras (75,9%, κ = 0,54, p=0,04). Os métodos tiveram correlação moderada quanto ao número de hemácias (r = 0,56, p=0,04) e células epiteliais (r = 0,73, p=0,04). Destaca-se um maior tempo de processamento e leitura da amostra para o método proposto pela SBPC/ML (23,4 min) quando comparado com o da ABNT NBR 15268 (16,6 min, p<0,01). **Conclusão:** Embora os métodos propostos tenham apresentado concordância entre muitos dos parâmetros avaliados, os principais achados associados a processos infecciosos e inflamatórios como bacteriúria e leucocitúria, comuns no exame de urina, precisam ser mais bem investigados. Além disso, é importante que, de acordo com a metodologia empregada, o tempo de processamento e a logística técnica/laboratorial sejam adequados.

Palavras-chave

Urina; métodos; técnicas de laboratórios clínicos

INTRODUÇÃO

A observação da urina com finalidade diagnóstica faz parte da história da medicina, desde Hipócrates no século V aC., posteriormente surgiram classificações (Tratado de Uroscopia, Magnus Theophilus, século VI), mas a introdução da microscopia (Pierre Rayer, Paris, 1830) e o emprego de câmaras de contagem pelo médico escocês Thomas Addis destacaram sua importância como ferramenta diagnóstica.[1,2] Atualmente, o exame de urina apresenta papel crucial na clínica, baseia-se na análise físico-química da amostra e na avaliação microscópica do sedimento concentrado por centrifugação (sedimentoscopia).

A avaliação física ou macroscópica classifica a urina quanto ao volume, cor, aspecto e densidade, enquanto que a análise química determina a presença de proteínas, glicose, corpos cetônicos, hemoglobina, urobilinogênio, nitritos e o pH urinário.[3] A sedimentoscopia busca identificar padrões relacionados à presença de leucócitos, hemácias, células epiteliais, cilindros, filamentos de muco, cristais, sais amorfos, leveduras, espermatozoides, parasitas e bactérias.[4] Do ponto de vista metodológico, o exame

[1]*Farmacêutico, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.*
[2]*Mestre em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.*
[3]*Professor Doutor, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.*
[4]*Professor Doutor, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.*

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse
Suporte financeiro: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.

Recebido em 14/11/2018
Artigo aprovado em 13/12/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900790

de urina é pouco padronizado, demorado e vulnerável a deficiências técnicas do profissional que realiza a análise, sobretudo a sedimentoscopia, o que pode influenciar na interpretação dos resultados e diagnóstico dos pacientes.[5-8] Estas características do exame de urina relacionadas a múltiplas etapas, maior probabilidade de erro e resultados inconsistentes, implica a necessidade de validação e avaliação constante deste método para minimizar condutas clínicas inadequadas.[8,9] Contudo, apesar das limitações, ainda é universalmente utilizado para a caracterização e prognóstico de doenças do trato urinário.[5]

Em 2005, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) em parceria com o Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico In Vitro publicou a NBR 15268 com o objetivo de descrever os procedimentos, critérios e requisitos mínimos para a realização do exame de urina no laboratório clínico.[3] Posteriormente, o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) apontou adequações relacionadas à bacteriúria. Mais recentemente, em 2017, a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial publica a 1ª edição do livro: "Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Realização de exames em urina", normatizando a análise físico-química e sedimentoscopia de urina. Comparativamente, o método descrito na NBR 15268 diverge em alguns aspectos das SBPC/ML.

Apesar da importância da uniformização de condutas na execução da análise de urina, sobretudo em relação à microscopia, a literatura é escassa em estudos comparativos de diferentes técnicas. Logo, o objetivo deste estudo é avaliar a concordância entre dois métodos de sedimentoscopia padronizados para a realização do exame de urina de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas amostras do jato médio da primeira micção matinal de nove pacientes com idade entre 18 e 35 anos, de ambos os sexos, não identificados, que seriam desprezadas pelo Laboratório Integrado de Análises Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Todos os pacientes receberam o frasco coletor universal esterilizado e instruções para a coleta, conforme as recomendações da ABNT - NBR 15268.[3] A amostra de cada paciente foi fracionada em duas alíquotas, processadas em seguida de acordo com as recomendações pré-analíticas da ABNT - NBR 15268 e da SBPC/ML.

Os tubos com as amostras foram identificados aleatoriamente com números (1 a 18) por um colaborador não envolvido com o estudo, impossibilitando que o avaliador identificasse a correspondência entre os tubos das amostras e os dois métodos propostos (ABNT - NBR 15268 e SBPC/ML).

A sedimentoscopia foi realizada por quatro avaliadores diferentes, cada um recebeu 18 fichas de avaliação, nove fichas de cada método, totalizando 72 fichas preenchidas pelos avaliadores.

O tempo de leitura das lâminas foi monitorado e registrado, mas não informado aos avaliadores durante o processo. Todas as etapas do exame de urina foram executadas, porém os dados utilizados no estudo foram obtidos a partir de sedimentoscopia. A média apresentada nos laudos foi reportada em elementos por campo.

Processamento das amostras segundo os métodos utilizados

O processamento das amostras para o método proposto pela ABNT - NBR 15268 consistiu na transferência de 10 mL de urina previamente homogeneizada para um tubo de fundo cônico, com posterior análise química via tira reativa. Em seguida, os tubos foram centrifugados com rotação de 1.500 rpm durante cinco minutos (centrífuga Fanem, 206 bl, Brasil). O sobrenadante foi decantado por inversão do tubo, restando aproximadamente 200 µL de sedimento urinário. Após homogeneização do sedimento, 20 µL foram depositados sobre lâmina acrescida de lamínula de 22 mm x 22 mm para avaliação microscópica (Olympus, cx21 fs, Filipinas). Avaliaram-se dez campos microscópicos onde células epiteliais e cilindros foram observados no aumento de 100 vezes; leucócitos, hemácias, cristais e outros elementos em 400 vezes.[3]

Já o método proposto pela SBPC/ML consistiu na transferência de 10 mL de urina previamente homogeneizada para um tubo de fundo cônico com posterior análise química via tira reativa. Em seguida os tubos foram centrifugados com rotação de 1.500 rpm durante dez minutos (centrífuga Fanem, 206 bl, Brasil). Imediatamente após, 9,5 mL de sobrenadante foram removidos com auxílio de uma pipeta. O volume restante de 0,5 mL foi homogeneizado e um volume de 50 µL foi depositado sobre lâmina acrescida de lamínula de 32 mm x 24 mm para análise microscópica do sedimento (Olympus, cx21 fs, Filipinas). Avaliaram-se vinte campos onde o aumento de 400 vezes foi empregado para observação de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cristais e outros elementos; no pequeno aumento (100 vezes) foram observados apenas os cilindros.[10]

Análise estatística

Para a organização dos dados, foi utilizado o programa Microsoft Excel®, e a análise estatística foi realizada com o programa Stata versão 11 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). Todas as variáveis foram descritas por média ± desvio padrão, frequência absoluta e

relativa, conforme apropriado. Para a comparação dos resultados obtidos entre os métodos foi executada análise univariada para as variáveis contínuas (Teste t de Student) e categóricas (Teste do Qui Quadrado de Pearson), sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Para a avaliação da concordância entre os métodos, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r) para as variáveis contínuas e o coeficiente de concordância kappa (κ) para as categóricas. Os valores de r e κ acima de 0,40 foram considerados indicativos de concordância entre os métodos. Os valores de r e κ foram classificados da seguinte forma: concordância ruim quando igual a 0,00; fraca, de 0,01 a 0,20; leve de 0,21 a 0,40; moderada de 0,41 a 0,60; boa de 0,61 a 0,80; ótima de 0,81 a 0,99; e perfeita quando igual a 1,00.[11-13]

ÉTICA

De acordo com orientação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Onofre Lopes, o estudo não necessitou de aprovação, tendo em vista que as amostras não apresentavam identificação dos pacientes e seriam desprezadas pelo Laboratório Integrado de Análises Clínicas da UFRN. Desse modo os pacientes tiveram suas identidades e informações preservadas e as análises levaram em consideração apenas a investigação das metodologias para análise de urina, sem se deter a informações dos pacientes.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão descritos os parâmetros urinários avaliados pelos dois métodos. Pode-se observar um maior número de células epiteliais contadas pelo método proposto pela ABNT - NBR 15268 quando comparado ao método da SBPC/ML ($p < 0,01$); assim como uma menor frequência de lâminas avaliadas com presença de cristais de oxalato de cálcio ($p < 0,01$), sais de uratos amorfos ($p < 0,01$), bactérias ($p = 0,03$) e leveduras ($p = 0,01$) pelo método da ABNT - NBR 15268. Já os fios mucosos estavam presentes em maior número nas lâminas avaliadas pelo método ABNT - NBR 15268.

É importante destacar que o tempo total de processamento e leitura das amostras foi maior na metodologia sugerida pela SBPC/ML quando comparado à ABNT - NBR 15268 ($p < 0,01$). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas para os demais parâmetros avaliados.

Ao avaliar a concordância entre os métodos por meio dos valores de kappa (Tabela 2) observou-se uma concordância boa para a presença de cilindros leucocitários (97,2%, $\kappa = 0,61$, $p<0,01$); e concordâncias moderadas para presença de cristais de oxalato de cálcio (77,8%, $\kappa = 0,43$, $p=0,04$), cilindros hialinos (88,9%, $\kappa = 0,51$, $p=0,04$), sais de uratos amorfos (83,3%, $\kappa = 0,59$, $p=0,03$), fios mucosos (83,3%, $\kappa= 0,48$, $p=0,04$) e leveduras (75,9%, $\kappa = 0,54$, $p=0,04$). Não foram observadas concordâncias para as bactérias e sais de fosfatos amorfos.

Tabela 1 - Análise univariada entre os métodos propostos pela ABNT - NBR 15268 e SBPC/ML para determinação dos parâmetros urinários

Parâmetros	ABNT - NBR 15268		SBPC/ML		p
Nº de células epiteliais por campo (m, dp)	3,7	0,91	0,72	0,74	**<0,01**
Nº de hemácias por campo (m, dp)	0,21	0,28	0,21	0,2	0,89
Nº de leucócitos por campo (m, dp)	0,52	0,32	0,44	0,31	0,09
Presença de cristais de oxalato de cálcio (n, %)	6	16,7	12	33,3	**<0,01**
Presença de cristais de ácido úrico (n, %)	1	2,8	2	5,6	0,81
Presença de cilindros hialinos (n, %)	1	2,8	3	8,3	0,76
Presença de cilindros leucocitários (n, %)	1	2,8	0	0,0	-
Presença de sais de uratos amorfos (n, f%)	8	22,2	12	33,3	**<0,01**
Presença de bactérias (n, f%)	3	8,3	7	19,4	**0,03**
Presença de fios mucosos (n, f%)	31	86,1	27	75	**<0,01**
Presença de leveduras (n, f%)	4	11,1	6	16,7	**0,01**
Presença de cristais de fosfato amorfo (n, f%)	1	2,8	1	2,8	0,86
Tempo de leitura em minutos (m, dp)	11,5	3,8	12,4	2,4	0,22
Tempo de processamento da amostra em minutos (m, dp)	16,6	3,8	23,4	2,6	**<0,01**

M, dp; média e desvio padrão; n, f%: frequência absoluta e relativa. ABNT - NBR 15268, adotado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15268; SBPC/ML adotado pela Sociedade Brasileira de Patologia clínica/ Medicina Laboratorial. Os valores de p considerados significativos estão destacados em negrito.

Tabela 2 - Análise da concordância entre os métodos através dos valores de kappa para a presença de cristais, cilindros, sais amorfos, fios mucosos e microrganismos.

Parâmetros	Kappa	p	Concordância (%)
Presença de cristais de oxalato de cálcio	0,43	0,04	77,8
Presença de cristais de ácido úrico	0,44	0,05	88,9
Presença de cilindros hialinos	**0,51**	0,04	88,9
Presença de cilindros leucocitários	**0,61**	<0,01	97,2
Presença de sais de uratos amorfos	**0,59**	0,03	83,3
Presença de sais de fosfato amorfo	0,26	0,07	94,4
Presença de fios mucosos	**0,48**	0,04	83,3
Presença de bactérias	0,32	0,07	83,3
Presença de leveduras	**0,54**	0,04	75,9

Os valores do coeficiente kappa considerados indicativos de concordância entre os métodos (>0,4) estão destacados em negrito

Os métodos apresentaram correlação moderada quanto ao número de hemácias (r = 0,56, p=0,04) e células epiteliais (r = 0,73, p=0,04), não houve correlação para o número de leucócitos (Figura 1).

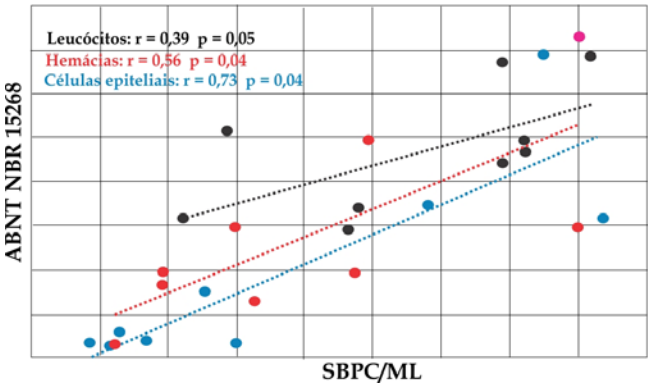


Figura 1. Coeficiente de correlação de Pearson para a média de células epiteliais, hemácias e leucócitos por campo, comparação entre dois métodos.
ABNT - NBR 15268, adotado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15268; SBPC/ML adotado pela Sociedade Brasileira de Patologia clínica/ Medicina Laboratorial

DISCUSSÃO

O exame de urina de rotina é um teste simples, não invasivo e de reduzido custo, que permite identificar diferentes elementos com relevância diagnóstica. Neste exame, a análise do sedimento urinário é o mais solicitado pelo clínico, uma vez que as avaliações física e química podem gerar resultados falso-negativos.[14,15] Logo, metodologias robustas com sensibilidade e especificidade adequadas, tecnicamente viáveis e menor custo devem ser priorizadas nos laboratórios clínicos de rotina.

O método descrito na NBR 15268 detectou maior média de células epiteliais escamosas por campo (aumento de 100x) quando comparados ao adotado pela SBPC/ML (aumento de 400x), diferença esperada considerando a magnitude do aumento. Contudo, mantiveram-se concordantes em relação às proporções das médias observadas. As células epiteliais escamosas são achados comuns no sedimento urinário, sobretudo em mulheres em algumas etapas do ciclo menstrual[16] e não possuem relevância diagnóstica, mas em grandes quantidades podem dificultar a identificação de outras estruturas relevantes. Ainda de acordo com o mesmo autor, a presença de células epiteliais transicionais, tubulares renais e anômalas no exame de urina podem indicar processos patológicos relevantes como câncer e necrose tubular aguda.

A ocorrência de cristais de oxalato de cálcio, sais de uratos amorfos, bactéria e leveduras foi menor através do método NBR 15268. A justificativa para a maior sensibilidade do método SBPC/ML em relação a estes elementos seria sua maior magnitude no microscópico (400X *vs* 100X), maior tamanho da lamínula (32 mm x 24 mm *vs* 22 mm x 22 mm) e maior volume de amostra (50 µL *vs* 20 µL) e número de campos a serem visualizados superior (20 *vs* 10 campos microscópicos).

O aumento da excreção de oxalato de cálcio na urina associa-se à formação de litíase, sendo um fator de risco problemas renais.[17] Já os sais de uratos amorfos e cristais de ácido úrico na urina podem ser encontrados em grandes quantidades em pacientes com gota, além de casos de desidratação e febre.[10,16] Embora a presença de cristais e sais na urina isoladamente tenha pouco significado clínico, sua descrição em conjunto com outros parâmetros pode auxiliar na interpretação do diagnóstico clínico-laboratorial.

No tocante às leveduras na urina, a *Candida* spp. é o gênero mais frequente podendo associar-se também a casos de vaginite. Nessa condição, quantidades maciças de células epiteliais escamosas, bactérias e leucócitos podem

estar presentes.[10] Ainda de acordo com o mesmo autor, a *Candida* spp. pode causar infecção verdadeira do trato urinário, especialmente em pacientes com *Diabetes mellitus,* com anormalidades estruturais do trato urinário e em tratamentos prolongados com antimicrobianos ou imunossupressão. Comparando os métodos, houve concordância moderada para este agente infeccioso.

De acordo com Guerra et al.,[11] resultados normais em exames de urina dispensam a solicitação de urocultura em 87% dos casos, enquanto que a presença de leucócitos indica a necessidade de uma investigação mais criteriosa. Todavia, bacteriúria sem leucocitúria normalmente sugere proliferação *in vitro* devido a coleta inadequada, condições de transporte, armazenamento e tempo de processamento das amostras. Interessante que, para este parâmetro, a frequência de lâminas com bactérias presentes foi diferente entre os métodos. Possivelmente uma maior diluição do sedimento adotada pela SBPC/ML permita a observação de campos mais limpos e, consequentemente, uma melhor visualização de bactérias nas lâminas. Contudo, esta mesma diluição pode ter dificultado a identificação de fios mucosos, mais detectados pelo método ABNT - NBR 15268. Os fios mucosos são estruturas irregulares com uma forma filamentar longa e fina, mas isoladamente carecem de significado patológico,[16] podendo estar abundantes na presença de processos inflamatórios do trato urinário baixo ou genitálias.

O número médio de hemácias e leucócitos não diferiu entre os métodos. Em condições normais é comum a baixa ocorrência de hemácias, exceto após exercício extenuante, durante a menstruação ou contaminação por secreções genitais. Entretanto, a hematúria, seja macroscópica ou microscópica, é um dado importante a ser detectado para investigação de diversas doenças renais com ou sem dano glomerular,[18] como litíase renal, doenças glomerulares, pielonefrite, tumores e traumas. Já os leucócitos são especialmente instáveis e susceptíveis a lise, sobretudo durante armazenamento prolongado,[6] seu aumento está associado a processos inflamatórios do trato urinário e infecciosos bacterianos ou não bacterianos; além disso, embora possam ser classificados em neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos, na prática laboratorial do exame de urina são relatados como leucócitos.

No presente estudo foram observadas poucas lâminas com cilindros, logo, embora os dados não tenham sido divergentes entre os métodos, os resultados devem ser interpretados com cautela em virtude da sua pouca ocorrência. No geral, os cilindros são um produto de processos inflamatórios e de destruição epitelial, sua morfologia é resultado de sua passagem pelos túbulos renais (distal, proximal e coletor). Em condições não patológicas, sua ocorrência é incomum, exceto os cilindros hialinos presentes sob certas circunstâncias.[16]

Quanto ao tempo necessário para o processamento da amostra, era esperado que o método proposto pela SBPC/ML fosse mais demorado que o da ABNT-NBR 15268 devido ao maior tempo centrifugação (10 min *vs* 5 min). Contudo, não se observou essa diferença mesmo com maior quantidade de campos observados (20 campos *vs* 10 campos, respectivamente). Geralmente, as etapas iniciais de processamento da urina, como a centrifugação para obtenção do sedimento, são executadas pela equipe técnica do laboratório, podendo a etapa físico-química, incluindo a utilização da tira reativa, ser realizada por este profissional de forma manual e visual, ou com auxílio de uma leitora automatizada. Já a sedimentoscopia, obrigatoriamente, é feita por um profissional qualificado, como o farmacêutico, o biomédico ou o biólogo.[5]

Levando-se em conta que muitos profissionais recebem por horas trabalhadas, é interessante verificar se o maior tempo de centrifugação demandaria maiores custos aos laboratórios, além de alterar a rotina/ logística do mesmo.

Ao interpretar os resultados deste estudo, algumas limitações devem ser levadas em consideração: o pequeno tamanho da amostra, apenas nove indivíduos foram incluídos na comparação dos métodos; e o reduzido número de avaliadores, somente quatro participaram do estudo, o que resultou no total de 72 laudos inseridos na estatística. Contudo, o fracionamento das alíquotas e a avaliação independente por quatro profissionais experientes minimizaram essa deficiência.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível realizar uma análise comparativa pioneira entre os métodos propostos pela ABNT e SBPC/ML. De fato, embora os métodos propostos tenham apresentado concordância e correlação entre muitos dos parâmetros avaliados (cilindros leucocitários e hialinos, presença de cristais de oxalato de cálcio, sais de uratos amorfos, fios mucosos, leveduras, quantificação de hemácias e células epiteliais), os principais achados associados a processos infecciosos e inflamatórios como bacteriúria e leucocitúria, comuns no exame de urina, precisam ser mais bem investigados. Além disso, é importante que, de acordo com a metodologia empregada, o tempo de processamento e a logística técnica/laboratorial sejam adequados. Assim, futuros estudos são importantes para uma melhor padronização do exame de urina em âmbito nacional, corroborando com valores de referência associados aos significados clínicos dos pacientes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Rafael C. L. C. A. pelo apoio técnico voluntário na realização dos experimentos.

Abstract

Objective: *Evaluate the conformity between sediment method suggested by Brazilian Association of Technical Norms and another method suggest by Brazilian Society of Clinical Pathology Laboratory Medicine.* ***Methods:*** *It was used urine from nine people, obtaining 72 samples analyzed by both methods. Four different researchers examined each sample. The conformity between these methods was measured by the Pearson correlation coefficient for continuous variables and kappa concordance coefficient for the category variables.* ***Results:*** *There was concordance between methods for quantification of leukocyte casts (97.2%, $\kappa = 0.61$, $p < 0.01$), calcium oxalate crystals presence (77.8%, $\kappa = 0.43$, $p = 0.04$), hyaline casts (88.9%, $\kappa = 0.51$, $p = 0.04$), amorphous urate crystals (83.3%, $\kappa = 0.59$, $p = 0.03$), mucus (83.3%, $\kappa = 0.48$, $p = 0.04$) and yeast (75.9%, $\kappa = 0.54$, $p = 0.04$). These methods had moderate correlation for erythrocytes number ($r = 0.56$, $p = 0.04$) and epithelial cells ($r = 0.73$, $p = 0.04$). It is still worth noting SBPC/ML method requests a larger processing time (23.4 minutes) when compared to ABNT NBR 15268 (16.6 minutes, $p < 0.01$).* ***Conclusion:*** *Although the proposed methods had presented conformity at the evaluate parameters, the most important results associated to infection and inflammatory processes such as bacteriuria and leukocyturia, common at urine exams, need to be more studied. Thus, it is important that, according to the used methodology, the processing time and technical/laboratory logistic needs to be adequate.*

Keywords

Urine; methods; clinical laboratory techniques

REFERÊNCIAS

1. Lakatos J, Bodor T, Zidarics Z, Nagy J. Data processing of digital recordings of microscopic examination of urinary sediment. Clin Chim Acta. 2000;297(1-2):225-37.
2. Moll F, Halling T, Krischel M, Fangerau H. FRI-14 Urinary Fever: a forgotten concept in urologic and medical history. The Journal of Urology. 2016;195(4) e531
3. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15268: Laboratório clínico - Requisitos e recomendações para o exame de urina. ABNT. Brasil, 2005 ;1a ed:9.
4. Queiroz MGR, Alencar NMN, Melo CL. Proposta de um modelo de padronização para o exame sumário de urina. Rev. Bras. Anal. Clin. (Rio de Janeiro) 2000;32(4):243-7.
5. Bottini PV, Garlipp CR. Urinálise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(3):157-62.
6. Manda-Handzlik A, Sztefko K, Zajac A, Kwinta P, Tomasik P. UriSed - Preliminary reference intervals and optimal method for urine sediment analysis in newborns and infants. Clin Biochem. 2016;49(12):909-14.
7. Ercan M, Oguz EF. Evaluation of BT uricell1280 automated urine sediment analyzer performance. Medicine Science, International Medical Journal. 2018;18(3).
8. Ko DH, Ji M, Kim S, Cho EJ, Lee W, Yun YM et al. An approach to standardization of urine sediment analysis via suggestion of a common manual protocol. Scand J Clin Lab Invest. 2016;76(3): 256-63.
9. Amorim A, Pacheco JBP, Fernandes TT. Exame de urina tipo I: frequência percentual de amostras que sugerem infecção urinária. Anuário da Produção Iniciação Científica Discente. 2009; XI(12):57-68.
10. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): realização de exames em urina. Vol. 1, Barueri, SP: Manole; 2017.
11. Guerra GVDQL, Souza ASR, Costa BF, Nascimento FRQ, Amaral MDA, Serafim ACP. Exame simples de urina no diagnóstico de infecção urinária em gestantes de alto risco. Rev Bras Ginecol e Obs. 2012;34(11):488-93.
12. Chiara VL, Silva HGV, Barros ME, Rêgo AL, Ferreira AL, Pitasi BA, et al. Correlação e concordância entre indicadores de obesidade central e índice de massa corporal em adolescentes. Rev Bras Epidemiol. 2009;12(3):368-77.
13. Viera AJ, Garrett JM. Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic. Fam Med. 2005;37, May: 360-3.
14. Mota C, Beça H. Análise sumária de urina de rotina. Rev Port Med Lab e Fam. 2013; 29(4):244-8.
15. Heggendornn LH, Silva NA, Cunha GA. Urinálise: A importância da sedimentoscopia em exames físico-químicos normais. Rev Eletrônica Biol. 2014;7(4):431-43.
16. Laredo MEB, Álvarez CAN, Cabiedes J. Urinary sediment analysis. Reumatol Clin. 2014;6(5):268-72.
17. Polo MAA, Martin MA, Gomez JG. Calcium renal lithiasis: metabolic diagnosis and medical treatment. São Paulo Med J. 2013;131(1):46-53.
18. Becker GJ, Garigali G, Fogazzi GB. Advances in urine microscopy. Am J Kidney Dis. Elsevier Inc; 2016; 67(6):954-64

Correspondência

Marcela Abbott Galvão Ururahy

Rua General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N, Petrópolis

59022-200 - Natal-RN, Brasil

Etiologia e perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados de hemoculturas no Hospital das Clínicas da UFPE no período de janeiro a dezembro de 2014

Etiology and resistance profile of microorganisms isolated from blood cultures at the University Hospital of UFPE in the period from january to december 2014

Waldeck Vasconcelos de Oliveira[1]
Wanessa Silva dos Santos[1]
Bruno Severo Gomes[2]
Jailton Lobo de Costa Lima[3]

Resumo

Objetivo: O presente trabalho tem como objetivo o estudo sobre a prevalência de hemoculturas positivas originadas de pacientes do Hospital das Clínicas da UFPE e determinar a etiologia dos principais microrganismos presentes nessas culturas, como também analisar o perfil de susceptibilidade dos principais antibióticos. **Métodos:** Durante o período de janeiro a dezembro de 2014 foram analisadas 943 amostras de hemoculturas, das quais 46,40% foram do sexo masculino, 35,92% do sexo feminino e 17,68% de recém-nascidos. As culturas foram condicionadas às técnicas de reisolamentos, testes bioquímicos e submetidas à análise através do equipamento Phoenix 100 da BD para identificação da bactéria isolada e liberação do antibiograma. **Resultados:** Das 943 amostras de hemoculturas analisadas, 19,61% apresentaram positividade. O *Staphylococcus aureus f*oi o microrganismo de maior prevalência (21,62%). É importante ressaltar a presença de culturas mistas (3,24%) e de *Candida* sp (2,70%), destacando-se a *Candida tropicalis*. Com relação aos antibióticos usados contra microrganismos Gram-positivos, a penicilina G expressou maior percentual de resistência (95%), e em relação aos Gram-negativos, o que expressou maior resistência foi quinupristina/dalfopristina (100%). **Conclusão:** Esse trabalho visa contribuir para o conhecimento dos microrganismos mais comumente isolados na Instituição em estudo e do seu perfil de resistência, provendo dados essenciais para o estabelecimento de estratégias para o uso racional de antimicrobianos.

Palavras-chave
Hemocultura; farmacorresistência bacteriana; etiologia

INTRODUÇÃO

Embora o sangue seja um líquido estéril, normalmente isento de microrganismos, ele pode ser invadido por diferentes bactérias, situação esta denominada de bacteremia.(1)

A partir do momento que esses microrganismos passam a se multiplicar na corrente sanguínea ocorre o que se chama de septicemia, que é caracterizada por acometer diversos órgãos e sistemas e ocorre quando uma infecção, geralmente adquirida em ambiente hospitalar, origina um processo inflamatório, tendo como consequência o comprometimento das defesas imunológicas, metabolismo e coagulação sanguínea.(2)

Os pacientes imunocomprometidos estão mais susceptíveis a apresentar uma cultura de sangue positiva do que os indivíduos imunocompetentes, nos quais a bacteremia é transitória e difícil de ser detectada.(3)

Nos hospitais é muito frequente a solicitação da coleta de sangue para realização da hemocultura devido à sua importância, pois o resultado determina a conduta terapêutica baseada na identificação do agente etiológico.(4)

A bacteremia pode ser detectada pela realização de uma cultura, a partir de amostras de sangue (hemocultura).

[1]*Biomédico(a). Universidade Federal de Pernambuco - Recife-PE, Brasil.*
[2]*Doutor em Microbiologia. Universidade Federal de Pernambuco - Recife-PE, Brasil.*
[3]*Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada; Doutorando em Medicina Tropical/Universidade Federal de Pernambuco - Recife-PE, Brasil.*

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Recife-PE, Brasil.

Suporte Financeiro: O Laboratório do Hospital das Clínicas da UFPE - Recife colaborou disponibilizando espaço físico e informações pertinentes para a realização da pesquisa.

Recebido em 09/07/2018
Artigo aprovado em 10/01/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900755

Para obtenção dessa amostra, são utilizadas técnicas e metodologias especiais que tornam possível uma detecção precisa, tomando todas as precauções para minimizar o número de hemocultivos contaminados.[5-7]

Para a realização da hemocultura, com o objetivo de diagnosticar a bacteremia, são realizados técnicas e métodos específicos, tornando possível um resultado criterioso e preciso, onde devem ser tomadas todas as precauções possíveis para minorar o número de culturas contaminadas.[8] Este exame é um dos recursos mais importantes para elucidar suspeitas clínicas de bacteremia de causas infecciosas, para o esclarecimento de febre de origem indeterminada.[5]

Do ponto de vista epidemiológico, os cocos Gram-positivos têm emergido como os principais agentes encontrados em amostras de hemoculturas, destacando-se os *Staphylococcus aureus*, os *Staphylococcus coagulase* negativos e os *Enterococcus* sp.[7,9]

Os *Staphylococcus coagulase*-negativas, isolados com frequência em hemocultura, são considerados, em 70% dos casos, como contaminantes devido à presença do *Staphylococcus epidermidis,* que é constituinte da microbiota normal da pele. Essas bactérias podem ser responsáveis por bacteremias em menos de 10% dos casos.[5,8]

Mesmo tendo se tornado menos frequente, as bacteremias caudadas por bastonetes Gram-negativos estão associadas a uma maior mortalidade quando comparadas com os cocos Gram-positivos.[3,7]

Os elevados índices de morbimortalidade que estão associados às infecções na corrente sanguínea requerem a implantação de um processo de vigilância permanente dos resultados de hemocultura. O uso correto dos antimicrobianos é o principal responsável pela redução da mortalidade.[10]

Dentre as preocupações associadas à resistência antimicrobiana, merecem destaque os *Staphylococcus coagulase* negativos oxacilina resistentes, os *Enterococcus* sp. vancomicina resistentes, a produção de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) por enterobactérias e a resistência das *Pseudomonas* sp. aos carbapenêmicos.[3,11]

Desta forma, são necessários critérios médicos mais rigorosos na prescrição, dispensação e uso desses antimicrobianos para afastar o risco de, em alguns anos, não haver medicamentos eficazes no controle e combate a estas infecções.[12]

O presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil de resistência e sensibilidade aos antibióticos dos microrganismos isolados no Hospital das Clínicas da UFPE no período de janeiro a dezembro de 2014, como também verificar a prevalência de amostras positivas e negativas nas hemoculturas, avaliar a prevalência de hemoculturas positivas e negativas quanto à presença de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas bem como relacionar os achados de acordo com o sexo masculino ou feminino e recém- nascidos, avaliando também a prevalência de culturas mistas e a espécie mais frequente nestas hemoculturas. Averiguar a prevalência das candidemias e a espécie de *Candida* mais frequente nas hemoculturas e observar o perfil de resistência e susceptibilidade das bactérias mais frequentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados foram obtidos a partir de um estudo retrospectivo realizado no Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da UFPE (Recife), no período de janeiro a dezembro de 2014.

Na coleta médica são retirados de 8 mL a 10 mL de sangue no caso dos adultos e 1 mL a 3 mL em crianças. Geralmente são coletadas entre duas a três amostras em frasco bactec.

De acordo com o protocolo utilizado na rotina laboratorial de análises clínicas, as amostras de sangue foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Chocolate ou Ágar sangue, EMB ou MacConkey para crescimento e isolamento bacteriano.[10]

Após um período de incubação (18 a 24 horas, 35° a 37°C), foi feita a leitura das placas e, em seguida, testes bioquímicos complementares e diferenciais.[10]

As colônias isoladas foram coradas pelo método de Gram para observação da morfologia e coloração específicas. Os isolados clínicos foram submetidos aos testes de antibiogramas realizados por meio de sistema automatizado Phoenix 100 da BD que permite classificar como sensível (S) ou resistente (R), com sua aferição baseada na tabela do CLSI (M100/S14).[10]

As amostras avaliadas no estudo foram de hemoculturas processadas no laboratório de microbiologia, coletadas após requisições médicas. Foram incluídas todas as amostras provenientes de pacientes internados no hospital e excluídas amostras de origem ambulatorial.

RESULTADOS

Foram analisadas 943 hemoculturas, das quais 758 foram negativas, o que equivale a 80,39%, e 185 foram positivas, o equivalente a 19,61%. Dentre as hemoculturas positivas, 46,40% foram referentes a indivíduos do sexo masculino, 35,92% do sexo feminino e 17,68% de recém-nascidos sem referência ao sexo.

Das hemoculturas positivas, 57,64% foram referentes a bactérias Gram-positivas e 42,36% a bactérias Gram-negativas. A presença de culturas mistas, ou seja, que indicaram a presença de mais de um microrganismo, mostrou um percentual de 3,24%.

No presente estudo verificamos que, dentre as bactérias que se mostraram presentes nas hemoculturas mistas, a mais prevalente foi a *Morganella morganii*. Verificamos a presença de culturas mistas com: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*; *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus anginosus*; *Enterobacter* spp. e *Proteus mirabilis*; *Morganella morganii* e *Enterobacter cloacae*; *Enterococcus faecalis* e *Morganella morganii*; *Klebsiella pneumoniae ozaenae*.

Entre hemoculturas positivas, 2,70% foram referentes à *Candida* spp., com predomínio da *Candida tropicalis*.

Conforme nos mostra a Tabela 1, do total de 185 microrganismos identificados, os *Staphylococcus aureus* apresentaram o maior percentual (21,62%), seguidos por *Staphylococcus coagulase* negativa com 20,54%, *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* (9,72%), *Escherichia coli* (7,56%), *Acinetobacter baumannii* (6,48%), e outros.

Tabela 1 - Incidência de micro-organismos isolados de hemocultura no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2014 coletadas no Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas UFPE.

Microrganismos	Nº de microrganismos isolados	Porcentual (%)
Staphylococcus aureus	40	21,62
Staphylococcus coagulase negativa	38	20,54
Klebsiella pneumoniae ssp. *pneumoniae*	18	9,72
Escherichia coli	14	7,56
Acinetobacter baumannii	12	6,48
Pseudomonas aeruginosa	09	4,86
Streptococcus agalactiae (grupo B)	09	4,86
Enterobacter cloacae	07	3,80
Streptococcus β-hemolíticos não grupo A e não grupo B	06	3,24
Candida sp.	05	2,70
Enterococcus faecalis	04	2,16
Enterobacter aerogenes	04	2,16
Morganella morganii	04	2,16
Proteus mirabilis	03	1,66
Stenotrophomonas maltophilia	02	1,08
Klebsiella ozaenae	02	1,08
Salmonella enterica sorotipo Typhi	01	0,54
Listeria monocytogenes	01	0,54
Serratia liquefaciens	01	0,54
Klebsiella oxytoca	01	0,54
Myroides odoratus	01	0,54
Shigella	01	0,54
Enterococcus faecium	01	0,54
Enterococcus casseliflavus/ gallinarum	01	0,54
Total	185	100

A Tabela 2 denota o percentual de resistência e susceptibilidade dos microrganismos aos antibióticos de forma geral. Os microrganismos Gram-positivos demonstraram maior percentual de sensibilidade quando expostos aos antibióticos linezolide e daptomicina (100%), seguidos de vancomicina (98,79%), minociclina (94,20%) e rifampicina (80,00%).

Tabela 2 - Percentual de resistência e suscetibilidade dos isolados clínicos de hemoculturas coletados no laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas UFPE no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2014.

Antibióticos	Percentual (%)	
	Suscetibilidade	Resistência
Ampicilina	7	93
Clindamicina	38,96	61,04
Daptomicina	100	0
Eritromicina	28,76	71,24
Linezolide	100	0
Minociclina	94,20	5,80
Oxaciclina	20	80
Penicilina G	5	95,00
Rifampicina	80	20
Tetraciclina	70,88	29,12
Trimetropim/sulfametaxazol	55,10	44,90
Vancomicina	98,79	1,21
Amicacina	76,62	23,38
Ampicilina/sulbactam	21,31	78,69
Ciproflocino	45,07	54,93
Levofloxacino	54,54	45,46
Gentamicina	50	50
Imipenem	69,56	30,44
Meropenem	68,42	31,58
Piperacilina/Tazobactam	66,10	33,90
Tobramicina	59,42	40,58
Ceftazidima	44,18	55,82
Quinupristina/dalfopristina	0	100

Dentre os antibióticos utilizados para combater microrganismos Gram-negativos, aqueles aos quais os microrganismos demonstraram maior porcentagem de sensibilidade foram amicacina (76,63%), imipenem (69,56%), meropenem (68,42%), piperacilina/ tazobactam (66,10%) e a tobramicina (59,42%).

Com relação aos antibióticos usados contra microrganismos Gram-positivos, aqueles aos quais os microrganismos expressaram maior percentual de resistência foram a quinupristina/ dalfopristina (100%) (convém ressaltar que o referido antibiótico foi testado em apenas uma cepa de *Listeria monocytogenes)*, seguido de penicilina G (95%), ampicilina (93%), oxacilina (80,00%), eritromicina (71,24%) e trimetropim/sulfametaxazol (44,90%).

Já dentre os antibióticos usados contra os microrganismos Gram-negativos, aqueles aos quais os microrganismos expressaram maior percentual de resistência foram ampicilina/sulbactam (78,69%), ceftazidima (55,82%), ciprofloxacina (54,93%) e levofloxacino (45,46%).

DISCUSSÃO

Das 943 hemoculturas analisadas neste trabalho, 80,39% (758) foram negativas, e 19,61% (185) foram positivas, concordando com outros estudos. Na pesquisa realizada por Nunes et al.,[13] do total de 1.065 culturas, 836 (78,5%) foram negativas e 229 (21,5%) foram positivas. Das 2.210 hemoculturas analisadas no trabalho de Sousa MA et al.,[14] coletadas de pacientes da UTI, de janeiro/2010 a janeiro/2013, no hospital escola em estudo, 2.040 foram negativas e 170 positivas.

A pesquisa mostrou que, neste tipo de amostra (hemocultura), a maioria dos pacientes com culturas positivas foi do sexo masculino (46,40%), seguido do sexo feminino (35,92%) e recém-nascido (17,68%), apontando na mesma direção de outros estudos realizados. Dentre as culturas positivas, expostas no trabalho realizado por Silva et al.,[10] 46,07% foram do sexo feminino, 43,83% foram referentes a indivíduos do sexo masculino e 5% a recém-nascidos sem referência ao sexo, demonstrando a prevalência do sexo feminino em relação ao masculino, discordando do presente estudo. No estudo elaborado por Alves et al.,[2] verificou-se variação no crescimento de bactérias nos exames de hemocultura realizados. Neste sentido, dentre as culturas coletadas prevaleceram as do sexo masculino (60%), percentual maior que o encontrado no presente estudo (46,40%), bem como maior positividade nos resultados de hemocultura no sexo masculino (27,3%) em relação ao sexo feminino (19,1%), sendo este resultado menor que o encontrado no presente estudo (35,92%).

O presente trabalho demonstrou que nas hemoculturas positivas ocorreu uma prevalência de bactérias Gram-positivas (57,64%) em relação às bactérias Gram-negativas (42,36%). Essa prevalência deve-se principalmente à presença de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativa conforme também apontaram outros estudos realizados. Dentre as 714 hemoculturas analisadas na pesquisa realizada por Martins et al.,[15] em Goiás, durante os meses de setembro de 2012 a junho de 2013, ocorreu uma prevalência de bactérias Gram-positivas em relação a bactérias Gram-negativas. O estudo realizado por Passerini et al.[16] e confirmado por Santos,[17] relata, em análise retrospectiva, as bacteremias na Itália no período de 10 anos (janeiro de 1999 a dezembro de 2008), com predomínio de Gram-positivas 63% dos casos e 37% de bactérias Gram-negativas.

Entre as hemoculturas positivas, 3,24% foram referentes a culturas mistas, ou seja, com presença de mais de uma bactéria. A bacteremia polimicrobiana está, na maioria dos casos, relacionada à baixa atividade do sistema imunológico, em geral pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida, e a doenças de base oncohematológicas, tais como leucemias e linfomas. No presente estudo verificamos que, dentre as bactérias que se mostraram presentes nas hemoculturas mistas, a que se apresentou mais frequente foi a *Morganella morganii*. Esse resultado mostrou-se diferente do estudo retrospectivo realizado por Silva et al.,[10] em 2006, também no Hospital das Clínicas da UFPE, no período de janeiro a junho de 2002, março a setembro de 2004 e julho a dezembro de 2004, o qual demonstrou um percentual maior de culturas mistas (4,64%) em relação ao presente estudo (3,24%), no qual a bactéria mais frequente encontrada foi a *Pseudomonas aeruginosa*. Conforme o estudo elaborado por Nunes et al.,[13] no ano de 2013, após a exclusão das culturas que temporariamente representavam uma mesma infecção e nas quais foram encontrados os mesmos resultados, foi obtido um total de 164 culturas positivas para um total de 89 pacientes. Dessas, 9,1% foram culturas mistas, percentual maior que o demonstrado no presente trabalho (3,24%).

No presente estudo, 2,70% das hemoculturas positivas eram em decorrência do fungo *Candida*. A ocorrência de candidemias tem-se tornado cada vez mais frequente, principalmente em pacientes que apresentam um quadro de imunocomprometimento, onde a redução da capacidade do sistema de defesa do organismo torna o indivíduo bem mais susceptível a esse tipo de infecção. Em pacientes imunocomprometidos é frequente a infecção por *Candida* sp..[18-20] O estudo presente revelou que dentre as cinco hemoculturas positivas em decorrência de *Candida* sp., três foram por *Candida tropicalis*, indicando um significativo aumento dessa espécie em relação à *Candida albicans*, comprovado por outros estudos. No estudo realizado por Nunes et al.,[13] das 164 culturas, oito foram positivas para fungos (4,9%), sendo sete positivas para o gênero *Candida*, nenhuma delas *albicans*, e uma para *Fusarium* sp., coadunando com o presente estudo. Tamura,[21] em 2007, revelou que os agentes mais comumente isolados são leveduras do gênero *Candida,* que corresponde, aproximadamente, a 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar, e destaca-se como a quarta causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 25% a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia. Os estudos realizados por Colombo,[22] em 2003 e Tamura,[21] em 2007, mostraram que, até poucos anos atrás, a *Candida albicans* era a espécie de maior interesse médico. No entanto, paralelamente ao aumento geral das candidemias, observou-se aumen-

to das infecções da corrente sanguínea por outras espécies de *Candida*, como: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilhermondii* e *C. lusitaniae*.

Do total de microrganismos isolados (185), 21,62% foi correspondente ao *Staphylococcus aureus* apresentando o maior percentual, em segundo *Staphylococcus coagulase* negativa (20,54%), seguidos de *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* (9,72%), *Escherichia coli* (7,56%), *Acinetobacter baumannii* (6,48%), *Pseudomonas aeruginosa* (4,86%), e outros (Tabela 1). No estudo apresentado por Silva et al.,[10] do total de 294 microrganismos pesquisados, os *Staphylococcus aureus* apresentaram o maior percentual (31,63%), em segundo K*lebsiella pneumoniae* (11,22%), seguidos de *Pseudomonas aeruginosa* (10,20%), *Acinetobacter calcoaceticus* (7,48%), *Escherichia coli* (7,14%), *Staphylococcus coagulase* negativa (6,46%), *Enterococcus faecalis* (6,12%), *Salmonella* sp. (5,10%), *Enterobacter cloacae* (2,72%), *Streptococcus grupo viridans* (2,72%), *Morganella morganii* (2,04%), *Serratia marcescens* (2,04%), *Citrobacter* sp. (1,36%), *Proteus mirabilis* (1,02%), *Streptococcus pyogenes* (1,02%), *Streptococcus agalactiae* (0,68%), *Edwardsiella* sp.(0,34%), *Klebsiella oxytoca* (0,34%), *Streptococcus* β-hemolítico não grupo A e não grupo B (0,34%), apontando na mesma direção do presente estudo no que corresponde aos *Staphylococcus aureus* como microrganismo mais prevalente.

Na Tabela 2 podemos observar o percentual de resistência e susceptibilidade dos microrganismos aos antibióticos de forma geral. A importância desta visão geral é a possibilidade da utilização de antibióticos que se apresentaram mais eficazes em relação às hemoculturas e sua utilização em casos emergenciais.

Com relação aos Gram-positivos, os microrganismos demonstraram maior percentual de sensibilidade aos antibióticos linezolide e a daptomicina (100%), seguidos de vancomicina (98,79%), minociclina (94,20%) e rifampicina (80,00%).

Dentre os antibióticos utilizados contra microrganismos Gram-negativos, os microrganismos demonstraram maior porcentagem de sensibilidade a amicacina (76,63%), seguida do imipenem (69,56%), meropenem (68,42%), piperacilina/ tazobactam (66,10%) e a tobramicina (59,42%).

Com relação à resistência aos antibióticos usados contra microrganismos Gram-positivos, aqueles que os microrganismos expressaram maior percentual foram a quinupristina/ dalfopristina (100%), testado em apenas uma cepa de *Listeria monocytogenes,* seguido de penicilina G (95%), ampicilina (93%), oxacilina (80,00%), eritromicina (71,24%) e trimetropim/sulfametaxazol (44,90%).

Por fim, dos antibióticos usados contra os microrganismos Gram-negativos, os microrganismos demonstraram maior percentual de resistência a ampicilina/sulbactam, com 78,69% das cepas resistentes, seguida da ceftazidima (55,82%), ciprofloxacina (54,93%) e levofloxacino (45,46%).

No trabalho realizado por Nunes et al.,[13] entre os Gram-positivos, 40% foram resistentes a oxacilina e nenhuma foi resistente à vancomicina, apresentando um percentual menor de resistência em relação à oxacilina (80%) e um percentual similar de sensibilidade em relação à vancomicina (98,79%) ao presente estudo.

Entre os Gram-negativos, a pesquisa divulgada por Nunes et al.[13] demonstrou que a resistência geral aos antimicrobianos foi de 37,8% para amicacina, 50% para cefepime, 51,4% para ceftazidima, 46,6% para ciprofloxacina, 10,5% para imipenem e 33,8% para piperacilina-tazobactam, apresentando percentuais de resistência similares em relação à amicacina (23,37%), ceftazidima (55,82%), ciprofloxacina (54,93%) e à piperacilina-tazobactam (33,9%) em relação ao presente estudo e um percentual de resistência menor em relação ao imipenem (10,5%) em comparação ao atual estudo (33,9%).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, podemos concluir que ocorreu uma maior prevalência de hemoculturas negativas dentre as culturas coletadas. Foi observada uma prevalência do sexo masculino nas hemoculturas pesquisadas. As bactérias Gram-positivas foram as estirpes mais isoladas nas hemoculturas analisadas. Em relação às culturas mistas, a bactéria mais prevalente foi a *Morganella morganii.* Dentre as hemoculturas positivas, foi verificado uma baixa percentagem de candidemia e a espécie mais prevalente foi a *Candida tropicalis.* Os microrganismos mais frequentes foram *Staphylococcus aureus,* os *Staphylococcus coagulase* negativa, onde destacamos o S*taphylococcus epidermidis*, seguido de *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*. A resistência das estirpes isoladas demonstrou-se elevada diante dos antibióticos mais utilizados no tratamento das bacteremias. Isso ocorre, principalmente, em consequência da administração inapropriada dos mesmos. Os antibióticos utilizados contra Gram-positivos que demonstraram uma maior sensibilidade desses microrganismos foram o linezolide e a daptomicina, os que demonstraram maior sensibilidade dos Gram-negativos foram amicacina, imipenem. Em relação aos antibióticos usados contra Gram-positivos que expressaram maior resistência desses microrganismos foram a quinupristina/ dalfopristina, a penicilina G, e ampicilina e, dos antibióticos testados, o que expressou maior resistência dos microrganismos Gram-negativos foi ampicilina/sulbactam.

A correta identificação laboratorial, bem como o acompanhamento do perfil de susceptibilidade dos microrganismos, pode contribuir para um melhor direcionamento de medidas de controle das infecções e uso racional dos anti-

bióticos nos hospitais, minimizando assim a perda da efetividade da antibioticoterapia.

Abstract

Objective: *The present work has as objective the study on the prevalence of positive blood cultures originating from patients of Hospital das Clínicas of UFPE and determine the etiology of the main microorganisms present in these samples, as well as analyze the profile of susceptibility of the major antibiotics.* ***Methods:*** *During the period from January to December 2014 were analyzed 943 samples of blood cultures, among them, 46.40% were male, 35.92% female and 17.68% of newborns. The cultures were conditioned to the techniques of reisolation, biochemical tests and subjected to analysis through the Phoenix 100 BD equipment for identification of bacteria isolated and culture release.* ***Results:*** *Of the 943 blood samples analyzed, 19.61% showed positivity.* Staphylococcus aureus *was the most prevalent microorganism (21.62%). It's important to note the presence of mixed cultures (3.24%) and* Candida *sp. (2.70%), wich highlighted the* Candida tropicalis. *With regard to antibiotics used against Gram-positive microorganisms, the penicillin G expressed a higher percentage of resistance (95%) and in relation to Gram-negative, which expressed more resistance was quinupristin/ dalfopristin (100%).* ***Conclusion:*** *This work aims to contribute to the knowledge of the microorganisms most commonly isolated in the institution under study and its resistance profile, providing essential data for the establishment of strategies for the rational use of antimicrobials.*

Keywords

Blood culture; drug resistance, bacterial; etiology

REFERÊNCIAS

1. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 894 p. 2006.
2. Alves LNS, Oliveira CR, Silva LAP, Gervásio SMD, Alves SR, Sgavioli GM. Hemoculturas: estudo da prevalência dos microorganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em unidade de terapia intensiva. J Health Sci Inst. 2012;30(1):44-7.
3. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed. 967 p. 2012.
4. Gir E, Stuchi RAG, Macedo RFC, Dresler ED. Ações de Enfermagem em Hemocultura. R. Gaúcha Enf. Porto Alegre. 1998;19(2): 95-105.
5. Jawetz E, et al. Princípios de diagnóstico em microbiologia médica. In: 18ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.48, p.475-500: Microbiologia médica. 1991.
6. Mims C, et al. Microbiologia médica. 1ª ed. São Paulo: Manole, p. 12. 1999.
7. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, p. 95-99, 2005.
8. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schecknberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas Colorido - 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1465 p. 2001.
9. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, p. 206-223, 2004.
10. Silva CMLS, Sena KXFR, Chiappeta AA, Queiroz MMO, Villar MCM, Coutinho HM. Incidência Bacteriana em Hemoculturas. 77ª ed. Pernambuco, p. 132 -144, 2006.
11. Furtado GHC, Martins ST, Coutinho AP, Soares GMM, Wey SB, Medeiros EAS. Incidence of vancomycin-resistant Enterococcus at a university hospital in Brazil. Rev. Saúde Pública [Internet]. 2005 Jan;39(1):41-46. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102005000100006&lng=en
12. Del Fiol FS, Lopes LC, Toledo MI, Filho SB. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. Rev Soc Bras Med Trop; São Paulo; p. 68 -72, 2010.
13. Nunes FL. Análise das hemoculturas e culturas de ponta de cateter de pacientes oncohematológicos em um Hospital Universitário de Salvador (Bahia). Monografia (Conclusão de Curso) Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 2013.
14. Sousa MA, Medeiros NM, Carneiro JR, Cardoso AM. Hemoculturas positivas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um Hospital escola de Goiânia-GO, entre 2010 e 2013. estudos, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 627-635. Acessível em: http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/view/3612
15. Martins DLB. Prevalência bacteriana nas hemoculturas do Hospital de urgência da Região Sudoeste (HURSO)-GO, p.16-18, 2013.
16. Passerini R, Ghezzi TL, Sandri MT, Radice D and Biffi R (2011) Ten-year surveillance of nosocomial bloodstream infections: trends of aetiology and antimicrobial resistance in a comprehensive cancer centre. Ecancermedicalscience. 2011;5:191. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3223944/. Acesso em: abril, 2015.
17. Santos NQ. O uso indiscriminado de antibióticos na ecologia das bactérias-antibiótico-resistentes associadas à problemática da infecção hospitalar: conhecimento e prática de profissionais de saúde, a luz ética das responsabilidades de Hans Jonas. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Florianópolis, 2002.
18. Sato AF, Svidzinsk AE, Consolaro MEL, Boer CG. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. J. Bras. Patol. Med. Lab. [Internet]. 2005 Dec ;41(6):397-404. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442005000600005&lng=en.
19. Jacociunas LV, Picoli SU. Avaliação de Infecção Urinária em Gestantes no Primeiro Trimestre de Gravidez. Rev. Bras. Anál. Clín. v.39, n.1, p.55-57, 2007.
20. Silva JCO, Farias TFF, Santos AL, Françolin AC, Svidzinsk TIE. Infecções Urinárias de Origem Bacterianas Diagnosticadas em Umuarama-PR. Rev. Bras. Anál. Clín., v.39, n.1, p.59-61, 2007.
21. Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski TIE. Fatores de Virulência de Candida spp. Isoladas de Cateteres Venosos e Mãos de Servidores Hospitalares. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [Internet]. 2007 Feb;40(1):91-93. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000100021&lng=en.
22. Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini ML, Kussano EJ, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of Candida spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. Med Mycol. 2003 Jun;41(3):235-9.

Correspondência

Waldeck Vasconcelos de Oliveira

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

50670-901- Recife-PE, Brasil

Sepse neonatal - perfil microbiológico e sensibilidade antimicrobiana em um hospital no Nordeste do Brasil

Neonatal sepsis - microbiological profile and antimicrobial sensitivity in a hospital in the Northeast of Brazil

Natanael Aguiar de Sousa[1]
Camila Gomes Virginio Coelho[2]
Carlos Henrique Soares de Mesquita[1]
Francisco Gustavo Barbosa Pires[1]
Patrícia Batista Rosa[3]
Izabelly Linhares Ponte Brito[4]

Resumo
Objetivo: Determinar a prevalência de microrganismos e o perfil de sensibilidade antimicrobiana em hemoculturas positivas de pacientes com infecção de corrente sanguínea na Unidade de Terapia Intensiva neonatal de um hospital no Nordeste brasileiro. **Métodos:** Estudo transversal, retrospectivo, com descrição quantitativa dos resultados de hemoculturas de neonatos admitidos na unidade terapia intensiva neonatal de um hospital do Nordeste brasileiro. **Resultados:** A sepse neonatal teve como principal etiologia bactérias gram-positivas, responsáveis por 73,1% das culturas positivas, sendo o *Staphylococcus* Coagulase negativo o principal agente, enquanto que 21,5% se deram por um agente Gram-negativo. As bactérias Gram-positivas apresentaram boa sensibilidade ao linezolida e à vancomicina e a maioria das Gram-negativas foi sensível à colistina, meropenem e imipenem. Todos os isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativa foram sensíveis ao linezolida, à vancomicina e à tigeciclina. **Conclusão:** O conhecimento das características relacionadas à sensibilidade e resistência antimicrobiana é fundamental para uma melhor abordagem ao paciente com sepse neonatal, promovendo um manejo mais direcionado que possibilita uma recuperação mais rápida do recém-nascido. O conhecimento adquirido com esse estudo possibilitará um tratamento mais eficiente em cada caso, com base no quadro apresentado pelo paciente e as características do agente causador.

Palavras-chave
Sepse neonatal; resistência microbiana a medicamentos; unidades de terapia intensiva neonatal; testes de sensibilidade microbiana; hemocultura

INTRODUÇÃO

A sepse neonatal é uma das mais frequentes causas de morbidade e mortalidade em recém-nascidos (RN) e pode ser definida como uma infecção sistêmica caracterizada por múltiplas manifestações decorrentes da invasão e multiplicação bacteriana na corrente sanguínea.(1)

De acordo com as diretrizes da Anvisa de 2013, é considerada infecção precoce a que ocorrer em até 48 horas após o nascimento.(2) Geralmente é decorrente da contaminação do RN por bactérias do canal de parto, ou secundária a bacteremias maternas. Está relacionada aos patógenos *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*. As infecções tardias, com aparecimento após 48 horas de vida, são mais comuns e problemáticas no RN de alto risco e geralmente são decorrentes da contaminação do RN por microrganismos hospitalares. Em países da América do Sul, incluindo o Brasil, bactérias Gram-negativas e *Staphylococcus aureus* ainda são os principais agentes de infecção em grande parte dos hospitais. No entanto, em alguns hospitais brasileiros, a situação vem se modificando e se tornando semelhante à de países desenvolvidos, onde os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCCN), como o *S. epidermidis*, são os principais agentes de infecções nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatais, e os fungos leveduriformes como espécies de *Candida* vêm apresentando um destaque cada vez maior.(3) Um dos principais fatores de risco associados à infecção por *Candida* é o uso de antimicrobianos de amplo

[1]*Acadêmico de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza-CE, Brasil.*
[2]*Professora adjunta, Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza-CE, Brasil.*
[3]*Médica Infectologista, Professora Auxiliar, Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza-CE, Brasil.*
[4]*Farmacêutica-Bioquímica, Mestre em Ciências da Saúde. Santa Casa de Misericórdia de Sobral - Sobral-CE, Brasil.*

Instituição: Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza-CE, Brasil.

Conflitos de interesse: Não há conflitos de interesse.
Suporte financeiro: Não houve financiamento por nenhuma instituição

Recebido em 12/09/2018
Artigo aprovado em 23/01/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900775

espectro, sendo a *Candida* componente da microbiota normal do trato gastrointestinal, pele e cavidade oral e seu crescimento pode ser favorecido com a supressão da flora bacteriana após o uso de antimicrobianos.[4]

A maioria das mortes relacionadas com a sepse neonatal (SN) é evitável se esta for diagnosticada precocemente e tratada com terapia antimicrobiana apropriada.[5]

Nos países em desenvolvimento, a SN alcança níveis de até 15,4 casos para cada mil nascidos vivos, enquanto que, nos Estados Unidos, a incidência varia de um a cinco para cada mil nascidos vivos.[6] A Organização Mundial de Saúde estimou que 1,6 milhão de mortes ocorrem anualmente em todo o mundo devido a infecções neonatais.[7] No Brasil, de acordo com dados nacionais disponibilizados no Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), desenvolvido pelo Ministério da Saúde, estima-se que 60% da mortalidade infantil ocorra no período neonatal, sendo a SN uma das principais causas.[8]

Segundo as diretrizes do Ministério da Saúde, na suspeita de sepse são indicados a coleta de hemocultura e início imediato de antibioticoterapia de amplo espectro.[3] A hemocultura possui grande importância na investigação em busca de uma confirmação para um caso potencial de SN e é considerada o "padrão-ouro" para isolamento e verificação de patógenos microbianos na sepse e também para fornecer o perfil de sensibilidade do microrganismo ao antimicrobiano, que é a chave para o tratamento correto e oportuno do paciente.[9]

Um grande problema para o tratamento de pacientes críticos em várias UTIs é o surgimento de cepas resistentes devido ao uso descontrolado e inadequado de vários antimicrobianos potentes e de amplo espectro.[10] Os microrganismos se utilizam de uma série de mecanismos para se proteger e resistir aos efeitos dos medicamentos, tornando-se com frequência resistentes a uma variedade de classes de fármacos antimicrobianos, ou seja, o aparecimento da resistência antimicrobiana (RA) é uma consequência da utilização da terapia. Também o ambiente hospitalar favorece o aparecimento e a disseminação de bactérias resistentes. A RA conduz a um sofrimento prolongado dos pacientes em tratamento e a um aumento dos custos dos cuidados em saúde para o sistema e, portanto, constitui um grande problema para a sociedade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a emergência e a propagação da resistência aos antimicrobianos como um problema grave mundial, afetando tanto os países desenvolvidos como os países em desenvolvimento.[11]

É importante considerar que os resultados da hemocultura levam um certo tempo para ficarem prontos, de horas a dias, necessitando dessa forma de um tratamento empírico inicial dos casos suspeitos para prevenir mortes e complicações devido à infecção. No entanto, a adequação desta terapia empírica está sendo desafiada atualmente por causa da mudança do perfil microbiológico e do aumento da resistência antimicrobiana, haja vista muitos casos de multirresistência a antimicrobianos.[5]

Para o manejo efetivo dos casos de sepse neonatal, o estudo do perfil bacteriológico com seu padrão de sensibilidade a antimicrobianos desempenha um papel significativo. Diante do exposto, o objetivo desse estudo é determinar a prevalência de microrganismos em hemoculturas positivas e o perfil de sensibilidade antimicrobiana apresentado por estes patógenos em pacientes com infecção de corrente sanguínea internados na UTI neonatal de um hospital no Nordeste brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo transversal, retrospectivo, com descrição quantitativa foi realizado com base nos resultados das culturas feitas, entre o período de junho de 2015 a junho de 2017, com as amostras de sangue de RNs admitidos na unidade neonatal de terapia intensiva da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), um hospital de ensino e de cuidados terciários localizado no interior do estado do Ceará, na região nordeste brasileira.

Instrumento de pesquisa

A pesquisa foi realizada utilizando o sistema automatizado Vitek® 2 Compact Biomérieux, que identifica a espécie bacteriana e realiza o antibiograma para determinação da sensibilidade antimicrobiana. Os resultados das análises ficam armazenados estatisticamente no sistema e são obtidos através da inoculação das amostras utilizando o cartão Vitek GPI (Biomérieux), seguindo as instruções do fabricante quanto ao preparo do inóculo, leitura e interpretação. Assim, o sistema constituiu, mediante autorização prévia da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar e após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas de uma instituição conveniada, o principal instrumento da referida pesquisa.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na pesquisa os resultados de pacientes da referida unidade com hemocultura positiva e excluídos da pesquisa os resultados negativos.

Análise estatística dos dados

Os dados foram coletados em um formulário padronizado e armazenados em uma planilha eletrônica de dados (Microsoft Excel®, versão 2013). Para a análise estatística, foram aplicados o teste χ^2 e o teste t conforme apropriado. Nas estatísticas descritivas foram utilizados números absolutos, porcentagens e medidas de tendência central (média, mediana, desvio padrão, valores mínimos e máximos). Nos testes aplicados, o nível de significância foi estabelecido em 95% ($p < 0,05$).

ÉTICA

A coleta de dados teve início após a aprovação da entidade supracitada, com parecer número 2.155.565 (relatoria 04/07/2017) e os parâmetros éticos desta pesquisa foram respeitados de acordo com as normativas nacional (Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012) e internacional (Declaração de Helsink/Word Medical Association), com vistas a pesquisas envolvendo seres humanos, de forma direta ou indireta.

RESULTADOS

Durante o período em estudo, foram isolados 93 microrganismos nas culturas de sangue. Dos patógenos encontrados, 88 são bactérias, os outros cinco são fungos, todos do gênero *Candida*. Dos 88 isolados bacterianos, o *Staphylococcus c*oagulase-negativo (63,4%) foi o que se apresentou com maior frequência, seguido pela *Klebsiella pneumoniae* (10,7%), *Staphylococcus aureus* (5,4%); as espécies *Enterobacter* sp., *Serratia marcescens* e *Enterococcus faecalis* se mostraram cada uma com 3,2% do total, a *Pseudomonas* sp. com 2,1%, e *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis* e *Streptococcus agalactiae* com 1,1% cada. Dessa forma, no total, havia vinte (21,5%) isolados Gram-negativos e 68 (73,1%) isolados Gram-positivos nas hemoculturas. Os fungos *Candida* sp. somaram 5,4% do total (Tabela 1).

Com relação aos resultados do antibiograma, os organismos Gram-negativos apresentaram maior sensibilidade à colistina (100%), ao meropenem (95%), ao imipenem (90%) e à amicacina (75%). Não apresentaram boa sensibilidade às cefalosporinas e foram bastante resistentes à ampicilina, com apenas uma bactéria sensível à droga, resultando numa sensibilidade de 5% (Tabela 2). Os microrganismos Gram-positivos mostraram uma maior sensibilidade ao linezolida, tigeciclina e à vancomicina, todos 100% sensíveis a estes medicamentos. Também apresentaram considerável sensibilidade à teicoplanina (81%) e foram menos sensíveis à eritromicina (7%) e à benzilpenicilina (6%) (Tabela 3).

Tabela 1 - Distribuição dos microrganismos isolados nas hemoculturas da UTI neonatal

Microrganismos Isolados	Frequência
Gram-negativos	**20 (21,5 %)**
Acinetobacter baumannii	1 (1,1%)
Enterobacter sp.	3 (3,2%)
Klebsiella pneumoniae	10 (10,7%)
Proteus mirabilis	1 (1,1%)
Pseudomonas sp.	2 (2,1%)
Serratia marcescens	3 (3,2%)
Gram-Positivos	**68 (73,1%)**
Enterococcus faecalis	3 (3,2%)
Staphylococcus aureus	5 (5,4%)
Staphylococcus coagulase-negativa	59 (63,4%)
Streptococcus agalactiae	1 (1,1%)
Fungos	**5 (5,4%)**
Candida sp.	5 (5,4%)
Total	**93**

Tabela 2 - Sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos Gram-negativos

Drogas	Microrganismos Gram-Negativos - n (%)						Total Sensibilidade
	Acinetobacter baumannii	*Enterobacter* sp.	*Klebsiella* sp.	*Proteus mirabilis*	*Pseudomonas* sp.	*Serratia marcescens*	
Amicacina	1 (100%)	3 (100%)	8 (80%)	1 (100%)	1 (50%)	1 (33%)	15 (75%)
Ampicilina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
Ampicilina/Sulbactan	1 (100%)	0 (0%)	2 (20%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (20%)
Cefepima	1 (100%)	1 (33%)	2 (20%)	1 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	8 (40%)
Cefoxitina	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (33%)	12 (60%)
Ceftazidima	1 (100%)	0 (0%)	2 (20%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (33%)	5 (25%)
Ceftriaxona	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (33%)	3 (15%)
Cefuroxima	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)
Cefuroxima Axetil	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)
Ciprofloxacina	1 (100%)	3 (100%)	5 (50%)	1 (100%)	1 (50%)	3 (100%)	14 (70%)
Colistina	1 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	20 (100%)
Ertapenem	-*	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)	-*	3 (100%)	-*
Gentamicina	1 (100%)	0 (0%)	1 (10%)	1 (100%)	1 (50%)	1 (33%)	5 (25%)
Imipenem	1 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	0 (0%)	1 (50%)	3 (100%)	18 (90%)
Meropenem	1 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)	1 (50%)	3 (100%)	19 (95%)
Piperacilina/Tazobactam	1 (100%)	3 (100%)	6 (60%)	1 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	14 (70%)
Tigeciclina	1 (100%)	3 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (33%)	14 (70%)
Total	**1**	**3**	**10**	**1**	**2**	**3**	**20**

*Droga não testada

Tabela 3 - Sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos Gram-positivos

Drogas	Microrganismos Gram-Negativos - n (%)				
	Enterococcus faecalis	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus* coagulase-negativa	*Streptococcus agalactiae*	Total sensibilidade
Ampicilina	2 (67%)	-*	-*	1 (100%)	-*
Benzilpenicilina	2 (67%)	0 (0%)	1 (2%)	1 (100%)	4 (6%)
Ciprofloxacina	3 (100%)	2 (40%)	8 (14%)	1 (100%)	14 (21%)
Clindamicina	0 (0%)	2 (40%)	8 (14%)	1 (100%)	11 (16%)
Eritromicina	0 (0%)	1 (20%)	3 (5%)	1 (100%)	5 (7%)
Estreptomicina AN	2 (67%)	-*	-*	-*	-*
Gentamicina	-*	4 (80%)	10 (17%)	-*	-*
Gentamicina AN	3 (100%)	-*	-*	-*	-*
Linezolid	3 (100%)	5 (100%)	59 (100%)	1 (100%)	68 (100%)
Moxifloxacina	3 (100%)	2 (40%)	8 (14%)	1 (100%)	14 (21%)
Norfloxacina	3 (100%)	2 (40%)	8 (14%)	0 (0%)	13 (19%)
Oxacilina	-*	1 (20%)	3 (5%)	-*	-*
RI à Clindamicina	-*	5 (100%)	58 (98%)	-*	-*
Rifampicina	-*	3 (60%)	57 (97%)	-*	-*
Teicoplanina	3 (100%)	5 (100%)	46 (78%)	1 (100%)	55 (81%)
TE de cefoxitina	-*	1 (20%)	3 (5%)	-*	-*
Tigeciclina	3 (100%)	5 (100%)	59 (100%)	1 (100%)	4 (6%)
Trimetoprim/Sulfametoxazol	-*	4 (80%)	15 (25%)	-*	14 (21%)
Vancomicina	3 (100%)	5 (100%)	59 (100%)	1 (100%)	11 (16%)
Ácido Fusídico	-*	5 (100%)	57 (97%)	-*	5 (7%)
Total	**3**	**5**	**59**	**1**	**68**

* Droga não testada; AN = Alto Nível; RI = Resistência induzida; TE = Teste de *screening*

Para *Candida* sp. foram testados os seguintes fármacos antifúngicos: anfotericina B, caspofungina, fluconazol, micafungina e voriconazol e todas as espécies apresentaram 100% de sensibilidade aos mesmos.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a sepse neonatal foi mais encontrada tendo como etiologia um Gram-positivo (73,1%) do que um Gram-negativo (21,5%), sendo esse resultado semelhante ao que foi encontrado num estudo realizado por Mehta et al., no qual mostra os Gram-positivos com uma frequência de 67,8%, Gram-negativos (28,7%) e fungos (2,87%), porém, contrário a outros estudos de Vijayvergia et al., Vaniya et al. e Singh et al., que mostram os Gram-negativos com uma frequência maior.[9,12-14] A taxa de mortalidade da SN pode variar com cada tipo de microrganismo causador (40% para Gram-negativos, 28% para fungos), além do estado de imunocompetência do RN e complicações associadas.[15]

Entre os microrganismos Gram-negativos, encontrou-se *Klebsiella pneumoniae* como o isolado mais comum, o que foi semelhante a alguns outros estudos realizados por Sawhney et al. e Bhurle et al., podendo-se também destacar as espécies de *Enterobacter* sp. e *Serratia marcescens*.[5,16] Neste estudo, o isolado mais comum entre os Gram-positivos foi o *Staphylococcus* coagulase-negativa, nos seus subtipos *S. epidermidis, S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. warneri*, vindo confirmar o que já estava sendo relatado nos hospitais brasileiros, onde este microrganismo se apresenta como principal etiologia das SN, e os estudos de Vijayvergia et al., Bhurle et al., e Mythri et al. também mostram resultados similares.[9,16,17] A SN tardia, tendo como agente etiológico o *Staphylococcus* coagulase-negativa, está intimamente associada ao uso de cateter vascular central (CVC), e o *S. epidermidis* foi o microrganismo isolado em praticamente metade (48,7%) das culturas positivas da ponta de CVC em um estudo realizado por Brito et al.[18]

O padrão de sensibilidade antimicrobiana encontrado neste estudo revelou que a maioria das bactérias Gram-negativas é sensível à colistina, meropenem e imipenem, e alguns estudos realizados por Jyothi et al. e Mustafa et al. corroboram com esse resultado. Também foram encontradas sensibilidades menores às cefalosporinas.[19,20]

As bactérias Gram-positivas apresentaram boa sensibilidade ao linezolida e à vancomicina, o que é comparável aos estudos de Mehta et al. e Mustafa et al. e foram menos sensíveis à eritromicina (7%) e à benzilpenicilina (6%).[12,20] O estudo de Vijayvergia et al. mostrou a eritromicina e a ampicilina como as drogas antimicrobianas pelas quais os patógenos já criaram mecanismos de resistência.[9]

As drogas de escolha para o tratamento de SN precoce, de acordo com as diretrizes brasileiras, são ampicilina e gentamicina, para agir bem nos dois tipos de Gram, sendo as doses variáveis de acordo com o peso e idade da criança.[21] Nesse estudo, os Gram-negativos apresentaram baixa sensibilidade a esses fármacos (apenas 5% foram sensíveis à ampicilina e 25% à gentamicina). Para os *Staphylococcus* coagulase-negativo, o Gram-positivo mais frequente, a sensibilidade à gentamicina também foi baixa, apenas 17% eram sensíveis (ampicilina não foi testada nesse grupo).

A escolha dos antimicrobianos para tratamento de SN tardia depende da microbiota prevalente no ambiente. Portanto, deve ser direcionada conforme a flora de cada serviço, ressaltando assim a importância de estudos como este para se conhecer o perfil microbiológico de cada unidade de um hospital. Em caso de RN sem tratamento prévio para sepse e com estabilidade clínica, as diretrizes recomendam iniciar o esquema com oxacilina e um aminoglicosídeo (gentamicina ou amicacina).[21] Nesse estudo, 95% dos *Staphylococcus* coagulase-negativa foram resistentes à oxacilina. Entre os Gram-negativos, 25% apresentaram resistência à amicacina e 75% à gentamicina.

A resistência à oxacilina foi observada em 80% dos isolados de *S. aureus*, sugerindo a presença de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) neste hospital. Todas as cepas de *S. aureus* isoladas foram sensíveis à vancomicina, teicoplanina e ao linezolida. Estudos realizados por Vijayvergiaet al. e Sheth et al. mostraram MRSA em uma proporção menor, 37,5% e 26,7% dos isolados, respectivamente.[9,22] A vancomicina e teicoplanina são tratamentos de segunda linha no escalonamento dos antimicrobianos, em caso de MRSA. Se houver resistência a esses fármacos, o linezolida é uma opção.[23]

Todas as espécies de *Enterococcus* encontradas apresentaram sensibilidade à vancomicina. Encontrar um *Enterococcus* resistente à vancomicina pode ser um grave problema, pois estas bactérias já desenvolveram mecanismos de resistência à maioria dos antimicrobianos disponíveis e têm o potencial de serem reservatórios para genes resistentes a glicopeptídeos que podem ser transferidos para outros agentes patogênicos mais virulentos.[9] Recomenda-se o uso racional de antimicrobianos e principalmente avaliar criteriosamente o uso de carbapenêmicos e vancomicina pelo difícil manuseio em casos de resistência a esses medicamentos.[21]

A resistência a múltiplos fármacos antimicrobianos foi encontrada em alguns Gram-negativos, podendo-se citar a *Pseudomonas* sp., que foi resistente a 56% das drogas testadas, e o *Enterobacter* sp., resistente a 47% das drogas, reiterando a necessidade de se reavaliarem os antimicrobianos de acordo com o resultado da hemocultura ou evolução clínica do paciente.

Das espécies de *Candida* isoladas, 60% foram de *C. albicans* e 40% de *C. parapsilosis*. A *C. albicans* é responsável por 75% das infecções fúngicas neonatais, segundo Krebs et al.[4] Os estudos publicados mostram uma alta mortalidade neonatal relacionada a infecções por *Candida*, quando se compara aos controles, com taxas de mortalidade variando entre 20% a 44%.[24,25]

A etiologia microbiana da sepse neonatal é diversificada. Diversos estudos já documentaram a variedade de microrganismos causadores e sua variabilidade temporal, bem como as mudanças no perfil de sensibilidade antimicrobiana.

Para o uso correto do resultado da cultura, excluir a contaminação é muito importante. As culturas de sangue falso-positivas são geralmente uma consequência da contaminação das amostras de sangue pelas bactérias da pele e do ambiente do RN e fazem com que a criança receba um tratamento desnecessário prolongando o tempo de internamento na unidade.[9] Para distinguir a infecção da contaminação da cultura por outros microrganismos, podem ser realizadas análises detalhadas das informações clínicas específicas para identificar os verdadeiros patógenos. Isso, porém, não foi realizado nesse estudo

Na análise dos resultados, não foi possível distinguir infecções adquiridas na comunidade das adquiridas no hospital, uma vez que sendo este um estudo dos registros microbiológicos, a correlação com a morbidade e a mortalidade neonatal e a outros fatores relacionados também não foi possível.

CONCLUSÃO

Ter conhecimento das características relacionadas à sensibilidade e resistência microbiana aos fármacos utilizados no meio hospitalar é fundamental para uma melhor abordagem ao paciente com sepse neonatal. Isso se deve à necessidade de um manejo mais direcionado que possibilite uma recuperação mais rápida e menos dolosa ao recém-nascido.

Tal fato se reforça pela mudança no perfil microbiológico dos agentes infecciosos, assim como o surgimento frequente de cepas multirresistentes aos fármacos antimicrobianos rotineiramente utilizados, dificultando o tratamento e reduzindo consideravelmente as chances de sobrevida.

Partindo desse pressuposto, este estudo permitiu verificar a prevalência dos agentes microbianos causadores de sepse em recém-nascidos, assim como o grau de resistência das diferentes espécies aos medicamentos utilizados. O conhecimento adquirido possibilitará um tratamento mais eficiente em cada caso, com base no quadro apresentado pelo paciente e as características do agente causador.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Ceará e ao Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Misericórdia de Sobral pelo apoio e colaboração para a construção deste trabalho.

Abstract

Objective: *To determine the prevalence of microorganisms and the antimicrobial sensitivity profile in positive blood cultures of patients with bloodstream infection in the neonatal Intensive Care Unit of a hospital in the Brazilian Northeast.* ***Methods:*** *Cross-sectional, retrospective study with quantitative description of hemoculture results of neonates admitted to the neonatal intensive care unit of a Brazilian Northeast hospital.* ***Results:*** *Neonatal sepsis had as its main etiology Gram-positive bacteria responsible for 73.1% of the positive cultures, with* coagulase-negative Staphylococcus *being the main agent, while 21.5% were due to a Gram-negative agent. Gram-positive bacteria showed good sensitivity to linezolid and vancomycin and most Gram-negative strains were susceptible to colistin, meropenem and imipenem. All coagulase-negative* Staphylococcus *isolates were sensitive to linezolid, vancomycin and tigecycline.* ***Conclusion:*** *Knowledge of the characteristics related to antimicrobial susceptibility and resistance is fundamental for a better approach to the patient with neonatal sepsis, promoting a more targeted management that allows a faster recovery of the newborn. The knowledge gained from this study will allow a more efficient treatment in each case, based on the patient's presentation and the characteristics of the causative agent.*

Keywords

Neonatal sepsis; drug resistance, microbial; intensive care units, neonatal; microbial sensitivity tests; blood culture

REFERÊNCIAS

1. Meadow W, Rudinsky B. Inflamatory mediators and neonatal sepsis: rarely has so little been known by so many about so much. Clin Perinatol. 1995;22(2):519-36.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios diagnósticos de infecções relacionadas à assistência à saúde. Brasília, DF: Anvisa; 2013.
3. Ministério da Saúde. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2011
4. Krebs VLJ, Diniz EMA, Vaz FAC. Infecção fúngica em UTI neonatal. Pediatr. Mod. 2000;36:188-191.
5. Sawhney N, Shinu P, Singh VA. Bacteriological profile and antibiotic susceptibility pattern of neonatal septicaemia in a tertiary care hospital. J Curr Microbiol App Sci 2015;4(10):977-84.
6. Goulart AP, Valle CF, Dal-Pizzol F, Cancelier ACL. Risk factors for early-onset neonatal sepsis in Brazilian public hospital short-title: early-onset neonatal sepsis. Rev Bras Ter Intensiva. 2006 Jun;18(2): 148-53. [Article in Portuguese].
7. Word Health Organization (WHO). Neonatal and perinatal mortality: country, regional and global estimates. Geneva: WHO, 2006.
8. Ministério da Saúde. Datasus: Informações de Saúde (TABNET). [Acesso em 22 abr 2017]. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br.
9. Vijayvergia V, Gupta S, Goyal J. Neonatal Septicemia - Bacteriological spectrum and antibiogram - A study from a tertiary care center of north India. J Curr Microbiol Appl Sci. 2016;5:741-50.
10. Silveira RC, Procianoy RS. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. Bol Cient Ped. 2012;1(1):29-35.
11. Organização Mundial da Saúde (OMS). A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Opções de Ação: Sumário Executivo. Geneva. OMS, 2012.
12. Mehta AM, Kaore NM, Prabhu TK. Microbial profile of neonatal septicaemia in a tertiary care hospital of Bhopal. Int J biomed adv res 5(10):499-501.
13. Vaniya HV, Patel NM, Agrawal JM, Trivedi HR, Dhanani JV, Balat JD. Antimicrobial culture sensitivity pattern in neonatal sepsis in a tertiary-care hospital. Int J Med Sci Public Health. 2016;5(4):661-5.
14. Singh HK, Sharja P, Onkar K. Bacteriological profile of neonatal sepsis in neonatal intensive care unit (NICU) in a tertiary care hospital: prevalent bugs and their susceptibility patterns. Eur J Pharm Med Res. 2016;3(3):241-245. Available from: http://www.ejpmr.com/admin/assets/article_issue/1457056566.pdf.
15. Miura E, Silveira RC, Procianoy RS. Sepse neonatal: diagnóstico e tratamento. J. pediatr. (Rio J.) 1999;75 (Supl.1):S57-S62.
16. Bhurle A, Solabannavar S. Neonatal septicemia isolates and antibiotic susceptibility pattern in a tertiary care hospital in North Karnataka. Int. J Med Health Res. 2004;1:25-9.
17. Mythri BA, Patil AB, Divya A, Mansabdar P, Sharon VA. Bacteriological profile and antibiogram of neonatal septicemia in a tertiary care Hospital. Indian J Microbiol Res 2016;3(2):136-40.
18. Brito CS, Ribas RM, Resende DS, et al. Genotypic study documents divergence in the pathogenesis of bloodstream infection related central venous catheters in neonates. Braz J Infect Dis. 2014;18(4):387-93.
19. Jyothi P, Basavaraj MC, Basavaraj PV. Bacteriological profile of neonatal septicemia and antibiotic susceptibility pattern of the isolates. J Nat Sci Biol Med. 2013;4(2):306-09.
20. Mustafa M, Ahmed SL. Bacteriological profile and antibiotic susceptibility patterns in neonatal septicemia in view of emerging drug resistance. J Med Allied Sci. 2014;4(1):02-08.
21. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Protocolos Clínicos: Sepse Neonatal. Belo Horizonte, MG: 2013
22. Sheth KV, Patel TK, Tripathi CB. Antibiotic sensitivity pattern in neonatal intensive care unit of a tertiary care hospital of India. Asian J. Pharm. Clin. Res. 2012;5:46-50.
23. Luna CM, Noriega ER, Bavestrello L, Gotuzzo E. Tratamento de Staphylococcus aureus resistente à meticilina na América Latina. . Braz J Infect Dis [Internet]. 2010 Dec;14(Suppl 2): 119-127. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000800007&lng=en.
24. Kossof EH, Buescher ES, Karlowicz MG. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. Pediatr Infect Dis J. 1998 Jun;17(6):504-8.
25. Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J et al. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. Pediatr Infect Dis J. 2000 Apr;19(4):319-24.

Correspondência

Natanael Aguiar de Sousa

Av. Comte. Maurocélio Rocha Ponte, 100 - Bairro Derby

Sobral-CE, Brasil

Influência do tempo de centrifugação em testes de coagulação: tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial

Influence of the centrifuge time in coagulation tests: prothrombin time and partial thromboplastin time

Bianca da Rosa Oliveira[1]
Bruno Ribeiro Cruz[2]
Mariane de Faria Moss[2]
Danielle Cristyane Kalva Borato[3]

Resumo
Objetivo: Analisar os testes de coagulação: tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial (TTP) em diferentes tempos de centrifugação da amostra da biológica, com relação ao protocolo padrão do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). **Métodos:** As amostras foram divididas em cinco alíquotas de 1 mL. Foi realizada a centrifugação em 15, 10, 5, 2 e 1 minuto, com velocidade de 1500 g. O TP e TTP foram imediatamente analisados em aparelho automatizado. Os plasmas foram analisados para presença de elementos residuais: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. **Resultados:** Observou-se alteração dos valores do TP nos tempos de centrifugação 10, 5, 2 e 1 minuto e do TTP em 5, 2 e 1 minuto, com relação ao protocolo padrão. Na interpretação de Bland Altman, observou-se um viés significativo do limite clínico aceitável para o TP e para o TTP em todos os tempos de centrifugação, com relação ao protocolo padrão. Apenas no tempo de centrifugação de 15 minutos não foram encontradas células residuais nas amostras analisadas. **Conclusão:** O tempo de centrifugação de 15 minutos é o ideal para remoção completa das células sanguíneas residuais e para garantia da confiabilidade dos resultados dos testes de coagulação TP e TTP.

Palavras-chave
Centrifugação; tempo de protrombina; tempo de tromboplastina parcial; testes de coagulação sanguínea

INTRODUÇÃO

O sistema de coagulação é frequentemente investigado por meio de dois testes clássicos de coagulação *in vitro*, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial (TTP), considerados testes de triagem.(1) Enquanto que o TP avalia a ação dos fatores da via extrínseca da coagulação, o TTP avalia a ação dos fatores da via intrínseca da coagulação.(1)

Os cuidados pré-analíticos, como a centrifugação da amostra, são críticos para manter a integridade da amostra e a qualidade dos resultados dos testes de coagulação.(2) Desta forma, a padronização do tempo de centrifugação na fase pré-analítica é essencial para obtenção de resultados confiáveis dos testes de coagulação.(3) Como a centrifugação é um dos passos mais críticos na fase pré-analítica, tempos de centrifugação reduzidos ou aumentados podem ser prejudiciais para confiabilidade dos resultados laboratoriais.(4,5)

Por exemplo, o tempo abaixo de 15 minutos para rotina de coagulação pode resultar em um plasma incompleto de separação, com elementos de células sanguíneas residuais, especialmente plaquetas, prejudicando os resultados.(5) Desta forma, os testes de coagulação devem ser realizados em amostras de plasma pobre em plaquetas, com concentração de plaquetas no plasma inferior a 10.000/mm^3.(2,6) Entretanto, procedimentos laboratoriais confiáveis para reduzir o tempo necessário de centrifugação podem melhorar o tempo de entrega dos resultados dos testes de coagulação.(5)

[1]*Graduanda em Farmácia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa - PR, Brasil.*
[2]*Doutor em Medicina pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Professor da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa - PR, Brasil.*
[3]*Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa - Professora da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa - PR, Brasil.*

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa - PR, Brasil.

Conflitos de interesse: não há conflitos de interesse.
Suporte financeiro: financiamento próprio.

Recebido em 16/10/2018
Artigo aprovado em 23/01/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900782

A recomendação atual do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) é a realização de centrifugação em 1500 g por 15 minutos, à temperatura ambiente.[6] Porém, estudos têm demonstrado que tempos de centrifugação inferior a 15 minutos não prejudicam a avaliação do TP e TTP.[5,7,8]

Desta forma, não existe um consenso na literatura atual com relação ao tempo de centrifugação para TP e TTP. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar os resultados dos testes de coagulação: TP e TTP em diferentes tempos de centrifugação da amostra biológica, com relação ao protocolo padrão estabelecido pelo CLSI.

MATERIAL E MÉTODOS

Os voluntários desta pesquisa foram recrutados do LABCENTER Laboratório de Análises Clínicas Limitada, em Itararé no estado de São Paulo. As amostras biológicas de sangue venoso foram coletadas conforme procedimento padrão por farmacêutico-bioquímico habilitado. Para todas as coletas, foi respeitado um período máximo de 30 segundos de garroteamento, sendo excluídas as coletas traumáticas.

O sangue total foi distribuído em dois tubos primários de 3,5 mL com anticoagulante Citrato de Sódio 3,2% Vacuette® (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), respeitando o volume recomendado, garantindo a proporção adequada entre a amostra e o anticoagulante (nove partes de sangue total para uma de anticoagulante). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas por inversão suave de cinco a oito vezes. Em seguida, foi verificado o hematócrito dos voluntários no contador hematológico ABX Pentra 60® (Horib ABX Diagnostics, Montpellier, França) e as amostras com hematócrito superior a 55% foram excluídas da análise, uma vez que podem ocasionar falsos prolongamentos no TP, TTP e fatores de coagulação. Também foram excluídas amostras com hemólise e lipêmicas.

O sangue total dos tubos de Citrato de sódio 3,2% foram divididos em cinco alíquotas de 1 mL cada, em tubos de plástico. A primeira alíquota foi imediatamente centrifugada (ALB 32/15 CS 3.5, INBRAS®, Indústria Brasileira de Equipamentos para Saúde, São Paulo, Brasil) de acordo com o protocolo padrão (1.500 g por 15 min à temperatura ambiente), utilizando o freio automático.

Em seguida, quatro alíquotas foram centrifugadas em diferentes tempos: um, dois, cinco e dez minutos com a velocidade de referência (1.500 g). Após a centrifugação, os tubos foram mantidos tampados até a execução do teste, para evitar a mudança do pH da amostra, que pode interferir nos resultados.

Todas as alíquotas foram imediatamente analisadas em aparelho automatizado (CLOTimer® CLOT Produtos para Coagulação, São Paulo, Brasil), para os testes de coagulação TP e TTP, utilizando os seguintes reagentes TP: Wierner lab Soluplastin (Wierner lab, Rosario, Argentina); TTP: Wama diagnóstica (WAMA Diagnóstica, São Carlos, Brasil).

As alíquotas de plasma foram analisadas no contador hematológico ABX Pentra 60® (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, França) com relação aos parâmetros: contagem de eritrócitos, leucócitos totais e contagem de plaquetas.

Na análise estatística, foi avaliada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados demonstraram distribuição normal e foram apresentados em valores médios. Para avaliar os resultados dos diferentes tempos de centrifugação em relação ao protocolo padrão (1.500 g por 15 min à temperatura ambiente) foi utilizado o teste de T-student para amostras pareadas e a concordância entre os resultados foi verificada pelo método de Bland & Altman. Além disso, foi analisado se os limites encontrados apresentam diferenças aceitáveis do ponto de vista clínico, sendo considerado como viés máximo permitido, de acordo com os "Critério de Ricós" ± 2,0% para o TP e ± 2,3% para o TTP.[9] Em todas as análises, o nível de significância foi pré-fixado em $p<0,05$. Os dados foram analisados pelo programa MedCalc®, versão 11.4.2.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).

ÉTICA

Os participantes foram devidamente informados sobre os métodos e objetivos deste estudo e, após concordarem, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), parecer N° 1.339.496. Esta pesquisa foi realizada em conformidade com a Declaração de Helsinki.

RESULTADOS

Foram selecionadas dez amostras biológicas de sangue venoso de indivíduos saudáveis com idade média de 36,5 ± 14,7 anos, sendo quatro (40%) do sexo masculino e seis (60%) do sexo feminino.

Os resultados dos valores médios obtidos para os testes de coagulação TP e TTP, de acordo com os tempos de centrifugação, estão representados na Figura 1 A e B; respectivamente.

Para o TP observou-se diferença estatística em relação ao protocolo padrão (1.500 g por 15 min à temperatura ambiente), para os tempos de centrifugação de dez minutos ($p=0,005$), cinco minutos ($p=0,001$), dois minutos ($p=0,001$) e um minuto ($p<0,001$), enquanto que para o TTP não foi observada diferença estatística para os valores mé-

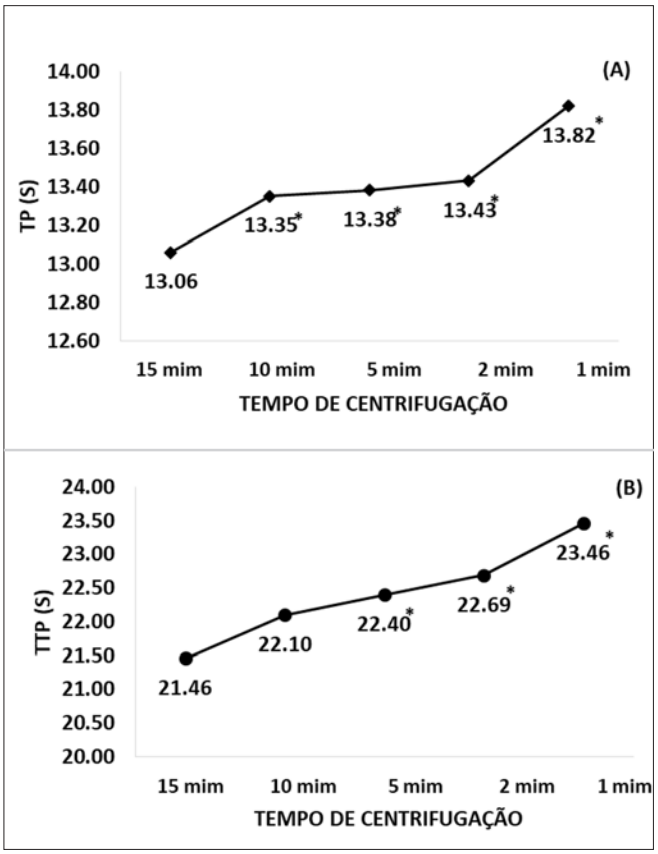


*Figura 1. Comparação dos valores médios obtidos para o teste tempo de protrombina (A) e tempo de tromboplastina parcial (B) nos tempos de centrifugação 10, 5, 2 e 1 minuto em relação ao protocolo padrão (1.500 x g por 15 min à temperatura ambiente). Teste de T-student para amostras pareadas. *diferença estatística p<0,05.*

dios no tempo de dez minutos de centrifugação (p=0,062); porém, em cinco minutos (p=0,010), dois minutos (p=0,030) e um minuto (p=0,018) observou-se aumento significativo dos valores.

Os valores máximos dos elementos residuais: eritrócitos, leucócitos e plaquetas encontrados em todas as amostras analisadas de acordo com os tempos de centrifugação estão representados na Figura 2. No tempo de centrifugação de 15 minutos não foram encontradas células residuais nas amostras analisadas (Figura 2).

Observou-se presença de eritrócitos em cinco amostras apenas no menor tempo de centrifugação, de um minuto (Figura 2 A). Uma amostra apresentou 100 leucócitos/mm^3 nos tempos de dez e cinco minutos de centrifugação. No tempo de dois minutos, cinco amostras apresentaram 100 leucócitos/mm^3, enquanto que no tempo de um minuto observou-se contagem de 400 leucócitos/mm^3 em uma dessas amostras (Figura 2 B).

A contagem de plaquetas foi o parâmetro que apresentou maior alteração nos tempos de centrifugação de cinco, dois e um minuto (Figura 2 C). Em cinco minutos de centrifugação duas amostras apresentaram 1.000 plaquetas/mm^3 (Figura 2 C). Enquanto que em dois minutos observou-se grande oscilação dos valores em sete amostras, com valor mínimo detectado de 1.000 plaquetas/mm^3 e valor máximo de 17.000 plaquetas/mm^3 (Figura 2 C). No tempo de um minuto de centrifugação houve oscilação da contagem em todas as amostras com valor mínimo de 3.000 plaquetas/mm^3 para 97.000 plaquetas/mm^3 (Figura 2 C).

Os resultados da interpretação de Bland Altmam para o TP estão representados na Figura 3 e para o TTP na Figura 4. Observou-se um viés significativo do limite clínico aceitável de ± 2,0% para o TP e ± 2,3% para o TTP para todos os tempos de centrifugação.

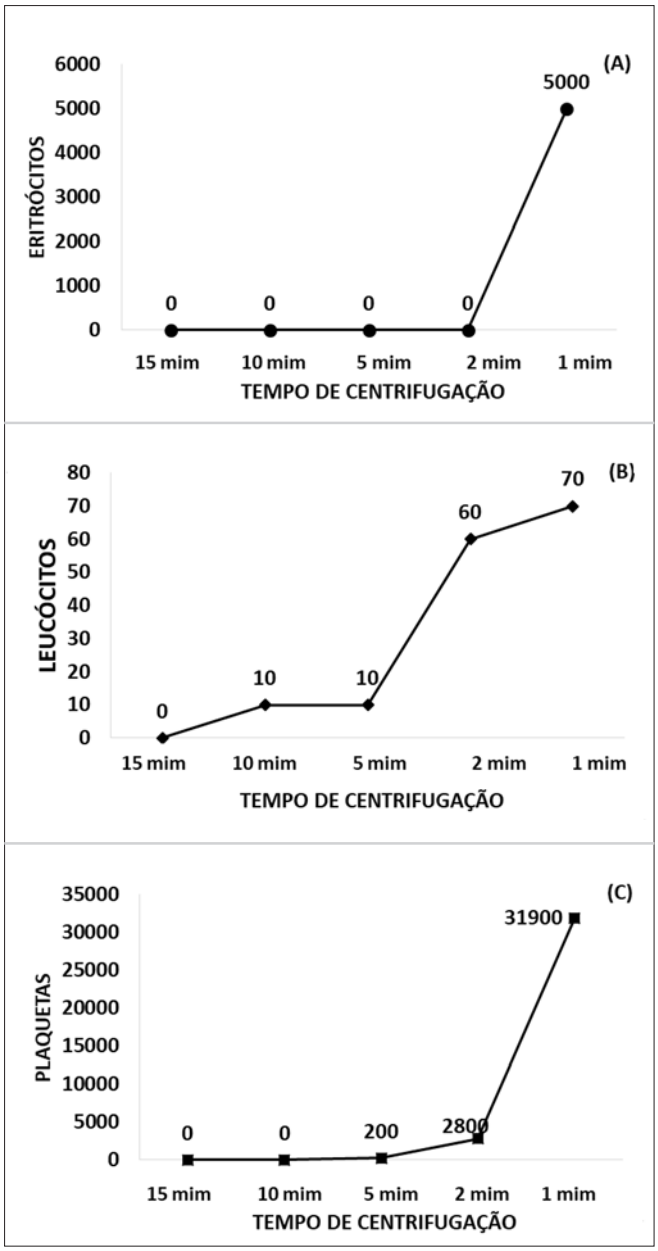


Figura 2. Valores máximos de contagem de eritrócitos (A), leucócitos totais (B) e contagem de plaquetas (C) detectados nas amostras analisadas, de acordo com os tempos de centrifugação.

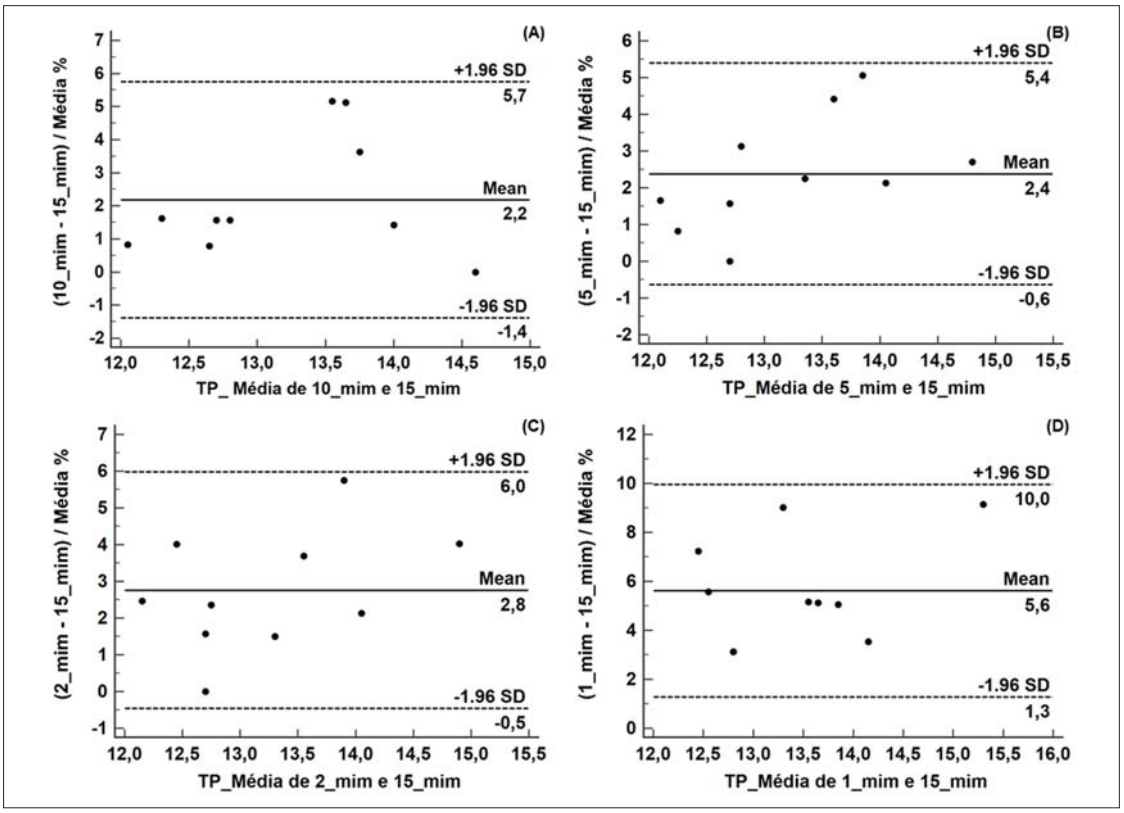


Figura 3. Gráficos de Bland Altmam para os resultados do Tempo de Protrombina: análise de concordância entre as amostras realizadas pelo protocolo padrão (1.500 x g por 15 min à temperatura ambiente) e as amostras centrifugadas em 10, 5, 2 e 1 minuto (A, B, C e D; respectivamente).

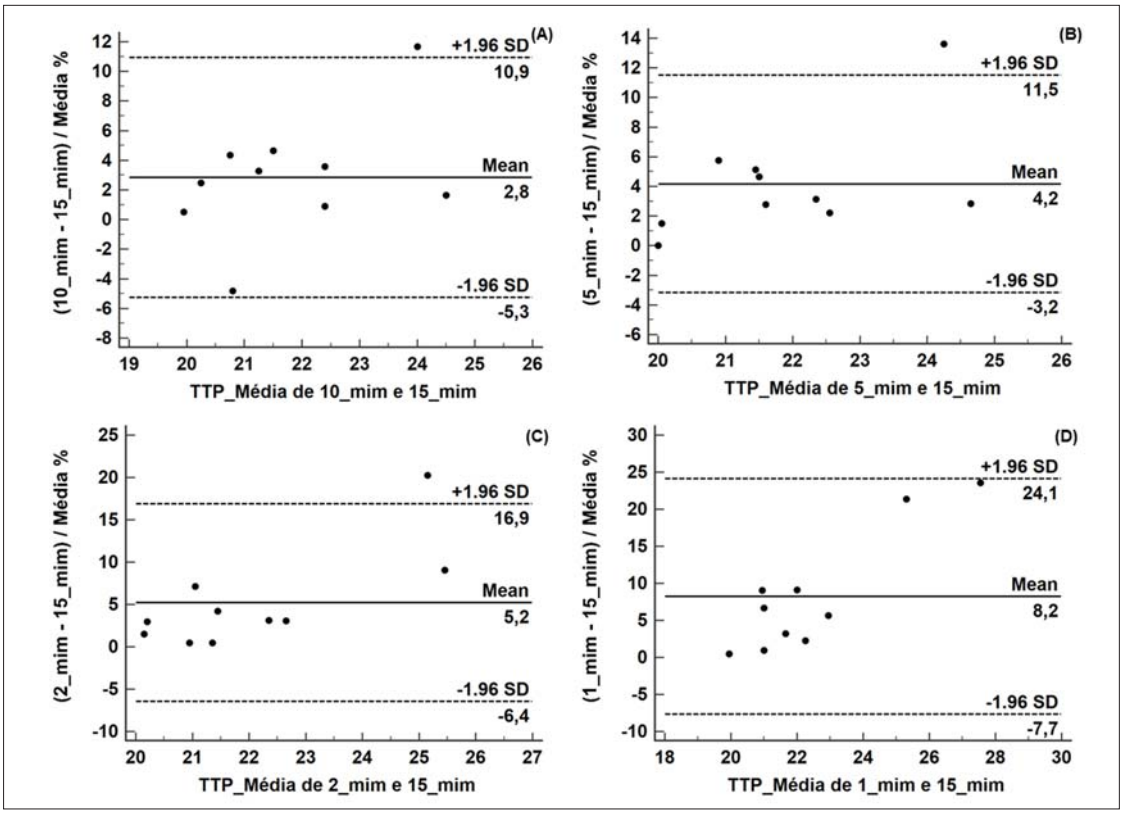


Figura 4. Gráficos de Bland Altmam para os resultados do Tempo de Tromboplastina Parcial: análise de concordância entre as amostras realizadas pelo protocolo padrão (1.500 x g por 15 min à temperatura ambiente) e as amostras centrifugadas em 10, 5, 2 e 1 minuto (A, B, C e D; respectivamente).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram para o TP aumento nos valores das amostras centrifugadas por dez minutos ou menos, enquanto que para o TTP houve variação dos resultados das amostras centrifugadas por cinco minutos ou menos. Deve ser levado em consideração que, com dez minutos de centrifugação, as amostras apresentaram células sanguíneas residuais, os leucócitos, e com cinco minutos houve a presença principalmente das plaquetas. Portanto, o presente estudo demonstrou que o tempo de centrifugação de 15 minutos é o ideal para remoção completa das células sanguíneas residuais, que podem interferir nos resultados dos testes de coagulação quando utilizado uma força centrífuga relativa de 1.500 g.

A oscilação dos valores de TTP pode ser explicada principalmente pela presença das plaquetas residuais nas amostras analisadas.[10] As plaquetas podem fornecer a superfície fosfolipídica para ativar os fatores de coagulação e, portanto, interferir no diagnóstico laboratorial de testes que utilizam fosfolipídios como reativo.[10] A recomendação para realização dos testes de coagulação é a utilização de plasma pobre em plaquetas com contagem plasmática inferior a 10.000/mm^3;[6] no entanto, o presente estudo encontrou valores superiores do aconselhado somente em dois minutos ou menos de centrifugação.

Contudo, Lippi et al. demonstraram que os tempos de centrifugação de cinco a dez min, em força centrífuga relativa de 1.500 g, podem ser adequados para obtenção de resultados confiáveis dos testes de coagulação de rotina, TP e TTP, mesmo com a presença de plaquetas residuais de 39.000/mm^3 a partir do tempo de dez minutos de centrifugação.[5] Esse estudo não demonstrou alteração para os valores médios de TP nos tempos de centrifugação de dez, cinco, dois e um minuto com relação ao tempo de centrifugação de referência de 15 minutos.[5] No entanto, para o teste TTP houve aumento dos resultados em dois minutos de centrifugação.[5] Com relação aos elementos residuais, Lippi et al. observaram a presença significativa de plaquetas em dez minutos ou menos, hemácias em cinco, dois e um minuto e leucócitos somente no tempo de centrifugação de um minuto.[5]

Outro estudo desenvolvido por Carroll et al. avaliou o TP e o TTP em plasmas ricos em plaquetas (PRPs) e plasmas pobres em plaquetas (PPPs) preparados a partir da mesma amostra de sangue. As medições desses parâmetros não foram estatisticamente ou clinicamente significativas em 100 comparações pareadas.[8] Além disso, esse estudo demostrou que, em PRPs, a contagem de plaquetas de pelo menos 199.000/mm^3 não alteraram os resultados de TP e TTP.[8] Por outro lado, Sultan et al. compararam os resultados obtidos a partir de plasma centrifugado durante cinco minutos a 3.000 g ou durante dez minutos a 2.000 g com o protocolo de referência e não encontraram diferenças nos resultados dos testes de coagulação TP e TTP.[7] Portanto, esse estudo concluiu que cinco minutos de centrifugação a 3.000 g é uma opção confiável e útil para reduzir o tempo de entrega dos resultados para esses testes.[7]

Daves et al. avaliaram cinquenta amostras divididas em duas alíquotas, avaliadas de acordo com as recomendações da CLSI, porém, para centrifugação da primeira alíquota, foi utilizado o freio ajustado para ligado, e para a segunda o freio foi desligado.[4] Observou-se que, quando o freio da centrífuga estava ligado, a frequência de amostras que excederam a contagem de plaquetas 10.000/mm^3 foi quase o dobro do que nos plasmas obtidos com o freio desligado.[4] Portanto, esses resultados demonstraram que a centrífuga deve ser utilizada com o freio ajustado para desligado, pois pode ocorrer uma ressuspensão parcial dos elementos residuais ao plasma, devido a grande força de desaceleração quando o freio está ligado.[4]

Com relação aos testes de coagulação, Daves et al. não encontraram diferença para os valores de TTP, porém os resultados de TP apresentaram um pequeno prolongamento usando o freio da centrífuga ajustado para ligado (0,2 segundos; p<0,001).[4] Portanto, centrifugações de amostras de exames de coagulação com o freio desligado gera resultados mais compatíveis com as recomendações atuais do CLSI.[4]

O presente estudo também avaliou os resultados de acordo com o ponto de vista clínico aceitável, por meio da interpretação dos gráficos de Bland Altman. Os resultados de TP e TTP excederam as especificações de qualidade para o viés desejável em todos os tempos de centrifugação.

O TP demonstrou viés de 2,2%, 2,4%, 2,8% e 5,6%, portanto com aumento de 0,2%, 0,4%, 0,8% e 3,6% nos tempos dez, cinco, dois e um minuto, respectivamente, excedendo as especificações permitidas de ± 2,0%, enquanto que o TTP apresentou viés de 2,8%, 4,2%, 5,2%, 8,2%, portanto com aumento de 0,5%, 1,9%, 2,9% e 5,9% nos tempos dez, cinco, dois e um minuto, respectivamente, excedendo as especificações permitidas de ± 2,3%.

No entanto, Lippi et al. apresentaram todos os resultados de TP dentro do viés desejável, 0,0%, -0,5%, -0,75% e -0,8% nos tempos dez, cinco, dois e um minuto, respectivamente.[5] Para o TTP, encontraram 0,0%, 0,4%, 1,6% e 2,4% nos tempos dez, cinco, dois e umminuto, respectivamente, sendo que apenas o tempo de um minuto excedeu as especificações permitidas de ± 2,3%, em 0,1%.[5] Entretanto, esse estudo não menciona se o freio da centrífuga estava ajustado para ligado ou desligado.[5] Portanto, essas discrepâncias entre estudos realizados com mesmo tempo e velocidade de centrifugação podem ser atribuídas aos diferentes tipos de centrífugas utilizadas, como, por exemplo, com diferentes programações de velocidades de desaceleração ao término da centrifugação.

CONCLUSÃO

Apesar de vários estudos na literatura demonstrarem a possibilidade de diminuir o tempo de centrifugação das amostras para realização dos testes de coagulação de rotina, o presente estudo demonstrou alteração dos valores médios e da interpretação clínica para os resultados dos testes TP e TTP nos diferentes tempos de centrifugação (dez, cinco, dois e um minuto) com relação ao protocolo padrão estabelecido pelo CLSI.

Deve-se ressaltar que a presente pesquisa e todos os estudos supracitados utilizaram centrífugas, coagulômetros e reagentes diferentes para realização dos testes de coagulação. Portanto, esses resultados demonstram a importância de cada laboratório clínico realizar a padronização dos tempos de centrifugação de acordo com seus recursos específicos de trabalho.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao LABCENTER Laboratório de Análises Clínicas Ltda por permitir a realização deste estudo.

Abstract

Objective: *To analyze the coagulation tests: prothrombin test (PT) and partial thromboplastin time (PTT) in different centrifugation times of the sample, in relation to the standard protocol of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).* ***Methods:*** *The selected samples were splitted up into five aliquots of 1 mL. Centrifugation of these aliquots was carried out at 15, 10, 5, 2 and 1 minute at 1500 g. The PT and PTT were analyzed in an automated apparatus. The plasmas were analyzed for presence of residual elements: erythrocytes, leukocytes and platelets.* ***Results:*** *The results showed a change in the values of PT at the 10, 5, 2 and 1 minute centrifugation times and the PTT at 5, 2 and 1 minutes, relative to the standard protocol. In the interpretation of Bland Altman, a significant bias of the acceptable clinical limit for TP and TTP at all centrifugation times was observed, relative to the standard protocol. Only in the 15 minute centrifugation time no residual cells were found in the analyzed samples.* ***Conclusion:*** *The present study demonstrated that the 15-minute centrifugation time is ideal for complete removal of residual blood cells and to ensure the reliability of the results of the PT and PTT coagulation.*

Keywords

Centrifugation; prothrombin time; partial thromboplastin time; blood coagulation tests

REFERÊNCIAS

1. Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. Semin Thromb Hemost. 2008 Oct;34(7): 670-82.
2. Silva PH, Alves HB, Comar SR, Henneberg R, Merlin JC, Stinghen ST. Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos. Porto Alegre: Artmed; 2016.
3. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. Int J Lab Hematol. 2009;31(4):462-7.
4. Daves M, Giacomuzzi K, Tagnin E, Jani E, Adcock Funk DM, Favaloro EJ, et al. Influence of centrifuge brake on residual platelet count and routine coagulation tests in citrated plasma. Blood Coagul Fibrinolysis. 2014;25(3):292-5.
5. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Manzato F, Guidi GC. Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis. 2007;18(5):525-8.
6. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, Marlar RA, Szamosi DI, Warunek DJ. Collection , Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays. Clinical Laboratory Standards Institute; CLSI document H21-A5; 2008.
7. Sultan A. Five-minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing. East Mediterr Heal J. 2010;16(2):233-6.
8. Carroll WE, Wollitzer AO, Harris L, Ling MC, Whitaker WL J. The significance of platelet counts in coagulation studies. J Med. 2001; 32(1-2):83-96.
9. Doumas BT, Eckfeldt JH. Errors in measurement of total bilirubin: a perennial problem. Clin Chem. 1996;42(6 Pt 1):845-8.
10. Mendelsohn EE, Solum NO, Brosstad F. Effects of platelets and platelet-derived material on the activated partial thromboplastin time (Cephotest®) coagulation test. Scand J Clin Lab Invest. 2005; 65(4): 321-32.

Correspondência

Danielle Cristyane Kalva Borato

Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Avenida General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas
84030-900 - Ponta Grossa - PR, Brasil
Telefone: 3220-3118, e-mail: dckalva@hotmail.com

A importância da análise sedimentoscópica diante dos achados físico-químicos normais no exame de urina

The importance of urinary sediment analysis accompanying normal physicochemical test findings

Bruna Pessoa Nóbrega[1]
Lorrany Junia Lopes de Lima[1]
Diogo Vilar da Fonseca[2]
Adirlene Pontes de Oliveira Tenório[3]
Pedro Pereira Tenório[4]
Matheus Rodrigues Lopes[5]

Resumo
Objetivo: A sedimentoscopia apresenta atividade manual acentuada, pouca uniformidade e maiores custos aos laboratórios. Em diversos países é utilizado o emprego seletivo da sedimentoscopia em amostras de rotina de urina com normalidade nas etapas físico-químicas, no Brasil não ocorre uma abordagem nesse modelo. Assim, é importante avaliar a aplicabilidade do emprego seletivo da sedimentoscopia tendo em vista o custo-benefício na análise da rotina de urina. **Métodos:** Foi realizado um estudo analítico descritivo através de resultados de exames de urina de indivíduos do município de Paulo Afonso - BA. Para análise estatística foi utilizado o teste de qui-quadrado e o valor de p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** A partir dos resultados referentes aos 2.607 exames de urina de rotina analisados, foi observado que 66% das mostras não apresentaram alterações físico-químicas. Destas amostras com análise físico-química sem alterações, 12,89% compreenderam alteração na análise sedimentoscópica e, dentre os elementos analisados, a presença de piócitos foi a anormalidade que apresentou maior incidência. O valor preditivo negativo referente aos elementos encontrados na sedimentoscopia de urina com análise físico-química sem alterações foi de 86%. **Conclusão:** Apesar do considerável valor preditivo negativo, o valor de alterações encontradas em urinas com análise físico-química normal é relevante e expõe a necessidade da realização dessa etapa no exame de rotina de urina. A utilização seletiva da sedimentoscopia deve ser adotada de maneira crítica, pois é necessária uma avaliação minuciosa dos riscos relacionados à saúde do paciente e à qualidade do exame.

Palavras-chave
Urinálise; urina; microscopia

INTRODUÇÃO

A urinálise é um teste laboratorial amplamente utilizado na prática clínica, constituindo um dos indicadores mais importantes de saúde e doença, [1] e tem como objetivo detectar enfermidades pré-renais ou sistêmicas, renais e, pós-renais ou do trato urinário.[2] Além disso, distúrbios hepáticos, *diabetes mellitus* e degradação muscular também são avaliadas por meio do exame de urina.[3]

O exame de urina é dividido em três etapas: análise física, análise química e a sedimentoscopia, sendo os dois primeiros de execução mais simples e o último é considerado moderadamente complexo.[4]

A análise física abrange a cor, o aspecto e a densidade específica. A análise da cor e do aspecto é percebida através da inspeção. A cor padrão normal da urina é amarela, podendo atingir variações de tonalidades de pálida a âmbar.

Diversas colorações podem ser vistas de acordo com alterações na urina, como: cor rósea, vermelha ou castanha, devido à presença de eritrócitos, hemoglobina ou mioglobina; cor acastanhada pela presença de bilirrubinas,

[1]*Discente do curso de medicina na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) - Paulo Afonso - BA, Brasil.*
[2]*Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, Docente da UNIVASF - Paulo Afonso - BA, Brasil.*
[3]*Residência Médica na área de Nefrologia na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - SP; Mestrado profissional em Saúde Rural pela UNIVASF ; Docente da UNIVASF - Paulo Afonso - BA, Brasil.*
[4]*Doutor em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Docente da UNIVASF - Paulo Afonso - BA, Brasil.*
[5]*Doutor em Ciências (Fisiopatologia Médica) pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP. Docente da UNIVASF - Paulo Afonso - BA, Brasil.*

Instituição: Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) - Paulo Afonso - BA, Brasil.

Suporte financeiro: este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Recebido em 08/11/2018
Artigo aprovado em 24/01/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900785

carotenos; marrom escuro com presença de porfirina, melanina e coloração de alimentos.[1,2]

Quanto ao aspecto, a urina pode ser classificada em límpida, ligeiramente turva ou turva, devido à precipitação de fosfatos amorfos (urina alcalina), precipitação de uratos amorfos (urina ácida) ou pela presença de bactérias, leucócitos ou eritrócitos. Podendo também ser classificada em urina leitosa (quilúria), que ocorre em situações de oclusão dos vasos linfáticos pélvicos.[1,2]

A densidade específica é quantificada mediante o uso do densímetro, refratômetro ou fita reativa e possui o objetivo de analisar a atividade dos rins em manter, de acordo com o critério adequado, o equilíbrio hídrico do organismo. Desse modo, a densidade específica contempla a relação entre a quantidade de volume de água eliminado e solutos.[1,2]

Na análise química geralmente obtém-se o pH, proteínas totais, glicose, bilirrubinas e urobilinogênio, corpos cetônicos, ação peroxidásica, esterase leucocitária e nitritos. Os estudos dessa etapa podem ser efetuados em tubos de ensaio, com a formação de reações químicas ou, por meio de tiras reagentes. A utilização de tiras reagentes objetiva um teste mais veloz, simples, com baixo custo e alta precisão.[1]

Já a sedimentoscopia possui a finalidade de identificar e, ocasionalmente, quantificar vários componentes figurados, como: leucócitos, hemácias, células epiteliais, bactérias, cilindros, cristais e fungos. Além disso, é um processo de grande demanda que necessita de atividade laboratorial manual acentuada, é pouco uniforme e acarreta um maior custo aos laboratórios porque é fundamental a presença de mão de obra qualificada para se alcançarem resultados confiáveis.[5,6]

A sedimentoscopia possui um alto valor preditivo negativo e a literatura ainda menciona redução significativa de custos, além de abatimento do tempo de trabalho. Dessa forma, em diversos países, a etapa sedimentoscópica é abolida quando as análises físicas e químicas não possuem anormalidades.[7-9]

Em diversos países é indicado o emprego seletivo da sedimentoscopia em exames de rotina de urina com achados físicos e químicos normais.[7] A Confederação Europeia de Medicina Laboratorial indica que o exame de urina deve ser requerido somente quando houver uma indicação clínica e a sua utilização metodológica em populações demarcadas precisa ser averiguada de acordo com o custo/benefício.[10,11]

No Brasil não ocorre uma abordagem nesse modelo, pois a maioria dos laboratórios clínicos realizam as três etapas preconizadas na rotina de urina. Assim, é importante avaliar a importância da análise sedimentoscópica diante dos achados físico-químicos normais no exame de urina.

MATERIAL E MÉTODOS

O artigo é um estudo transversal analítico descritivo, com pacientes de ambos os sexos, cadastrados na rede de atenção básica do município de Paulo Afonso - BA. O trabalho consistiu, inicialmente, na análise de prontuários com resultados de exames de urina em laboratório reconhecido na região que abrange a cidade de Paulo Afonso.

Foram analisados, retrospectivamente, os resultados de pacientes de ambos os sexos e faixa etária entre 4 meses e 98 anos. A avaliação compreendeu o exame físico-químico e a microscopia do sedimento urinário de todos os exames de urina realizados no laboratório entre os meses de fevereiro e agosto de 2018.

É importante relatar que a execução dos exames de rotina de urina seguiu a padronização vigente nas normas, todos submetidos ao exame físico, à leitura da tira reagente de dez áreas e à microscopia do sedimento.

A obtenção e a observação da microscopia obedeceram aos seguintes procedimentos, de acordo com a ABNT NBR 15268:[12] tubos plásticos de urinálise de 12 mL foram corretamente identificados. Cada amostra foi transferida ao tubo (10 mL de urina) e submetida à centrifugação de 1.500 RPM, durante cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado, restando 1 mL de sedimento, que foi ressuspenso por leves batidas ao fundo do tubo. Foram transferidos 20 μL da suspensão do sedimento para uma lâmina microscópica, colocando-se lamínula padrão sobre a amostra.

Inicialmente, o sedimento urinário foi analisado com objetiva de 10X. A lâmina foi percorrida, em sua totalidade, e a presença ou não de elementos como filamentos de muco, células epiteliais e cilindros foram observados. Posteriormente, com a objetiva de 40X, a média dos elementos presentes em dez campos analisados, como piócitos, hemácias, células, cilindros, cristais e flora bacteriana foram determinados e anotados.

Realizou-se a análise dos elementos cuja presença ou quantificação são consideradas referenciais, respeitando-se as recomendações sugeridas pela ABNT.[12]

Células epiteliais, cilindros, filamentos de muco e cristais observados no aumento de 100X, e classificadas em raras (até três elementos por campo), algumas (de quatro a dez por campo) e numerosas (acima de dez por campo).

Para leucócitos e hemácias, considerou-se como padrão de normalidade, a média de dez campos microscópios observados no aumento de 400X. Leucócitos: abaixo de cinco células por campo e hemácias: abaixo de três células por campo.

A flora bacteriana foi observada no aumento de 400X e classificada como: bacteriúria aumentada (acima de 99

por campo), bacteriúria moderamente aumentada (de 11 a 99 por campo), normal (0 a 10 por campo). Leveduras e *Trichomonas* sp. foram relatadas quando presentes.

Para os elementos cuja presença ou quantificação foi considerada alterada na sedimentoscopia foram adotados os seguintes valores referenciais mínimos:

- piócitos: ≥ a 5 por campo (400x);
- piócitos em grumos: qualquer achado por lâmina;
- hemácias: ≥ a 3 por campo (400x);
- cilindros de quaisquer tipos: qualquer número por lâmina;
- flora microbiana: considerada aumentada;
- cristais anormais: considerados numerosos;
- levedura ou pseudomicélios: qualquer achado por lâmina;
- *Trichomonas* sp. ou outros parasitos: qualquer achado por lâmina.

Para comparação entre as faixas etárias, os pacientes foram divididos em quatro grupos, conforme definição da Organização Mundial da Saúde (OMS):[13] crianças (0 a 9 anos), adolescentes (10 a 19 anos), adultos (20 a 59 anos) e idosos (60 ou mais anos de idade).

A análise estatística foi realizada através do programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc., San. Diego, CA, USA). Para análise foi utilizado o teste de qui-quadrado e o valor de P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

ÉTICA

O projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CAAE: 67710217.2.0000.5196; Parecer nº: 2.265.572), além disso, foi obtido o aceite e a colaboração da Secretaria de Saúde e de um laboratório clínico de referência do município de Paulo Afonso - BA.

RESULTADOS

A análise dos dados foi realizada em um total de 2.607 resultados de exames de urina de rotina. Foram avaliados os resultados de indivíduos de 0 a 98 anos, com idade média de 43,1 anos. A distribuição entre o sexo e as diversas faixas etárias está descrita na Tabela 01.

Na Figura 01 foram descritas as principais alterações nos exames de urina divididas por faixas etárias dos pacientes. Dentre os grupos analisados, o de idosos obteve proporcionalmente maiores alterações, principalmente quanto à flora bacteriana, esterase leucocitária, piócitos, glicose e hemoglobina (Figura 01).

A partir dos resultados referentes aos 2.607 exames de urina de rotina analisados, foi observado que 1.722 (66,05%) amostras não apresentaram alterações físico-químicas; destas, 222 (8,51%) compreenderam alteração na análise sedimentoscópica, enquanto que 1.500 (57,54%) expressaram sedimentoscopia sem alterações.

Por outro lado, 885 (33,95%) apresentaram análise com alterações físico-químicas; destas, 657 (25,20%) apresentaram alterações e 228 (8,75%) não apresentaram alterações na análise sedimentoscópica.

Considerando apenas as amostras com análise físico-química sem alterações (n=1.722), observamos que houve alteração em 222 (12,89%) das amostras.

Na análise dos sedimentos das urinas sem alterações físico-químicas foram encontradas 234 elementos, inclusive com algumas amostras apresentando mais de uma alteração.

A presença de piócitos (4,53%) foi a anormalidade que apresentou maior índice, dentre os elementos analisados. Não foi evidenciada diferença entre a alteração na sedimentoscopia frente aos achados normais da análise físico-química apenas para a presença de cristais (p=0,72).

A análise estatística evidenciou que o resultado foi estatisticamente significativo em todas as alterações evidenciadas (piócitos, bacteriúria, hematúria e leveduras) (p<0,01; Tabela 02).

Dos elementos analisados, a presença de piócitos foi a anormalidade que apresentou maior incidência, ainda assim, evidenciou um alto valor preditivo negativo de aproximadamente 95%; por outro lado, o valor preditivo negativo referente ao total de elementos encontrados na sedimentoscopia de urinas com análise físico-química sem alterações foi de 86%, conforme expresso na Tabela 02.

Tabela 01 - Distribuição da população, por faixa etária e sexo

Idade (anos)	Feminino		Masculino		Total	
	n	%	n	%	n	%
Crianças	115	8,19	208	17,29	323	12,39
Adolescentes	108	7,69	74	6,15	182	6,98
Adultos	832	59,26	598	49,71	1430	54,86
Idosos	349	24,86	323	26,85	672	25,77
Total	**1.404**	**53,85**	**1.203**	**46,15**	**2.607**	**100**

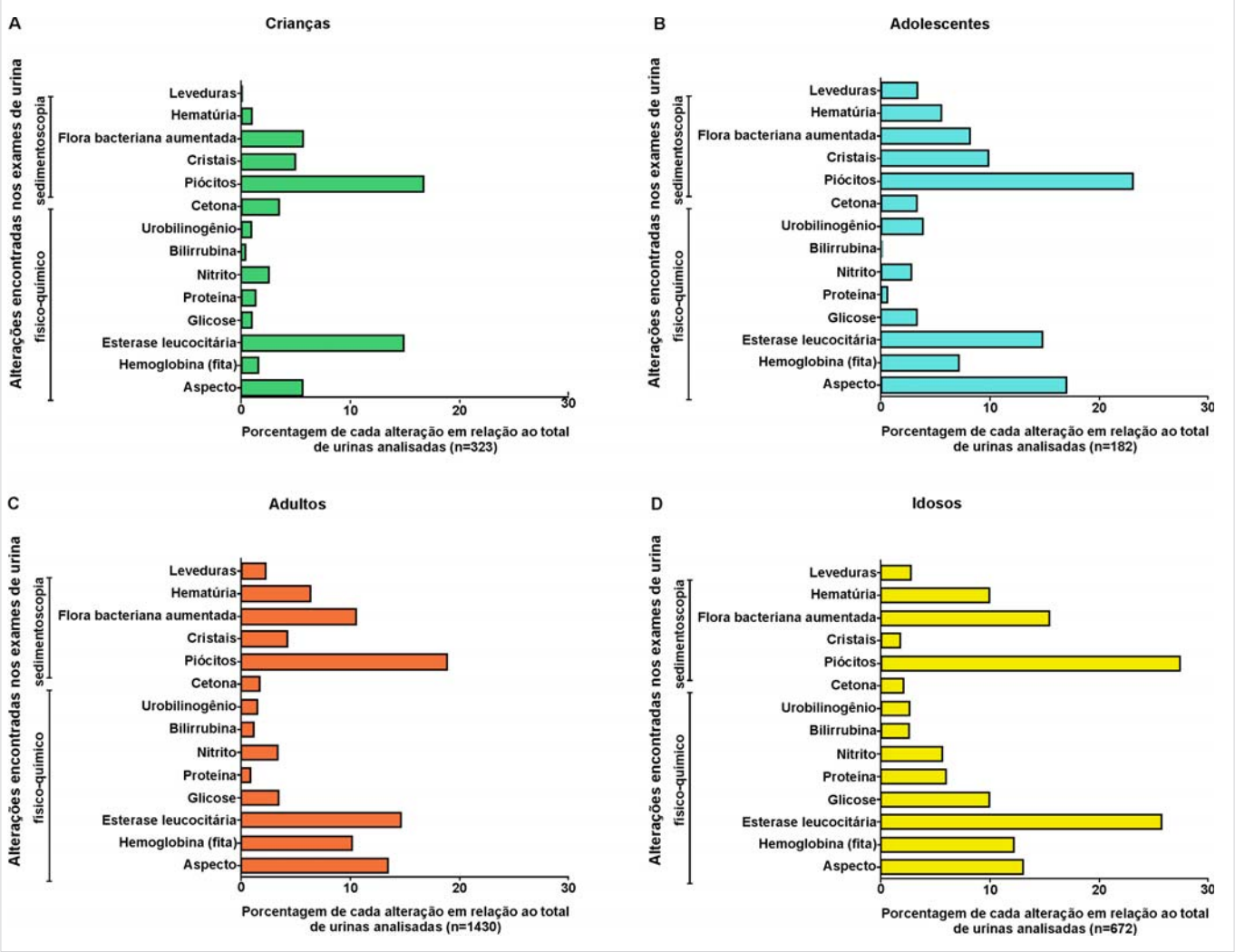


Figura 01 - Principais alterações no exame de urina, por faixa etária.
(A-D) O eixo "y" representa as alterações encontradas nos exames de urina de rotina analisados e o eixo "x" representa a porcentagem de cada alteração em relação ao total de urinas analisadas. O número de amostras analisadas em cada faixa etária está descrito na figura.

Tabela 02 - Elementos encontrados na análise sedimentoscópica de urinas sem alterações físico-químicas (n=1722).

Elementos	Número absoluto	%	Significância	Valor preditivo negativo (%)
Piócitos	78	4,53	p<0,01	95
Cristais	67	3,89	p=0,72	96
Flora bacteriana aumentada	52	3,02	p<0,01	97
Hematúria	20	1,16	p<0,01	99
Leveduras	17	0,99	p<0,01	99
Total	234	13,59	p<0,01	86

DISCUSSÃO

O exame de rotina de urina caracteriza-se por ser um exame de baixo custo, simples e não invasivo. Porém, a quantidade de exames realizados anualmente pode gerar um embate relacionado à saúde e à qualidade de vida da população, pois são comuns resultados falso-positivos que requerem uma investigação maior.[14]

As sociedades de urologia americanas e canadenses não indicam a realização do exame rotineiro de urina em pacientes com ausência de sinais e sintomas clínicos. Nesse contexto, o sumário de urina é recomendado apenas em grupos selecionados, como em crianças, diabéticos, grávidas e idosos.[15]

Para se estabelecer o diagnóstico de proteinúria, hematúria e infecção do trato urinário (ITU), o exame de urina é considerado relevante na pediatria,[15] visto que os recém-nascidos possuem uma alta prevalência de ITU.[16,17] Nessa idade, o quadro clínico da ITU costuma ser inespecífico, o que representa um grande obstáculo para o diagnóstico. O tratamento empírico deve ser estabelecido por

meio das alterações presentes no sumário de urina e pela sintomatologia.[17]

Apesar de apenas alguns microorganismos (bactérias Gram-negativas) serem capazes de reduzir nitrato a nitrito, a presença deste composto e da esterase leucocitária na urina pode indicar ITU. Assim, é recomendada a terapia empírica após coleta para urocultura em resultados com nitrito positivo no sumário de urina.[17,18]

A ITU está presente em cerca de 10% das crianças. Entre os lactentes e crianças menores, a contaminação bacteriana é a mais recorrente,[18] e sua prevalência nessa faixa etária pode chegar a cerca de dois terços no sexo feminino.[19] Em nossos resultados observamos a presença de flora bacteriana aumentada em cerca de 6%, piúria em aproximadamente 17% e esterase leucocitária em torno de 15% das amostras de crianças, o que corrobora os dados encontrados na literatura.

É válido evidenciar que a ITU sintomática é a primeira causa mais habitual de infecção em idosos e a segunda na população geral. Essa patologia é a causa mais frequente de mortalidade em pacientes desse grupo etário devido às infecções hospitalares. Além disso, a ITU relaciona-se à presença de sepse por Gram-negativos e bacteremia.[20] Observamos o aumento da flora bacteriana nas amostras da faixa etária acima de 60 anos em cerca de 15%, presença de piúria e esterase leucocitária em aproximadamente 27% e 25%, respectivamente.

Um dos parâmetros utilizados para indicar o ritmo da progressão da doença renal é a proteinúria, caracterizado como um marcador clássico de lesão glomerular.[21] A proteinúria é presente em casos de glomerulopatias e a permanência desse achado é associada ao mau prognóstico dessas doenças.[22] Entretanto a proteinúria pode não estar associada à lesão renal, como, por exemplo, na febre e exercício físico intenso. Dentre as proteinúrias benignas, a mais frequente é a transitória idiopática, comum em crianças, adolescentes e adultos jovens.[23] Em nossos resultados observamos a prevalência de proteinúria em cerca de 1% em crianças e adultos, com valores de cerca de 6% da população idosa.

A hematúria pode ser um achado decorrente desde esforços físicos intensos, até doenças graves, como as neoplasias do trato urinário.[24] Em crianças e adolescentes, a hematúria pode variar em 1,5% a 2%, e as etiologias são, principalmente, glomerulopatias, ITU, distúrbios metabólicos e anormalidade congênita.[25] Em adultos, a prevalência varia de 4% a 13% e a principal causa é de origem glomerular. Já em mulheres jovens, principalmente, ITU. Em idosos, a prevalência de hematúria chega a cerca de 10% da população e as principais causas são neoplasias, cistite, nefrolitíase, prostatite, uretrite, nefropatia por IgA, glomerulonefrites hereditárias, dentre outras.[26] Em nossos achados evidenciamos hematúria em cerca de 1% das crianças, em torno de 6% em adultos e, aproximadamente 10% em idosos, o que corrobora os dados encontrados na literatura.

Com o envelhecimento, é descrito o aumento da incidência de diversas patologias crônicas, como a *diabetes mellitus*. Deve-se pressupor seu diagnóstico em pacientes que apresentem hiperglicemia e/ou glicosúria em exame de rotina.[27] Em nossos resultados observamos a presença de glicosúria em cerca de 10% das amostras na faixa etária acima de 60 anos, enquanto que em amostras de pacientes com menos de 60 anos esse valor não atingiu a marca de 5% das amostras analisadas, o que corrobora os dados encontrados na literatura, evidenciando a relação entre a glicosúria e o aumento da idade.

Além das recomendações de indicação do exame de urina somente quando houver uma indicação clínica e em populações específicas, em diversos países é sugerido o emprego seletivo da sedimentoscopia em exames de rotina de urina com achados físicos e químicos normais.[28]

No Brasil, o exame de urina é requisitado rotineiramente e os laboratórios clínicos realizam as três etapas preconizadas.[7] Assim, a solicitação rotineira do exame de urina, mesmo sem suspeitas de patologias, é uma justificativa relevante para a elevada quantidade de normalidade dos sumários de urina.[5,7] Em nosso trabalho, foi observado que cerca de dois terços das amostras analisadas não apresentaram alterações no exame físico-químico.

Observamos que o resultado da análise físico-química foi um grande indicativo da presença ou não de alterações sedimentoscópicas, visto que, em praticamente todas as alterações evidenciadas (piócitos, bacteriúria, hematúria e leveduras), o resultado foi estatisticamente significativo, não tendo sido evidenciada diferença apenas para a presença de cristais.

Em contrapartida, percebeu-se que em torno de 8,5% das amostras denotaram características físico-químicas normais e alguma anormalidade sedimentoscópica. A partir da análise destes sedimentos urinários, a presença de piócitos foi a anormalidade que apresentou maior índice, achado este bem relevante, visto que o valor preditivo de piúria, conforme a literatura, varia entre 40% e 80% para ITU.[29]

Em nosso trabalho, o valor preditivo negativo de alterações sedimentoscópicas em urinas com análise físico-química normal foi de 86%, inferior a outros dados da literatura que o situa em até 98%,[7] e isso se deve possivelmente a variações na etapa pré-analítica.

A etapa pré-analítica, caracterizada pela coleta, manipulação, chegada e processamento da amostra, pode estar sujeita a erros, interferindo na fidedignidade de alguns resultados. Essa fase é sujeita a erros, pois depende

de mecanismos manuais e ocorre com frequência em ambientes externos ao laboratório; cerca de 45% a 70% dos erros de laboratórios ocorrem nessa etapa.[30] Um erro comum de se observar no exame de urina é a bacteriúria falso-positiva, que ocorre principalmente devido à orientação insatisfatória ao paciente acerca da coleta da urina, informando quanto à necessidade de assepsia adequada da região urogenital e a utilização do jato médio de urina.[30] Tal entrave não se limita apenas ao estudo em questão, mas é uma realidade nacional que precisa ser considerada. Assim sendo, o esclarecimento feito pelo médico ao paciente sobre o exame é essencial.

CONCLUSÃO

O exame de urina é um teste não invasivo, de ampla disponibilidade e pouco dispendioso, o que contribui para sua realização de forma rotineira e sem critério clínico, apesar do seu considerável valor preditivo negativo.

Diferentemente de outros países que adotam o emprego seletivo da sedimentoscopia, acreditamos que o valor de alterações encontradas nas amostras de urinas com análise físico-química normal é relevante e expõe a necessidade da realização dessa etapa no exame de rotina de urina em nosso país, assegurando assim uma maior qualidade e confiabilidade do resultado do exame.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Nildevande Firmino Lima, por sua inestimável assistência técnica e receptividade com os pesquisadores. Os autores gostariam de agradecer também o suporte dado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) para a realização desta pesquisa.

Abstract

Objective: *Sediment microscopy is a markedly manual activity, with poor uniformity and high labor costs. In several countries, the selective use of sediment microscopy for routine urine samples with normal physicochemical results is used, in Brazil, an approach in this model does not occur. It is therefore important to evaluate the applicability of a selective use of sediment microscopy in Brazil, taken from the view of cost-benefit analysis.* ***Methods:*** *A descriptive analytical study was carried out using results of urine exams from individuals in the city of Paulo Afonso/BA. The chi-square test was used for analysis and the value of p <0.05 was considered statistically significant.* ***Results:*** *From the results of the 2607 routine urine tests analyzed, 1722 samples presented no physicochemical alterations. Of these samples with physicochemical analysis without alterations, 12.89% presented alterations during sediment analysis and among the elements analyzed the presence of pyocytes was the abnormality that presented higher incidence. The negative predictive value for the urine elements found during sediment microscopy of the normal physicochemical analyses was 86%.* ***Conclusion:*** *Despite the considerable negative predictive value, the value of alterations found in urines with normal physicochemical analysis is relevant and exposes the need to perform this step in the routine urinalysis. Since a thorough evaluation of the risks linked to the patient's health and quality examination are necessary, a selective use of the sediment microscopy should be adopted, though in a critical manner.*

Keywords

Urinalysis; urine; microscopy

REFERÊNCIAS

1. Strasinger SK, Lorenzo M. Urinálise e fluidos corporais. 5ª ed. São Paulo: Editorial Premier; 2009.
2. Kirsztajn GM. Diagnóstico laboratorial em nefrologia. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 2009.
3. Khejonnit V, Pratumvinit B, Reesukumal K, Meepanya S, Pattanavin C, Wongkrajang P. Optimal criteria for microscopic review of urinalysis following use of automated urine analyzer. Clin Chim Acta. 2015;439:1-4.
4. Baños-Laredo ME, Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. Urinary sediment analysis. Reumatol Clin. 2010;6(5):268-72.
5. Heggendornn LH, de Almeida Silva N, da Cunha GA. Urinálise: a importância da sedimentoscopia em exames físico-químicos normais. REB. 2014;7(4):431-43.
6. Perazella MA. The urine sediment as a biomarker of kidney disease. Am J Kidney Dis. 2015;66(5):748-55.
7. da Costaval JA, de Pádua Massote A, Cerqueira CMM, da Costaval AP, Auler A, Martins GJ. Qual o valor da sedimentoscopia em urinas com características físico-químicas normais? J Bras Patol. 2001; 37(4):261-5.
8. Tighe P. Laboratory-based quality assurance programme for near-patient urine dipstick testing, 1990-1997: development, management and results. Br J Biomed Sci. 1999;56:6-15.
9. Guder WG, Boisson RC, Fogazzi G, Galimany R, Kouri T, Malakhov VN, Plebani M. External quality assessment of urine analysis in Europe: Results of a round table discussion during the Symposium 'From Uroscopy to Molecular Analysis', Seeon, Germany, September 18-20, 1999. Clin Chim Acta. 2000 Jul;297 (1-2): 275-84.
10. Aspevall O, Hallander H, Gant V, Kouri T. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. Clin Microbiol Infect. 2001 Apr; 7(4): 173-8.
11. Kouri T, Makkonen P. External quality assessment of urine particle identification: a Northern European experience. Clin Chem Lab Med. 2015 Nov; 53 (Suppl 2):1489-93.
12. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma Brasileira 15268. Laboratório Clínico - Requisitos e recomendações para exame de urina. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
13. World Health Organization (WHO). Definition of key terms. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/intro/keyterms/en/. Accessed on: 14/01/2016.
14. da Mota CL, Beça HP. Análise sumária de urina de rotina: porquê e para quê? Rev Port Med Geral e Fam. 2013; 29: 244-8.
15. Chen M, Eintracht S, MacNamara E. Successful protocol for eliminating excessive urine microscopies: Quality improvement and cost savings with physician support. Clin Biochem. 2017 Jan;50(1-2): 88-93.
16. Williams GJ, Macaskill P, Chan SF, Turner RM, Hodson E, Craig JC. Absolute and relative accuracy of rapid urine tests for urinary tract infection in children: a meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2010;10(4): 240-50.
17. Lo DS, Rodrigues L, Koch VHK, Gilio AE. Clinical and laboratory features of urinary tract infections in young infants. J Bras Nefrol. 2018 Jan/Mar;40(1): 66-72.
18. Marques AG, Pasternak J, dos Santos Damascena M, França CN, Martino MDV. Desempenho da fita de urina como resultado presuntivo para cultura de urina negativa. Einstein. 2017;15(1):34-9.

19. Lo DS, Shieh HH, Ragazzi SLB, Koch VHK, Martinez MB, Gilio AE. Infecção urinária comunitária: etiologia segundo idade e sexo. J Bras Nefrol. 2013;35(2):93-8.
20. Lopes H, Tavares W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. Rev Assoc Med Bras. 2004 Nov/Dec;51(6):306-8.
21. dos Santos AMR, da Silva Lemos CC, Bregman R. Revisão: Proteinúria - marcador clássico de comprometimento glomerular. J Bras Nefrol. 2001;23(4):217-20.
22. Kirsztajn GM. Proteinúria e progressão em glomerulonefrite membrano-proliferativa. J Bras Nefrol. 1998;20(3):304-5.
23. Badilla BC. Proteinuria. Rev Med Costa Rica y Centroamérica. 2012; 69 (603): 351-5.
24. Osman NI, Inman RD. Urological diagnosis, history and investigation. Surgery. 2013 Jul;31(7):337-45.
25. Utsch B, Klaus G. Urinalysis in children and adolescents. Dtsch Arztebl Int. 2014 Sep;111(37):617-26.
26. Abreu PF, Requião-Moura LR, Sesso R. Avaliação diagnóstica de hematúria. J Bras Nefrol. 2007 Sep;29(3):158-63.
27. da Silva AB, Engroff P, Sgnaolin V, Scheer Ely L, Gomes I. Prevalência de diabetes mellitus e adesão medicamentosa em idosos da Estratégia Saúde da Família de Porto Alegre/RS. Cad. Saúde Colet. 2016; 24(3):308-16.
28. Schumann GB, Greenberg NF. Usefulness of macroscopic urinalysis as a screening procedure: a preliminary report. Am J Clin Pathol. 1979 Apr;71(4): 452-6.
29. Silva JMP, Vasconcelos MMA, Dias CS, Vasconcelos MA, Mendonça ACQ, Froes B, Oliveira EA. Aspectos atuais no diagnóstico e abordagem da infecção do trato urinário. Rev Med Minas Gerais. 2014;24 (Suppl 2):20-30.
30. da Silva B. Adequabilidade de amostras de urina recebidas por um laboratório de análises clínicas do noroeste do estado do Rio Grande do Sul. RBAC 2016;48(4):352-5.

Correspondência
Bruna Pessoa Nóbrega
Rua da Aurora, S/N, Bairro Alves de Souza, 48607-190, Paulo Afonso, Bahia, Brasil
Telephone number: +55 19 98814-7708
e-mail: matheus.rlopes@univasf.edu.br
ORCID ID: 0000-0002-3719-4131

Análise comparativa da técnica de baciloscopia no diagnóstico da tuberculose pulmonar frente ao GeneXpert em amostras de pacientes da cidade de Recife, Pernambuco

Comparative analysis of the bacilloscopy technique in the diagnosis of pulmonary tuberculosis against GeneXpert in samples of patients in the city of Recife, Pernambuco

Natally dos Santos Silva[1]
Karoline Rissele Henrique de Almeida[2]
Carlos Alberto Medeiros Neto[3]
Ana Albertina de Araújo[4]
Sibele Ribeiro de Oliveira[5]

Resumo
Objetivo: Considerando que atualmente ainda existem algumas limitações quanto à escolha do teste ideal para diagnóstico da TB, ligadas principalmente aos custos e realização adequada das técnicas, o presente estudo teve por objetivo verificar a eficácia do teste de baciloscopia no diagnóstico da tuberculose pulmonar, a partir da comparação dos resultados obtidos através dos testes de baciloscopia e GeneXpert de pacientes da cidade de Recife-PE. **Métodos:** Foram analisadas neste estudo amostras de escarro com os resultados já positivos para TB através da cultura microbiológica. As espécimes foram submetidas ainda aos testes de baciloscopia e GeneXpert para uma análise comparativa dos resultados. **Resultados:** Foi analisado um total de 100 amostras, com positividade para todos os testes realizados no estudo (cultura microbiológica, GeneXpert e baciloscopia). **Conclusão:** O diagnóstico através do GeneXpert representa um ganho expressivo quando levado em conta sua sensibilidade, rapidez e confiabilidade dos resultados, em contrapartida, os custos para realização deste teste ainda são elevados. Este fato reforça a importância das metodologias convencionais de baciloscopia e cultura, quando utilizadas dentro dos parâmetros de controle de qualidade adequados.

Palavras-chave
Tuberculose; diagnóstico; crescimento bacteriano

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) caracteriza-se como uma doença infectocontagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK), de distribuição mundial, que apesar de contar com uma quimioterapia eficaz e prevenção amplamente conhecida e difundida, constitui-se como um importante problema de saúde pública.(1) O Brasil se encontra ocupando a 20ª posição quanto à carga da doença e tem destaque ainda por sua participação no BRICS (bloco formado por Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), cujos países somam cerca de 50,0% dos casos de tuberculose no mundo e mobilizam mais de 90,0% dos recursos necessários para as ações de controle da tuberculose por meio de fontes domésticas de financiamento. Neste contexto, a cidade de Recife, capital de Pernambuco, concentra quase metade do total de casos detectados no estado e configura-se como a capital com a terceira maior taxa de incidência e o segundo maior índice de mortalidade por TB no país.(2)

O tratamento adequado assim como o diagnóstico precoce são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da doença, os quais buscam curar os doentes e evitar a transmissão do agente etiológico.(3) O diagnóstico presuntivo da doença utiliza o histórico clínico do paciente e o achado radiológico, sendo a con-

[1]*Biomédica, Mestranda em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/Fiocruz-PE), Recife-PE, Brasil.*
[2]*Biomédica, Residente em Atenção Básica e Saúde da Família, Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), Caruaru-PE, Brasil.*
[3]*Acadêmico de Biomedicina, Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), Caruaru-PE, Brasil .*
[4]*Biomédica, responsável técnica do setor de Microbiologia do Laboratório de Saúde Pública da Prefeitura Municipal de Recife-PE.*
[5]*Biomédica, Doutora em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Docente do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), Caruaru-PE, Brasil.*

Instituição: Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico - Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita) - Caruaru-PE, Brasil.

Conflito de interesses: sem conflito de interesses

Recebido em 16/08/2018
Artigo aprovado em 25/03/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900767

firmação obtida através da comprovação bacteriológica por meio das técnicas de baciloscopia e cultura de escarro.[2,4,5]

A cultura de escarro é considerada padrão ouro para o diagnóstico da TB por apresentar alta sensibilidade e especificidade, porém não permite diferenciar a espécie de Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) detectada, nem distinguir os bacilos vivos dos mortos, além de apresentar resultados demorados, entre seis a oito semanas.[5,6] O diagnóstico realizado por meio da baciloscopia apresenta baixa sensibilidade, uma vez que necessita da presença de no mínimo 5 mil a 10 mil bacilos/mL de amostra para que o resultado seja positivo, sendo capaz de detectar o bacilo em 50% a 60% dos casos.[5,6] Apesar de tais restrições, no Brasil e na América Latina, a baciloscopia ainda é muito utilizada, não apenas para o diagnóstico como também para o controle do tratamento.

Diante das limitações dos testes convencionais para o diagnóstico da TB, novas tecnologias surgiram para a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* e da resistência à rifampicina. O teste GeneXpert MTB/RIF (Cepheid®, USA), recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2010, aprovado no Brasil e incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 2013, é uma técnica de diagnóstico por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real e PCR de transcriptase reversa, que não depende de um resultado inicial da cultura, detectando a presença de todos os bacilos do complexo *M. tuberculosis* e a resistência à rifampicina diretamente a partir da amostra, disponibilizando o resultado em até duas horas, apresentando ainda uma alta sensibilidade (95% a 99%) e especificidade (98%). Em contrapartida, essa técnica apresenta um alto custo em comparação às demais técnicas disponíveis e rotineiramente utilizadas.[7,8]

Considerando que atualmente ainda existem algumas limitações quanto à escolha do teste ideal para diagnóstico da TB, ligadas principalmente aos custos e realização adequada das técnicas, bem como infraestrutura ideal disponível, o presente estudo teve por objetivo verificar a eficácia do teste de baciloscopia no diagnóstico da tuberculose pulmonar, a partir da comparação dos resultados obtidos por meio dos testes de baciloscopia e GeneXpert de pacientes da cidade de Recife-PE.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo e transversal, com uma amostragem censitária, entre os meses de fevereiro e novembro de 2017, no Laboratório Municipal de Saúde Pública na cidade de Recife-PE, Brasil.

Foram analisadas neste estudo amostras de escarro positivas para TB pela cultura microbiológica em meio Löwenstein Jensen durante o período de estudo, sendo este um critério de inclusão. Tais amostras positivas foram colocadas em cartuchos descartáveis e submetidas ao sistema do teste molecular GeneXpert para realização da amplificação de ácidos nucleicos e detecção da sequência de DNA alvo, usando PCR em tempo real e PCR de transcriptase reversa. Através de um scanner de código de barras e *software* pré-carregado, os resultados foram interfaciados para um computador (Figuras 1 e 2), interpretados e liberados em forma de *Cicles Threshold* (CT) como "alto, médio, baixo e muito baixo", de acordo com o número de ciclos de PCR que foram necessários para a amplificação da sequência, sendo inversamente proporcionais à quantidade de bacilos presentes na amostra (Tabela 1). O trabalho foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), sob parecer de número 1.796.671.

Após a obtenção dos resultados positivos obtidos através do GeneXpert, esfregaços para técnica de baciloscopia foram preparados e interpretados de acordo com o preco-

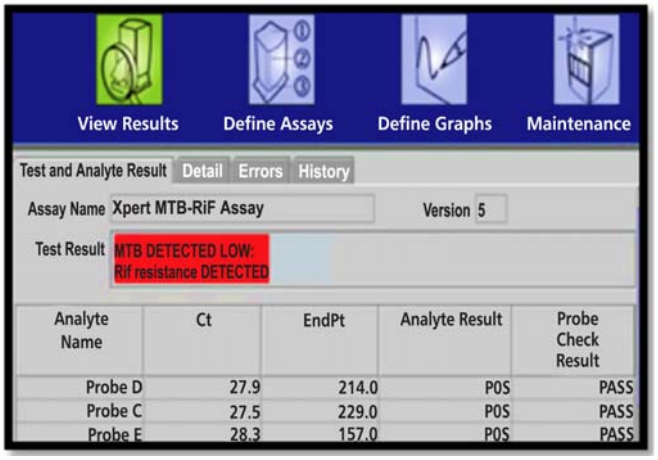


Figura 1. Resultado interfaceado e interpretado como "positivo baixo" com resistência à rifampicina.

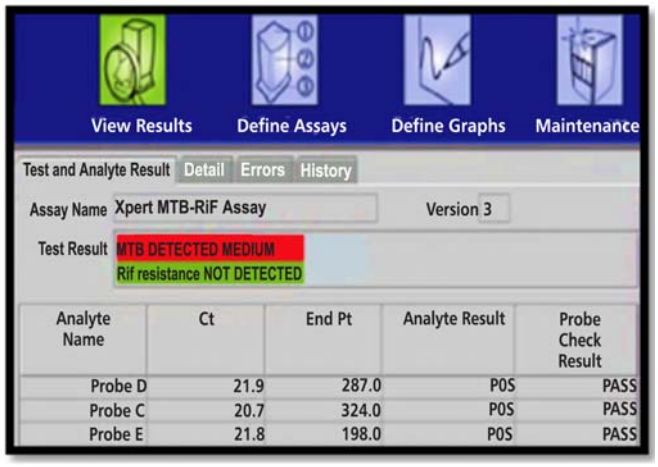


Figura 2. Resultado interfaceado e interpretado como "positivo médio" sensível à rifampicina.

nizado pelo Ministério da Saúde e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen. Em seguida, foi realizada análise ao microscópio de campo claro para a quantificação de BAAR, seguindo o sistema de contagem de cruzes (Tabela 2).Em seguida, os dados resultantes dos dois métodos foram confrontados para realização de uma análise comparativa das técnicas empregadas no estudo.

Tabela 1 -Intervalos de valores de CT para os resultados de MTB exibidos no GeneXpert.

Interpretação	Limite de Ciclo Alcançado (CT Range*)
Alto	<16 ciclos
Médio	16 - 22 ciclos
Baixo	22 - 28 ciclos
Muito Baixo	>20 ciclos

Fonte -Adaptação de LOW HIGH (2014).
*CT Range:Cicles Threshold Range/Faixa de Limiar de Ciclos.

Tabela 2 - Interpretação dos resultados da baciloscopia de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde.

Leitura	Resultado
Nenhum BAAR observado em 100 campos	Negativo
Nenhum BAAR observado em 100 campos	Nº DE BAAR observado
10 - 99 BAAR observados em 100 campos	Positivo 1 cruz (+)
1 - 10 BAAR observados por campo, nos primeiros 50 campos	Positivo 2 cruzes (++)
>10 BAAR observados por campo, nos primeiros 20 campos	Positivo 3 cruzes (+++)

Fonte -Adaptação de Ministério da Saúde (2008).

RESULTADOS

Foram analisadas um total de cem amostras, quantidade esta, no período de estudo, que mostraram-se positivas para TB pela cultura de escarro. Estas mesmas espécimes apresentaram positividade também pelas demais técnicas de estudo neste trabalho, baciloscopia e GeneXpert. Na Tabela 3, de acordo com a interpretação dos resultados liberados pelo GeneXpert, 34 (34%) das amostras foram classificadas como "Positivo Alto", 42 (42%) como "Positivo Médio", 21 (21%) como "Positivo Baixo" e três (3%) como "Positivo Muito Baixo" (3%). Em relação à baciloscopia, 81 (81%) das amostras foram classificadas como positivas, com três cruzes (+++), nove (9%) com duas cruzes (++) e dez (10%) com uma cruz (+) (Tabela 3).

De acordo com a Tabela 4, a análise comparativa dos resultados das amostras pelas técnicas de GeneXpert e baciloscopia resultou em uma concordância de 34% entre os resultados classificados como “positivo alto" no GeneXpert e positivo três cruzes (+++) na baciloscopia. Os resultados que se apresentaram como positivo médio no GeneXpert tiveram um percentual de 5% como positivo uma cruz (+), 9% como positivo duas cruzes (++) e 28% como positivo três cruzes (+++) na baciloscopia, estando dentro do limite de detecção da classificação "Média" do GeneXpert, que abrange os limites de detecção dentro dos parâmetros do número de CT Range, como apresentado na Tabela 1. Já 24% dos resultados classificados como positivo baixo e muito baixo no GeneXpert apresentaram-se como positivo uma cruz (+) e positivo duas cruzes (++) na baciloscopia (Tabela 4).

Tabela 3 -Total de amostras analisadas através dos GeneXpert e baciloscopia.

Resultado do GeneXpert		ultados da baciloscopia	
Positivo alto	34 (34%)	Positivo 3 cruzes (+++)	81 (81%)
Positivo médio	42 (42%)	Positivo 2 cruzes (++)	09 (09%)
Positivo baixo	21 (21%)	Positivo 1 cruz (+)	10 (10%)
Positivo muito baixo	3 (3%)		

Tabela 4 - Comparativo dos resultados positivos apresentados no GeneXpert e baciloscopia

Genexpert	Baciloscopia	Percentual de concordância
Alto	3 cruzes	34%
Médio	1 cruz	5%
Médio	2 cruzes	9%
Médio	3 cruzes	28%
Baixo e muito baixo	1 e 2 cruzes	24%

DISCUSSÃO

A fim de diminuir os casos de tuberculose (TB) em todo o mundo, é fundamental a ocorrência de pesquisas continuadas que possam aperfeiçoar as ferramentas de diagnóstico existentes e possibilitar a introdução de instrumentos inovadores para o diagnóstico da TB. Dentre as principais estratégias de combate a doença, podemos citar a detecção precoce e tratamento adequados, associados a estratégias de prevenção de novos casos.[9]

Diante das limitações apresentadas pelos testes disponíveis para o diagnóstico da TB no que se refere à baciloscopia e cultura microbiológica, os métodos moleculares têm ganhado cada vez mais espaço por possuírem características como rapidez, sensibilidade e especificidade significativas.[10] Em contrapartida, os custos para realização de tais metodologias ainda são questionados, reforçando a importância dos testes convencionais.[11] Neste estudo, foi evidenciado que. além das limitações relacionadas ao alto custo para a utilização de métodos moleculares, o GeneXpert apresenta limitações acerca dos parâmetros de referência

dentro do número de ciclos realizados para detecção dos bacilos, podendo apresentar problemas quando o teste é utilizado no acompanhamento da evolução do tratamento do indivíduo com tuberculose, uma vez que a informação da quantidade de bacilos presentes em uma amostra fornecida no sistema de cruzes pela baciloscopia é de suma importância para a avaliação do quadro evolutivo do paciente. Estas limitações apontam as metodologias tradicionais utilizadas de baciloscopia e cultura microbiológica como métodos importantes ainda na atualidade.

Neste estudo, 100% das amostras que se mostraram positivas no teste GeneXpert apresentaram também positividade na baciloscopia, corroborando assim com Opota et al.,[12] em cujo estudo 94,2% das amostras identificadas como positivas para o *M. tuberculosis*, apresentaram positividade nos dois métodos utilizados. Além disto, a técnica da baciloscopia também alcançou no presente estudo uma positividade de 100% em amostras já confirmados pela cultura de escarro, corroborando também o estudo de Opota et al. no qual 100% das amostras confirmadas na cultura e no GeneXpert apresentaram positividade também na baciloscopia, apesar desta técnica ser considerada de menor sensibilidade em relação às demais.[10,11,13-15]

Ainda como mencionado por Opota et al., houve comparação da sensibilidade, especificidade e valor preditivo do GeneXpert em relação à baciloscopia a partir da correlação entre os resultados das duas técnicas, constatando que os resultados positivos semiquantitativos "alto, médio, baixo e muito baixo" do GeneXpert concordavam com os resultados positivos da baciloscopia, assim como o perfil de concordância observado neste estudo, que analisou os resultados semiquantitativos do GeneXpert e os resultados pelo sistema de cruzes da baciloscopia, demonstrando que esta técnica ainda pode ser considerada efetiva, desde que sua realização siga todos os critérios relacionados ao controle de qualidade, associada à capacitação contínua dos profissionais que realizam as leituras e aos fatores relacionados à pré-análise como orientação de coleta de material adequado, transporte e armazenamento das amostras. Desta maneira, a baciloscopia ainda deve ser vista como um dos métodos mais confiáveis, viáveis e de baixo custo para diagnóstico laboratorial de TB.

CONCLUSÕES

Atualmente ainda existem algumas limitações quanto ao diagnóstico da TB, ligadas principalmente a custos e realização adequada dos exames laboratoriais. A semelhança dos resultados emitidos pelos testes analisados neste estudo defende que a baciloscopia, mesmo quando confrontada a um teste molecular, ainda está entre os métodos convencionais mais confiáveis e de fácil acesso para diagnóstico laboratorial da TB, entretanto, é importante destacar a necessidade dos profissionais que a façam passarem por constante atualização e educação permanente. O diagnóstico por meio do GeneXpert representa um ganho expressivo quando levado em conta sua sensibilidade, rapidez e confiabilidade dos resultados; em contrapartida, os custos para realização deste teste ainda são elevados. Este fato reforça a importância das metodologias convencionais de baciloscopia e cultura quando utilizadas dentro dos parâmetros de controle de qualidade adequados.

Abstract

Objective: *Considering that currently there are still some limitations regarding the choice of the ideal test for diagnosis of TB, related mainly to costs and adequate performance of the techniques, the present study aimed to verify the efficacy of the bacilloscopy test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis, based on the comparison of the results obtained through the bacilloscopy and GeneXpert tests of patients from the city of Recife-PE.* ***Methods:*** *Sputum samples with already positive results for TB were analyzed in this study through the microbiological culture. The specimens were also submitted to bacilloscopy and GeneXpert tests for a comparative analysis of the results.* ***Results:*** *A total of 100 samples were analyzed, with positivity for all tests performed in the study (microbiological culture, GeneXpert and smear microscopy).* ***Conclusion:*** *The diagnosis through GeneXpert represents an expressive gain when taking into account its sensitivity, speed and reliability of results, in contrast, the costs to perform this test are still high. This fact reinforces the importance of conventional bacilloscopy and culture methodologies when used within the appropriate quality control parameters.*

Keywords

Tuberculosis; diagnosis; bacterial growth

REFERÊNCIAS

1. Silva PF, Moura GS, Caldas AJM. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar no Maranhão, Brasil, no período de 2001 a 2010. Cad Saude Pub. 2014;30(8):1745-54.
2. Silva CCAV, Andrade MS, Cardoso MD. Fatores associados ao abandono do tratamento de tuberculose em indivíduos acompanhados em unidades de saúde de referência na cidade do Recife, Estado de Pernambuco, Brasil, entre 2005 e 2010. Epidemiol e Serv Saúde. 2013;22(1):77-85.
3. Freire DN, Bonametti AM, Matsuo T. Diagnóstico precoce e progressão da tuberculose em contatos. Epidemiol e Serv Saúde. 2007; 16(3):155-63.
4. Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H, Alves MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. Rev Bras Epidemiol. 2005;8(2):142-9.
5. Miranda GK. Avaliação de duas técnicas de reação em cadeia da polimerase na detecção do Mycobacterium tuberculosis em diferentes amostras biológicas [dissertação]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/ CPqAM; 2015.
6. Salazar MP. Avalição da Nested PCR em único tubo como ferramenta diagnóstica da tuberculose [monografia]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE; 2012.
7. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane database Syst Rev. 2014; (1).
8. Acosta CD, Rusovich V, Harries AD, Ahmedov S, van den Boom M, Dara M. A new roadmap for childhood tuberculosis. Lancet Glob Health. 2014 Jan;2(1):e15-7

9. Barreira D. Os desafios para a eliminação da tuberculose no Brasil. Epidemiol e Serv Saúde. 2018;27(1):1-4.
10. Ferri AO, Aguiar B, Wilhelm CM, Schmidt D, Fussieger F, Picoli SU. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. Rev Lib. 2014;15(24):105-212.
11. Talbot EA, Raffa BJ. Mycobacterium tuberculosis. Mol Med Microbiol. 2010;3(80):1635-54.
12. Opota O, Senn L, Prod'hom G, Mazza-Stalder J, Tissot F, Greub G, et al. Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. Clin Microbiol Infect. 2016; 22(7):613-9.
13. Huf G, Kritski A. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. J Bras Pneumol. 2012;38(2):237-45.
14. Scatena LM, Villa TCS, Ruffino-Netto A, Kritski AL, Figueiredo TMRM, Vendramini SHF, et al . Dificuldades de acesso a serviços de saúde para diagnóstico de tuberculose em municípios do Brasil. Rev. Saúde Pública [Internet]. 2009 June;43(3):389-397. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102009000300001&lng=en.
15. Nogueira AF, Facchinetti V, Vinícius M, De Souza N, Rocha T, Vasconcelos A. Tuberculosis: a general approach of the main aspects. Rev Bras Farm. 2012;93(1):3-9.
16. Cepheid. Xpert MTB / RIF Brochure. Gene. 2010: 1-4. Available from: www.cephieid.com.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília: 2008.

Correspondência
Natally dos Santos Silva
Av. Portugal, 584, Bairro Universitário
Caruaru - PE, Brasil

Avaliação do controle glicêmico por meio da A1c, glicemia média estimada e glicemia de jejum em pacientes diabéticos

Evaluation of glycemic control by A1c, estimated average glycemia and fasting glycemia in diabetic patients

Dhenner Hevilacio Fernandes de Freitas[1]
Monyelle Caetano Dias[1]
Sérgio Henrique Nascente Costa[2]
Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva[2]

Resumo
Objetivo: Analisar os níveis de glicemia e avaliar o controle glicêmico de pacientes diabéticos por meio da hemoglobina glicada, glicemia de jejum e glicemia média estimada (GME). **Métodos:** Foi realizado um levantamento de dados antropométricos e de exames laboratoriais de pacientes atendidos no Laboratório Clínico do Hospital do Policial Militar de Goiás, no período de abril de 2017 a abril de 2018. **Resultados:** Um total de 570 pacientes foi avaliado, sendo 298 (52,3%) homens e 272 (47,7%) mulheres. Destes 570, 138 são do grupo controle e 432 do grupo casos (diabéticos); desses, 54,2% homens e 45,8% mulheres, com média de idade 60 (±10,4). No grupo casos, 36,3% (157/432) apresentaram glicemia ≤ 130 mg/dL e 63,7% (275/432) > 130 mg/dL. Ainda nesse grupo, 30,8% (133/432) apresentaram A1c ≤ 7,0% e 69,2% (299/432) > 7,0%. Todos esses resultados avaliados apresentaram p<0,05, exceto em relação aos sexos. Entre os pacientes diabéticos, 22,2% (96/432) relataram uso de insulina e 79,6% (344/432) uso de hipoglicemiantes orais. **Conclusão:** Observou-se que a maioria dos diabéticos não fazia um controle adequado dos níveis glicêmicos, mesmo em pacientes com uso de hipoglicemiantes. Tendo em vista as complicações causadas pelo DM, é indispensável à dosagem da A1c para acompanhar o controle glicêmico e a possível prevenção de tais complicações.

Palavras-chave
Diabetes Mellitus; hemoglobina A glicada; glicemia

INTRODUÇÃO

O termo *Diabetes Mellitus* (DM) expressa uma desordem metabólica de inúmeras origens, caracterizado por hiperglicemia crônica derivada de distúrbios na secreção e/ou ação da insulina, ou em ambos, gerando complicações a longo prazo.(1) O DM vem sendo um grande problema de saúde pública, sendo a glicemia elevada o terceiro fator de causa de mortalidade prematura, superada apenas pela pressão arterial aumentada e uso de tabaco.

Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF) constatou que 8,8% da população mundial entre 20 e 79 anos (415 milhões de pessoas) apresentava diabetes. Se as tendências atuais continuarem, o número de diabéticos passará a ser superior a 642 milhões em 2040. O Brasil ocupa a 4º posição no ranking mundial de pessoas com diabetes, totalizando cerca de 14,3 milhões e estima-se que, em 2040, possa chegar a 23,3 milhões.(2) Tal aumento está relacionado com vários fatores, como aumento da urbanização, alteração na alimentação, aumento do sedentarismo e do sobrepeso, crescimento e envelhecimento populacional e, também, à maior sobrevida dos indivíduos diabéticos.(3)

O DM divide-se em Diabetes Tipo 1, Tipo 2, gestacional e outros tipos específicos. Em grande parte dos casos, o DM tipo 1 (DM1) é uma enfermidade autoimune (1a) ou idiopática (1b) caracterizada pela destruição de células beta sintetizadoras de insulina, responsável por 5% a 10% de todos os casos de DM. O DM1 é bem mais comum na infância e na adolescência, mas pode ser encontrada em adultos, que podem desenvolver uma forma lentamente progressiva da doença.(2)

Por outro lado, o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) representa 90% a 95% de todos os casos de DM.(2,4) O DM2 é uma doença metabólica caracterizada por resistência à insulina e disfunção das células β,(5) relacionada à inflamação gerada pela supernutrição e outros fatores como história familiar da doença, avançar da idade, obesidade, seden-

[1]*Acadêmico(a). Pontifícia Universidade Católica de Goiás - Goiânia-GO, Brasil.*
[2]*Doutor. Pontifícia Universidade Católica de Goiás - Goiânia-GO, Brasil.*

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Goiás - Goiânia-GO, Brasil.

Recebido em 27/11/2018
Artigo aprovado em 03/04/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900798

tarismo, diagnóstico prévio de pré-diabetes ou *diabetes mellitus* gestacional (DMG) e presença de componentes da síndrome metabólica, tais como hipertensão arterial e dislipidemia.[6]

Segundo a diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), os exames laboratoriais para o diagnóstico de DM são: glicemia de jejum, glicemia duas horas após teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e hemoglobina glicada (A1c). O individuo é considerado diabético se apresentar os seguintes resultados: Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, Glicemia de duas horas após TOTG com 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL, hemoglobina glicada ≥ 6,5%. A SBD tem recomendado a utilização da A1c para o diagnóstico de diabetes desde 2010.[2]

A hemoglobina glicada também conhecida como HbA1c e, mais recentemente, apenas como A1c, é o produto da glicação não enzimática da hemoglobina A circulante. A porcentagem de hemoglobina é estabelecida pelo fato de a glicose sanguínea entrar nos eritrócitos e ligar-se de forma irreversível à hemoglobina durante o período de vida média de tais células, que é cerca de 120 dias. Portanto, a A1c permite ponderar quão elevada a glicemia permaneceu nos últimos três a quatro meses. Essa particularidade faz dela um modelo vantajoso para diagnosticar a situação metabólica dos pacientes. Esse método não necessita do jejum e pode ser dosado em qualquer hora do dia. Com isso, a A1c é considerada um padrão-ouro na avaliação do controle glicêmico.[2]

Propõe-se então que a A1c seja feita a cada três a quatro meses em crianças e adolescentes em, no mínimo, duas vezes anuais. Para adultos, com a glicemia estabilizada, recomenda-se duas dosagens de A1c ao ano.[7] Nathan MD et al. determinaram uma forma de estabelecer a relação entre a A1c e a glicemia média estimada (GME) utilizando um cálculo que possibilita um melhor entendimento para o paciente do que realmente a A1c está expressando, que é realizada, por meio da seguinte fórmula: GME = 28,7 x A1c - 46,7.[8]

Dessa forma, a quantificação da A1c é o método utilizado para avaliar o controle glicêmico, sendo seu equilíbrio considerado como um dos maiores objetivos no tratamento do DM.[9-11] Sabendo dos efeitos danosos que a hiperglicemia pode causar, o presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis glicêmicos de indivíduos diabéticos e não diabéticos, por meio da A1c, glicemia média estimada e glicemia de jejum.

MATERIAL E MÉTODOS

Um estudo caso-controle, retrospectivo e transversal foi realizado, com base em um levantamento de dados realizado a partir de indivíduos atendidos no Hospital do Policial Militar do Estado de Goiás (HPM-GO), localizado na cidade de Goiânia, no período de abril de 2017 a abril de 2018.

Um total de resultados de 570 indivíduos de ambos os sexos foi obtido nesse período, nos quais foram incluídos apenas dados em que constavam exames de glicemia de jejum e A1c em seu pedido médico, além de dados antropométricos e sexo. Foram considerados como portadores de DM (casos) aqueles que apresentaram glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, e A1c ≥ 6,5%, além da informação sobre uso de hipoglicemiantes orais e/ou insulina. Para o grupo de indivíduos não diabéticos (controle), consideraram-se aqueles que apresentavam glicemia de jejum < 100 mg/dL, e A1c < 5,7%, e sem relato do uso de hipoglicemiantes e/ou insulina.

O levantamento de dados foi obtido por meio do *software* Multilab®. As amostras coletadas após jejum foram dosadas pelo método enzimático, por meio do equipamento A-15 (marca Biosystems). A A1c foi quantificada a partir do método de turbidimetria, padronizado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), em um laboratório terceirizado. A glicemia média estimada foi calculada por meio da fórmula GME = 28,7 x A1c - 46,7.[8] Os resultados foram tabulados por meio do *software* Excel 365 e analisados no *software* BioEstat 5.3.

A análise antropométrica foi feita a partir de informações sobre peso (kg) e altura (m) fornecidas pelo próprio paciente ou obtidos na hora da coleta utilizando-se fita métrica e balança própria do HPM-GO. A partir desses dados, foi utilizada a fórmula (IMC = peso/altura²) para calcular o IMC de cada indivíduo.

O presente estudo faz parte de um projeto que foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás sob o nº 235.376/2013.

RESULTADOS

Foram coletados dados de 570 indivíduos do Hospital do Policial Militar de Goiás, sendo que 52,3% (298/570) eram homens e 47,7% (272/570) mulheres, tendo p>0,05. Destes, 432/570 foram considerados diabéticos (casos) e 138/570 não diabéticos (controle). Em relação ao grupo caso, 54,2% (234/432) eram do sexo masculino e 45,8% (198/432) do sexo feminino (p>0,05).

Os indivíduos casos foram caracterizados quanto à idade ≤ 60 anos (216/432) e > 60 anos (216/432). Assim, a idade média do grupo caso foi 60,8 ± 10,4 anos e do grupo controle foi 51,6 ± 8,7 anos (p<0,05).

Quanto à glicemia de jejum, 36,3% (157/432) dos indivíduos do grupo caso apresentaram glicemia ≤ 130 mg/dL e 63,7% (275/432) uma glicemia > 130 mg/dL, sendo que a glicemia de jejum média do grupo caso foi 164,8 ± 64,7 mg/dL. Do grupo controle 100,0% (138/570) apresentaram glicemia ≤ 130mg/dL, com média 90,7 ± 6,9 mg/dL (p<0,05).

Em relação a A1c, foi classificada em ≤ 7,0% e > 7,0%, equivalendo a 30,8% (133/432) dos indivíduos e 69,2% (299/

432) dos indivíduos do grupo casos, respectivamente. No grupo controle 100,0% (138/138) dos indivíduos apresentaram A1c ≤ 7,0%. Para a glicemia média estimada foi considerada ≤154 mg/dL e > 154 mg/dL. Por ter relação com a A1c, apresentaram valores similares.

Em relação ao uso ou não de medicamentos para o controle de diabetes, 22,2% (96/432) fazem uso de insulina e 79,6% (344/432) usavam algum tipo de hipoglicemiante oral. Os hipoglicemiantes orais relatados pelos pacientes foram: Glifage, Januvia, Metformina, Trayenta, Diamicrom, Glucovance, Onglyza, Betes, Forxiga, Galvus, Xigduo, Glibenclamida, Kombiglyze XR, Pioglitazona, Amaryl, Victoza, Azukon, Stanglit, Meritor, Nesina e Glimepirida.

A caracterização amostral, dados antropométricos e resultados de exames dos grupos caso e controle de indivíduos estão apresentados na Tabela 01.

Tabela 01 - Caracterização amostral, dados antropométricos e resultados de exames dos grupos caso e controle de indivíduos atendidos no Laboratório Clínico do HPM no período de abril de 2017 a abril de 2018

Variáveis	Casos (n=432)		Controle (n=138)		p-valor	Todos (n=570)	
	n	f(%)	n	f(%)		n	f(%)
Sexo							
Masculino	234	54,2	64	46,4		298	52,3
Feminino	198	45,8	74	53,6	0.111*	272	47,7
Idade (anos)							
≤ 60	216	50,0	120	87,0		336	58,9
> 60	216	50,0	18	13,0	<0.0001*	234	41,1
Idade (anos)							
Média (DP)	60,8	10,4	51,6	8,7		51,6	8,7
Mín - Máx	40	87	40	85	<0.0001ϑ	40	87
Glicemia (mg/dL)							
≤ 130	157	36,3	138	100,0		295	51,8
> 130	275	63,7	0	0,0	<0.0001*	275	48,2
Glicemia (mg/dL)							
Média (DP)	164,8	64,7	90,7	6,9		90,7	6,9
Mín - Máx	51	407	68	99	<0.0001ϑ	51	407
Hemoglobina Glicada (%)							
≤ 7,0	133	30,8	138	100,0		271	47,5
> 7,0	299	69,2	0	0,0	<0.0001*	299	52,5
Hemoglobina Glicada (%)							
Média (DP)	8,3	1,8	5,3	0,3		5,3	0,3
Mín - Máx	6,5	15,8	4,2	5,6	<0.0001ϑ	4,2	15,8
GME (mg/dL)							
≤ 154	133	30,8	138	100,0		271	47,5
> 154	299	69,2	0	0,0	<0.0001*	299	52,5
GME (mg/dL)							
Média (DP)	190,7	51,4	105,9	7,6		105,9	7,6
Mín - Máx	140	407	74	114	<0.0001ϑ	74	407
Insulina							
Sim	96	22,2	--	--		--	--
Não	336	77,8	--	--	--	--	--
Hipoglicemiantes orais							
Sim	344	79,6	--	--		--	--
Não	88	20,4	--	--	--	--	--
Peso (kg)							
Média (DP)	79,3	15,6	79,1	16,7		0,0	0,0
Mín - Máx	38	130	46	135	0.452ϑ	0,0	0,0
Altura (m)							
Média (DP)	1,66	0,09	1,66	0,09		0,0	0,0
Mín - Máx	1,43	1,92	1,47	1,87	0.432ϑ	0,00	0,00
IMC (kg/m^2)							
Média (DP)	28,79	5,06	28,58	4,88		0,0	0,0
Mín - Máx	15,63	53,42	15,02	41,67	0.359ϑ	0,0	0,0
IMC (kg/m^2)							
Baixo Peso Normal (<18,5)	6	1,4	1	0,7		7	1,2
Peso Normal (18,5 a 24,9)	72	16,7	18	13,0		90	15,8
Sobrepeso (25,0 a 29,9)	136	31,5	39	28,3		175	30,7
Obesidade (≥ 30,0)	130	30,1	33	23,9	0.921φ	163	28,6
NC	88	20,4	47	34,1		135	23,7

DP: Desvio padrão; GME: Glicemia média estimada; IMC: índice de massa corporal; NC: não consta; *Qui-quadrado; ϑMann-Whitney; φ Teste G.

DISCUSSÃO

O DM é considerado uma das causas principais de mortalidade, além de várias complicações, como insuficiência renal, amputação de membros inferiores, cegueira e doença cardiovascular.[12] De acordo com Villela et al., muito embora tenha havido progressos na terapêutica do diabetes, essas desordens continuam sendo consideradas mundialmente um importante causador de taxas de morbidade e mortalidade, e leva a uma perda gradativa na qualidade de vida.[13]

O DM é um distúrbio progressivo que requer verificação contínua do controle glicêmico, com o intuito de regular a orientação no tratamento para proporcionar melhor equilíbrio dos parâmetros glicêmicos, adequadas às necessidades de cada paciente.[14]

A prevalência de indivíduos com diabetes foi predominante em homens com 54,2%, apesar de não apresentar diferença significativa em relação às mulheres (p>0,05). Isso pode ser justificado pelo fato de o Hospital do Policial Militar receber mais pacientes do sexo masculino, os quais representam a maior parte do efetivo. Dessa forma, esse dado contradiz a pesquisa realizada por Rossaneis MA et al., na qual foi observado que 67,6% dos participantes da pesquisa eram do sexo feminino, relacionando isso ao fato de que as mulheres possuem um maior zelo com a própria saúde, ou, ainda, um maior acesso à assistência médica, fato que torna possível o diagnóstico mais precoce que os homens.[15,16]

A pesquisa de Rossaneis MA et al. corrobora com estudo realizado por Kogani M et al., no qual se verificou que a maioria dos homens, mesmo apresentando doença crônica, não procurava por serviço de saúde, e os principais pretextos eram tempo escasso devido à carga de trabalho, diferença entre seu horário e o atendimento dos serviços de saúde, inexistência de manifestações graves e por encontrarem maiores obstáculos para atendimento do que as mulheres.[17] Contudo, estudos mostram que quem realiza mais atividades físicas regulares são os homens. Este dado está relacionado com outros estudos que indicavam serem as mulheres com DM mais sedentárias do que os homens.[18,19]

Com relação à faixa etária dos indivíduos, a idade média foi de 60 anos tendo quantidades iguais de pessoas com idades ≤ 60 e > que 60 anos. Resultado que contradiz a pesquisa de Medeiros LSS et al., cujo estudo observou uma maior predominância do DM2 em pessoas com idade acima dos 60 anos. Isso pode ser justificado pelo fato de que, ao envelhecer, há elevação e redistribuição do tecido adiposo, resultando em uma intensificação gradativa dos níveis de gordura abdominal, o que leva o indivíduo a maiores problemas metabólicos, pois ocorre uma menor retirada de insulina pelo fígado, aumento na produção hepática de glicose e diminuição da captação de glicose pelos tecidos periféricos.[20,21]

A média da glicemia de jejum do grupo caso foi de 164,8 mg/dL; 63,7% apresentaram valor > 130 mg/dL. Comumente, as avaliações com base na medida da glicose, glicemia de jejum (GJ) e o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) têm sido os testes aconselhados para o diagnóstico do DM, sendo a GJ o teste de escolha.[3,22] Estes parâmetros separam consideravelmente um grupo com mortalidade antecipada aumentada e com maior ameaça para complicações microvasculares e cardiovasculares.[3]

Quanto à hemoglobina glicada, 69,2% apresentaram A1c > 7,0% com média de 8,3% entre os indivíduos. As dosagens de glicemia de jejum e de A1c são utilizadas no auxílio para o controle de DM, pois proporcionam informações diversas sobre os níveis de glicemia. Os valores de A1c refletem principalmente a glicemia média no período aproximado de 12 semanas anterior à coleta, enquanto que a glicemia de jejum representa a glicemia do período próximo da coleta da amostra de sangue.[23] A glicemia média estimada juntamente com a A1c apresentaram resultados idênticos, uma vez que a GME é um cálculo utilizado para converter os valores da A1c em mg/dL.[8]

A *American Diabetes Association* (ADA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) também recomendou recentemente A1c (≥ 6.5%) para o diagnóstico de diabetes.[2,3] Além disso, a ADA caracterizou a A1c quanto à classificação de indivíduos em alto (A1c 5,7% - 5,9%) ou muito alto risco de diabetes (A1c de 6,0% a 6,4%), também referido como pré-diabetes.[2,24]

Os testes de A1c devem ser efetuados, no mínimo, duas vezes ao ano para todos os pacientes, entretanto, quando o individuo não obtém um controle adequado, aconselha-se fazê-los de três em três meses. A dosagem de A1c é recomendada tanto para os pacientes com diabetes tipo 1 como para os de tipo 2, sendo que o objetivo para se estabelecer o controle eficaz, nas duas situações, é inferior a 7%, tanto no adulto como no adulto jovem.[25]

Após a normalização da glicose no sangue, os níveis de A1c, ao contrário da glicemia de jejum, não voltam ao normal instantaneamente. O intervalo para que a A1c alcance os níveis satisfatórios após um caso de descontrole é cerca de dez semanas. Sendo assim, a repetição do exame de A1c para analisar a efetividade da terapêutica deve ser feita de dois a três meses após o início ou a mudança no tratamento. Antes desse período, os níveis de A1c, de fato, não indicarão informações úteis.[25]

O nível elevado de A1c está relacionado à progressão de problemas microvasculares (neuropatias, nefropatias, retinopatias) e macrovasculares (doenças coronarianas, doenças vasculares periféricas, acidente vascular encefálico) que diminuem a perspectiva de vida em sete a oito anos.[2] Além disso, estudos apontam que o aumento de 1%

na A1C foi relacionado a um aumento de 26% no risco de morte sem relação com a idade, pressão arterial, colesterol sérico, IMC e tabagismo.[26]

Alguns pacientes relataram o uso de medicação para o controle do diabetes, correspondendo a 22,2% em uso de insulina e 79,6% usando algum tipo de hipoglicemiantes orais. De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, a associação de diferentes fármacos com diferentes mecanismos de ação apresentou benefício confirmado na terapêutica e deve ser empregada no tratamento do Diabetes.[23] O tratamento do DM, a partir da insulinoterapia, pode ser instituído em fases prévias quando apenas mudanças no estilo de vida juntamente com os hipoglicemiantes orais forem incapazes de manter o controle glicêmico ideal.[2,27] Todavia, a insulinoterapia e o uso de hipoglicemiantes orais de forma isolada não demonstraram ser capazes de fazer um controle glicêmico adequado.

No presente estudo, através do IMC, no grupo caso foi observado que 31,5% (136/344) dos indivíduos apresentaram sobrepeso e 30,1% (130/344) obesidade. A elevação do IMC e dos lipídios aterogênicos no pré-diabetes e no diabetes tipo 2 faz com que haja um estresse metabólico que afeta a síntese de HDL, aumentando a disfunção das células pancreáticas e a resistência à insulina.[28] Essa diminuição dos níveis de HDL pode, consequentemente, prejudicar o controle glicêmico e adiantar o desenvolvimento para o diabetes tipo 2 em indivíduos pré-diabéticos. Com isso, os níveis aumentados de triglicérides evidenciam a capacidade de modificar a secreção de insulina ao longo das vias metabólicas dos ácidos graxos livres inflamatórios e interferir na função e a sobrevida das células beta pancreáticas.[29]

Mesmo sem ter relação com outras variáveis, a obesidade também evidencia vínculo com a alteração nos níveis glicêmicos. Um dos aspectos decisivos para a preservação da hiperglicemia é o excesso de peso, que ocorre a partir de vários processos, como o aumento dos ácidos graxos livres circulantes, a diminuição da adiponectina e secreção de citocinas pelo tecido adiposo, que, em último caso, intensifica a resistência à insulina.[2]

Além de utilizar medicamentos de maneira adequada, ter um bom controle do *diabetes mellitus* e a prevenção de seu surgimento, é preciso também mudanças no estilo de vida que abrange principalmente dieta e atividade física, além de outras causas mediadas pela autoestima, estresse, atitudes psicológicas e necessidade de cuidar de si próprio.[30]

CONCLUSÃO

Ao observar os níveis glicêmicos elevados dos pacientes diabéticos, o presente estudo revelou que, mesmo ao fazer uso de medicamentos hipoglicemiantes, os indivíduos não apresentaram um bom controle glicêmico. Deve-se lembrar que a permanência dos níveis glicêmicos entre 100 e 125 mg/dL e A1c ≤ 7,0 % é o ideal para pacientes diabéticos.

O estudo também mostrou que a prevalência maior de indivíduos diabéticos foi do sexo masculino, contrastando com diversos outros estudos que mostram que o maior acometimento de diabetes ocorre no sexo feminino,[15,16] sendo justificado, porém, pelo fato de o estudo ocorrer no Hospital do Policial Militar, onde a maioria do efetivo da corporação é do sexo masculino.

Além disso, os testes de glicemia de jejum, A1c e glicemia média estimada mostraram ser úteis no diagnóstico da *Diabetes Mellitus*. Mesmo havendo outros testes para a avaliação do controle da glicose, essa tríade se revelou imprescindível tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento dos níveis glicêmicos em pacientes diabéticos.

Abstract

Objective: *To analyze glycemic levels and to evaluate the glycemic control of diabetic patients through glycated hemoglobin, fasting glycemia and estimated mean glycemia (GME).* ***Methods:*** *A survey of anthropometric data and laboratory tests of patients attended at the Clinical Laboratory of the Military Police Hospital of Goias was carried out from April 2017 to April 2018.* ***Results:*** *A total of 570 patients were evaluated, of which 298 (52.3%) men and 272 (47.7%) women. Of these, 138 were from the control group and 432 were diabetic (cases), of these 54.2% were men and 45.8% were women, with a mean age of 60.8 (±10.4). In the case group, 36.3% (157/432) presented glycemia ≤ 130 mg/dL and 63.7% (275/432) >130 mg/dL. Still in this group, 30.8% (133/432) had A1c ≤ 7.0% and 69.2% (299/432) >7.0%. All of these results showed p <0.05, except for sexes. Among diabetic patients, 22.2% (96/432) reported insulin use and 79.6% (344/432) use of oral hypoglycemic agents.* ***Conclusion:*** *It was observed that most diabetics did not adequately control glycemic levels, even in patients with hypoglycemic agents. In view of the complications caused by DM, it is indispensable to dose A1c to monitor glycemic control and the possible prevention of such complications.*

Keywords

Diabetes Mellitus*; glycated hemoglobin A; blood glucose*

REFERÊNCIAS

1. Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. Rev Nutr. 2009;22(1):113-24.
2. American Diabetes Association. 2: Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care. 2017;40(Suppl 1):S11-24.
3. World Health Organization, editor. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
4. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. Diabetes. 2017;66(2):241-55.
5. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. Lancet. 2014 Mar 22;383(9922):1068-83.
6. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nat Rev Immunol. 2011;1(2):98-107

7. Schwandt A, Best F, Biester T, Grunerbel A, Kopp F, Krakow D, et al; Diabetes-Patienten-Verlaufsdokumentation (DPV) initiative. Both the frequency of A1c testing and the frequency of SMBG predict metabolic control: a multicenter analysis of 15 199 adult type 1 diabetes patients from Germany and Austria. Diabetes Metab Res Rev. 2017 Oct;33(7).
8. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ; A1c-Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. Diabetes Care. 2008;31(8):1473-8. Erratum in Diabetes Care. 2009 Jan;32 (1):207.
9. Camargo JL, Gross JL. Glycohemoglobin (GHb): clinical and analytical aspects. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(4):451-63. [Article in Portuguese].
10. Moreira TVOL, Ruivo GF, Rodrigues E, Vani GS. Prevalência de valores alternados de hemoglobina glicolisada e lipídeos em pacientes com Diabetes Mellitus: Importância do acompanhamento trimestral. Revista biociências, unitau. V. 14, n. 1, 2008.
11. Pimazoni Netto A, Andriolo A, Fadlo Filho F, Tambasci M, Gomes MB, Melo M, et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (A1c) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnostico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. J Bras Patol Med Lab. 2009;45(1):31-48.Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442009000100007 &lng=en.
12. Brasil. Diabetes Mellitus. Ministério da Saúde. Caderno de atenção básica N° 16. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
13. Aguiar LGK, Villela NR, Bouskela E. A microcirculação no diabetes: implicações nas complicações crônicas e tratamento da doença. Arq Bras Endocrinol Metab [Internet]. 2007 Mar; 51(2):204-211. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302007000200009&lng=en.
14. Fernandez NM, Cazelli C. Teixeira RJ. Gerenciamento do controle glicêmico do Diabetes Melittus tipo 2 na estratégia de saúde da família. Revista HUPE 2016, vol. 15, n.3: 218-226. Acesso em https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/issue/view/1531.
15. Rossaneis MA, Haddad Mdo C, Mathias TA, Marcon SS. Differences in foot self-care and lifestyle between men and women with diabetes mellitus. Rev. Latino-Am. Enfermagem 2016;24:e2761. [Article in English, Portuguese, Spanish].
16. Zavatini MA, Obreli-Neto PR, Cuman RKN. Estratégia saúde da família no tratamento de doenças crônico-degenerativas: avanços e desafios. Rev Gaúcha Enferm. Porto Alegre (RS). 2010 dez;31 (4):647-54.
17. Kogani M, Mansournia MA, Doosti-Irani A, Holakouie-Naieni K. Risk factors for amputation in patients with diabetic foot ulcer in southwest Iran: a matched casecontrol study. Epidemiol Health. 2015;37: e2015044.
18. Yu MK, Lyles CR, Bent-Shaw LA, Young BA. Sex disparities in diabetes process of care measures and self-care in high-risk patients. J Diabetes Res. 2013;2013:1-8.
19. Mansyur CL, Rustveld LO, Nash SG, Jibaja-Weiss ML. Social factors and barriers to self-care adherence in Hispanic men and women with diabetes. Patient Educ Couns. 2015;98(6):805-10.
20. Medeiros LSS, Morais AMB, Rolim LDMM, The importance of glycemic control on the prevention of chronic complications of diabetes mellitus. RBAC. 2016;48(3):262-7.
21. Santos PA, Pinho CPS. Diabetes mellitus em pacientes coronariopatas: prevalência e fatores de risco cardiovascular associado. Rev Bras Clin Med. São Paulo. 2012 nov-dez;10(6):469-75.
22. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. Diabetes Care 2003;26:3160-7.
23. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes: tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus, (1ªed.). Rio de Janeiro: Diagraphic. 2007.
24. Comitê Internacional de Especialistas. Relatório do Comitê Internacional de Especialistas sobre o papel do ensaio de A1C no diagnóstico de diabetes. Diabetes Care 2009;32:1327-34.
25. Sumita NM, Andriolo A. Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes mellitus. J Bras Patol Med Lab. vol.42 no.3 Rio de Janeiro June 2006. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442006000300002&lng=en
26. Khaw KT, Wareham N, S Bingham, Luben R, Welch A, Dia N. Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. Ann Intern Med. 2004;141(6):413-20.
27. Bansal N, Dhaliwal R, Weinstock RS. Management of Diabetes in the Elderly. Med Clin North Am. 2015;99(2):351-77.
28. von Eckardstein A, Sibler RA. Possíveis contribuições de lipoproteínas e colesterol para a patogênese do diabetes mellitus tipo 2. Curr Opin Lipidol. 2011; 22 (1): 26-32.
29. Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? Curr Diab Rep. 2014;14(6):492.
30. Wong CK, Wong WC, Lam CL, Wan YF, Wong WH, Chung KL, et al. Effects of Patient Empowerment Programme (PEP) on clinical outcomes and health service utilization in type 2 diabetes mellitus in primary care: an observational matched cohort study. PLoS One. 2014 May 1;9(5):e95328.

Correspondência
Dhenner Hevilacio Fernandes de Freitas
Av, Universitária 1.440, Setor Universitário
74605-010 - Goiânia-GO, Brasil

Validação do teste sorológico para toxoplasmose em papel filtro

Validation of serological test for toxoplasmosis in filter paper

Sarah Ribeiro de Oliveira[1]
Karen Ribeiro de Oliveira[1]
Murilo Barros Silveira[2]
Hânstter Hállison Alves Rezende[3]
Flávia Martins Nascente[4]
Ana Maria de Castro[5]
Juliana Boaventura Avelar[6]

Resumo
Objetivo: Validar o uso do teste sorológico para toxoplasmose em papel filtro em amostras de sangue de gestantes do município de Goiânia e região metropolitana. **Métodos:** Trata-se de um estudo prospectivo, onde foram coletadas 1.006 amostras de sangue em gestantes no município de Goiânia e região metropolitana. Todas as gestantes que concordaram participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A avaliação do perfil sorológico foi realizada pela técnica de ELISA (ensaio imunoenzimático), com amostras de soro e papel filtro, para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* das classes IgM e IgG, sendo que o kit utilizado não é padronizado para a pesquisa de anticorpos IgM no papel filtro. A análise estatística foi processada no banco de dados do programa EpiInfo® versão 3.2.1, que avaliou a prevalência de soropositividade, frequência de positividade no soro, frequência de positividade no papel filtro, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e índice *kappa*. **Resultados:** Na análise realizada no soro obtiveram-se 421 amostras positivas para anticorpos da classe IgG e três positivas para anticorpos da classe IgM. Em papel filtro obtiveram-se 443 positivas para anticorpos da classe IgG e uma positiva para anticorpos da classe IgM. **Conclusão:** O estudo permitiu identificar a semelhança de amostras positivas tanto com o uso do soro como no papel filtro para pesquisas de anticorpos da classe IgG, porém, para a pesquisa de anticorpos da classe IgM, o uso do soro apresentou maior sensibilidade quando comparado ao exame realizado com o papel filtro.

Palavras-chave
Diagnóstico; sorologia; gestantes; toxoplasmose

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, geralmente assintomática, causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. A infecção pode ser adquirida por meio da ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais, pela ingestão acidental de oocistos liberados pelas fezes dos felídeos, que podem estar presentes em água e/ou alimentos, ou, ainda, pela transmissão transplacentária por taquizoítos.(1)

Nesse caso, o parasito é capaz de atravessar a barreira transplacentária, atingir o concepto e ocasionar a infecção congênita, levando a perturbações neurológicas, oculares, auditivas e morte intraútero. A taxa de soroconversão materna está relacionada ao contato com uma fonte de infecção, ao número de mulheres susceptíveis, resposta imunológica materna e à prevalência em uma determinada comunidade. A necessidade de um diagnóstico precoce e definitivo se faz necessária porque auxilia na prevenção de casos mais graves.(2)

No curso da infecção ocorrem quase que simultaneamente, a produção de anticorpos da classe IgM e IgG, que permitem que os testes sorológicos se tornem de grande importância para o diagnóstico e estabelecimento da fase da doença. A distinção entre as fases aguda e crônica é de suma importância clínica, principalmente porque a infecção

[1]*Biomédica. Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás. Goiânia-GO, Brasil.*
[2]*Biomédico. Universidade Federal de Goiás - Goiânia-GO, Brasil.*
[3]*Professor do curso de Biomedicina, Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Regional Jataí, Universidade Federal de Goiás - Jataí-GO, Brasil.*
[4]*Professora da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás. Goiânia-GO, Brasil.*
[5]*Professora no Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás - UFG. Goiânia-GO, Brasil.*
[6]*Pesquisadora no Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás - UFG. Goiânia-GO, Brasil.*

Instituição: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás.

Conflito de interesses: sem conflito de interesse
Suporte financeiro: Não houve suporte financeiro.

Recebido em 28/11/2018
Artigo aprovado em 29/05/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900801

vertical ocorre no período inicial da infecção quando a gestante soronegativa passa a ser soropositiva. Existem várias técnicas sorológicas para o diagnóstico da toxoplasmose, e os principais testes são o imunoenzimático (ELISA), teste de hemaglutinação indireto (HAI) e a imunofluorescência indireta (IFI).[3]

O método laboratorial de escolha utilizado na maioria dos laboratórios clínicos é o imunoenzimático (ELISA), cuja técnica se baseia na pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG e apresentam elevada sensibilidade e especificidade. A detecção de anticorpos IgM são sugestivos de fase aguda, enquanto anticorpos IgG são sugestivos de fase crônica.[3,4]

O papel filtro é utilizado como uma alternativa para a coleta do sangue total, pelo baixo custo e facilidade no armazenamento e transporte de amostras, uma vez que estas estão estáveis e não infectantes podendo ser transportadas para laboratórios especializados sem a necessidade de refrigeração e acondicionamento especiais. O papel filtro é utilizado principalmente na realização da triagem neonatal (teste do pezinho) e de triagem do pré-natal (teste da mamãe) onde é realizada a pesquisa de anticorpos específicos para diversas doenças como toxoplasmose, vírus da imunodeficiência humana (HIV), sífilis, citomegalovírus, rubéola, hepatites B e C, doença de Chagas e vírus linfotrópico da célula T (HTLV).[4] Portanto, o objetivo do presente estudo foi validar o uso do papel filtro no teste sorológico para toxoplasmose.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás com o parecer de Nº36980714.5.0000.0037, em consonância às questões éticas contidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Seleção do grupo de estudo

Foi realizado um estudo de prevalência em gestantes, no município de Goiânia e região metropolitana. As pacientes eram provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS) e foram atendidas nos serviços de saúde do estado de Goiás, no Centro de Atenção Integral à Saúde (CAIS) Nova Era, no município de Aparecida de Goiânia, na Unidade Básica de Saúde (UBS) da Vila Mutirão, no Hospital e Maternidade Dona Iris e na Secretaria de Promoção Social localizada na cidade de Inhumas-GO, no período de outubro de 2014 a janeiro de 2016.

A seleção das gestantes foi aleatória nas unidades de saúde. Após serem convidadas e receberem todos os esclarecimentos a respeito da pesquisa, as que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Quando menor de idade, foi coletada a assinatura do responsável legal. Em seguida foi aplicado um questionário socioeconômico para avaliação dos hábitos alimentares, fatores demográficos, comportamentais e obstétricos. Todas as perguntas feitas foram relacionadas com os possíveis fatores de risco para adquirir a toxoplasmose, tais como: origem dos alimentos, da água e destino do esgoto, modo de criação de animais domésticos (cães e gatos), hábitos de higiene, dados obstétricos como idade gestacional e relatos de abortos pregressos.

Coleta de amostras biológicas

A coleta de sangue venoso foi realizada com a utilização de seringas descartáveis de 5 mL e imediatamente a amostra foi distribuída nas áreas demarcadas no papel filtro Whatman 903®, sendo o restante acondicionado em tubos de 4 mL contendo gel separador para a obtenção de soro, e o material identificado com as iniciais de cada paciente e número de registro. As amostras foram encaminhadas para o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), para a realização da pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*T. gondii,* tanto no soro como no papel filtro.

Avaliação do perfil sorológico

Foi utilizado o kit comercial SERION ELISA classic®, seguindo todas as orientações do fabricante sendo que este kit é padronizado apenas para pesquisa de anticorpos IgG utilizando papel filtro, porém, nesta pesquisa foram realizados os testes de IgM com essa marca para avaliação da acurácia.

O kit SERION ELISA classic® baseia-se na interação específica de anticorpos com os antígenos correspondentes. As cavidades da microplaca são revestidas com antígenos específicos de *T. gondii.* Se existirem anticorpos específicos na amostra, estes serão ligados ao antígeno fixo. Um anticorpo secundário, que foi conjugado com a enzima fosfatase alcalina, detecta e liga-se ao complexo imune (antígeno/anticorpo). O substrato incolor p-nitrofenilfosfato é então convertido no produto corado p-nitroenol. A intensidade do sinal do produto desta reação é proporcional à concentração do analito na amostra e é medido por fotometria.

Os resultados foram apenas qualitativos, expressos em reagentes e não reagentes, tanto para IgG quanto para IgM, podendo ser encontradas qualquer uma das seguintes situações: sororreatividade (IgG reagente/IgM reagente; IgG reagente/IgM não reagente; IgG não reagente/IgM reagente) e susceptibilidade (IgG não reagente/IgM não reagente). Ao finalizar os testes sorológicos, as pacientes que apresentaram sorologia condizente com a fase aguda da infecção foram informadas sobre os resultados e encaminhadas ao clínico que as acompanhava durante o pré-natal.

Análise estatística

Os resultados das sorologias foram processados no programa EpiInfo® versão 3.2.1. Foi realizada a avaliação da prevalência, a frequência de positividade no soro e papel filtro; para a comparação entre as amostras foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e o índice *kappa* (κ), sendo que os resultados obtidos a partir da amostra de soro foram adotados como padrão-ouro.

Os cálculos de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e κ foram calculados em tabela de contingência ou tabela 2x2 (Tabela 1).

Tabela 1 - Tabela de contingência 2 x 2 utilizada para análise

Teste	Padrão Ouro		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

A sensibilidade a/(a+c) é definida como a capacidade de um teste detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. A especificidade d/(b+d) é definida como a capacidade de um teste detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios. O valor preditivo positivo a/(a+b) é a proporção de doentes entre os positivos no teste. O valor preditivo negativo d/(c+d) é a proporção de sadios entre os negativos no teste. O índice *kappa* informa a proporção de concordância, entre técnicas além do esperado, que varia de "menos 1" (completo desacordo nas leituras) a "mais 1" (completo acordo nas leituras), onde zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso. Tabela 2.[5]

Tabela 2 - Escala de concordância para interpretação do índice *kappa*

Kappa	Concordância
< 0,00	Nenhuma
0,00 - 0,20	Fraca
0,21 - 0,40	Sofrível
0,41 - 0,60	Regular
0,61 - 0,80	Boa
0,81 - 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 1.006 amostras no papel filtro sendo 443 positivas e 563 negativas para IgG anti-*T. gondii,* uma amostra positiva e 1.005 negativas para IgM anti-*T. gondii.* No soro foram 421 amostras positivas e 585 negativas para IgG, três amostras positivas e 1.003 negativas para IgM (Figura 1).

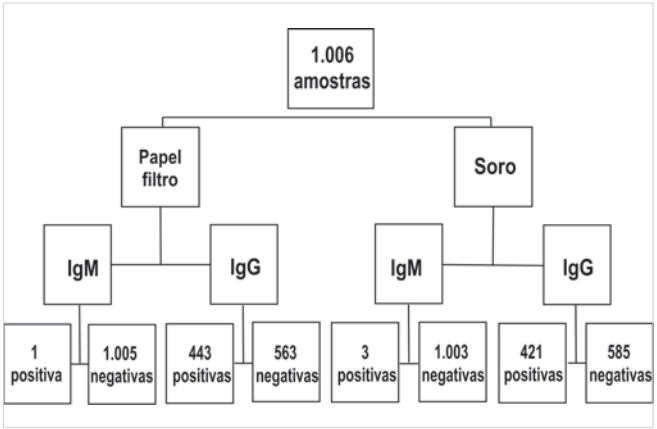


Figura 1. Resultado das amostras analisadas com papel filtro e soro.

A sensibilidade calculada para IgM foi de 33,3% e para IgG foi de 89,3% no papel filtro em comparação com a amostra de soro, sendo que a determinada pelo fabricante no soro foi de 97,8% para IgM e de 98,2% para IgG. Em um estudo com gestantes realizado no estado do Mato Grosso do Sul, foi encontrada uma sensibilidade de 99,4% para IgM e de 99,3% para IgG no papel filtro.[4] Em Minas Gerais, realizou-se uma comparação entre ensaios imunoenzimáticos em amostras de papel filtro e soro, e a sensibilidade encontrada foi de 56,8% para IgM e de 84,0% para IgG no papel filtro pela técnica de ensaio imunoenzimático por fluorescência (ELFA).[5] Em Brasília, na análise comparativa entre soro e papel filtro, foi demonstrada uma sensibilidade de 99,83% no papel filtro para IgM.[6]

Analisando-se a sensibilidade na comparação entre soro e papel filtro para diagnóstico de outras doenças infecciosas, no estudo do Mato Grosso do Sul, foi encontrada uma sensibilidade de 100% para citomegalovírus IgM e de 99,6% para IgG, de 99,5% para doença de Chagas IgG, de 100% para herpes simples 1 e 2 IgM, de 97,9% para IgG, de 98,1% para hepatite C IgG, de 99,7% para HBsAg, de 99,5% para anti-HBC, de 100% para HTLV I e II, de 98,9% para sífilis IgG e de 99,6% para rubéola IgM e IgG.[4] Em outros estudos realizados com papel filtro, no Rio de Janeiro, foi encontrada uma sensibilidade de 100% para detecção de HIV 1 e 2 e para *T. pallidum*,[7] e para anti-HCV foi de 89,58%;[8] no estudo realizado no Instituto Oswaldo Cruz, foi encontrada uma sensibilidade de 90,5% para anti-HBc, de 97,6% para HBsAg e de 78,0% para anti-HBs.[9] No estudo com papel filtro em Goiás foi encontrada a sensibilidade de 100% para doença de Chagas.[10]

A especificidade calculada para IgM neste estudo foi de 100% e para IgG de 88,5%, no papel filtro, sendo que a indicada pelo fabricante no soro foi de 95,7% para IgM e de 99,4% para IgG. No estudo do Mato Grosso do

Sul, foi encontrada uma especificidade de 99,8% para IgM e de 99,8% para IgG no papel filtro.[4] Em Minas Gerais, foi de 98,4% para IgM e de 96,9% para IgG,[12] enquanto que, no estudo em Brasília, foi encontrada uma especificidade de 98,73% para IgM.[6]

Ao se analisar a especificidade para outras infecções, o estudo do Mato Grosso do Sul encontrou uma especificidade de 97,7% para citomegalovírus IgM, de 100% para IgG, de 99,8% para doença de Chagas IgG, de 98,9% para herpes simples 1 e 2 IgM, de 99,5% para hepatite C IgG, de 99,8% para HBsAg, de 99,8% para Anti-HBC, de 99,9% para HTLV I e II, de 99,9% para sífilis e de 99,8% para rubéola IgM e IgG.[4] No Rio de Janeiro, foi encontrada uma especificidade de 100% para detecção de HIV 1 e 2 e para *T. pallidum*[7] e, para Anti-HCV, foi de 99,81%;[8] no estudo realizado no Instituto Oswaldo Cruz, foi encontrada uma especificidade de 92,6% para anti-HBc, de 96,7% para HBsAg e de 97,3% para anti-HBs.[9] No estudo com papel filtro para doença de Chagas em Goiás, foi de 100%.[10]

O valor preditivo positivo (VPP) foi de 100% para IgM e de 84,9% para IgG. O valor preditivo negativo (VPN) foi de 99,8% para IgM e de 92,0% para IgG. No estudo em Minas Gerais, o VPP encontrado foi de 63,6% para IgM e de 97,3% para IgG, e o VPN foi de 97,5 para IgM e de 96,4% para IgG.[5] O índice *kappa* calculado para IgG foi de 0,88, sendo classificado com uma ótima concordância entre soro e papel filtro. Para IgM foi de 0,49, classificado com uma concordância regular. Em um estudo realizado em Brasília, o κ encontrado foi de 0,98, indicando uma ótima concordância entre o soro e papel filtro para IgM.[6]

Sugerimos que o κ tenha sido regular para IgM devido ao fato de que o kit utilizado para a realização dos exames ainda não foi validado para utilização do material colhido em papel filtro. Excluímos interferências do fator reumatoide, pois na metodologia utilizada ele é incluído para evitar falsos positivos de IgM.

CONCLUSÃO

Demonstramos uma boa sensibilidade, especificidade e uma ótima concordância para a pesquisa de anticorpos da classe IgG, devido à semelhança entre os resultados encontrados em papel filtro e soro. Porém, a adaptação do uso do Kit comercial para a pesquisa de anticorpos da classe IgM em papel filtro apresentou uma boa especificidade e baixa sensibilidade, demonstrando uma concordância regular quando comparado ao soro.

Devido ao índice *kappa* não ter apresentado valor esperado para IgM como foi para IgG, sugerimos que novas pesquisas sejam realizadas, até que haja a padronização do kit para realização de exames utilizando amostras em papel filtro.

Abstract

Objective: *To validate the use of the serological test for toxoplasmosis in filter paper in blood samples from pregnant women from the city of Goiânia and the metropolitan region.* ***Methods:*** *This is a prospective study in which 1,006 blood samples were collected in pregnant women in the city of Goiânia and in the metropolitan region. All pregnant women who agreed to participate in the study signed a Free and Informed Consent Form. Serological profile evaluation was performed using ELISA (immunoenzymatic assay), with serum and filter paper samples, to investigate anti-Toxoplasma gondii antibodies of the IgM and IgG classes, and the kit used is not standardized for the research of IgM antibodies on the filter paper. Statistical analysis was performed in the database of the EpiInfo® version 3.2.1 program, which evaluated the prevalence of seropositivity, frequency of serum positivity, filter paper positivity frequency, sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and index the kappa.* ***Results:*** *In the serum analysis, 421 samples were positive for antibodies of the IgG class and three were positive for antibodies of the IgM class. In the filter paper yielded 443 positive for antibodies of the IgG class and one positive for IgM class antibodies.* ***Conclusion:*** *The study allowed to identify the similarity of positive samples both with the use of serum and in the filter paper for IgG class antibodies. However, for serum IgM antibodies, the use of serum was more sensitive when compared to serum IgG. taken with the filter paper.*

Keywords

Diagnosis; serology; pregnant women; toxoplasmosis

REFERÊNCIAS

1. Andrade GMQ, Resende LM, Goulart EMA, Siqueira A, Vitor RWA, Januario JN. Deficiência auditiva na toxoplasmose congênita detectada pela triagem neonatal. Rev Bras Otorrinolaringol 2008; 74(1):21-8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992008000100004&lng=en
2. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10(7):815-28.
3. Bittencourt LHFDB, Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Valentim-Zabott M, Freire RL, Pinto SB, et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gestantes a partir da implantação do Programa de Vigilância da Toxoplasmose Adquirida e Congênita em municípios da região oeste do Paraná. Rev Bras Ginecol e Obs 2012;34(2):63-8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php? script=sci_arttext &pid=S0100-72032012000200004&lng =en.
4. Figueiró-Filho EA, Senefonte FR, Lopes AH, de Morais OO, Souza Júnior VG, Maia TL, et al. Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(2):181-7. [Article in Portuguese]
5. Marques BA. Comparação entre ensaios imunoenzimáticos realizados em amostras de sangue seco e soro para triagem pré-natal da toxoplasmose: estudo de base populacional. Minas Gerais. Dissertação. [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2016. 57 p.
6. Minuzzi ALM. Análise comparativa entre testes de ELISA convencional (soro) e papel filtro (sangue seco), para detecção de Toxoplasmose IgM. Brasília. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade de Brasília; 2008. 60 p.
7. Gómez J, Appolinário M, Abreu D, Castro A, Martí J, Prates S, et al. Comparação da Coleta das Amostras de Sangue na Triagem Pré-Natal, Utilizando o Papel de Filtro e Punção Venosa na Técnica de ELISA para Detecção de HIV 1+2. J bras Doenças Sex Transm 2010;22(3):123-28.
8. Lima MP. Aplicabilidade do Sangue Seco em Papel Filtro para Estudos de Prevalência da Infecção pelo Vírus da Hepatite C em Diferentes Grupos. Rio de Janeiro. Dissertação. [Mestrado em Medicina Tropical] - Instituto Oswaldo Cruz; 2015. 104. p.

9. Instituto Oswaldo Cruz - Ciência para a Saúde da População Brasileira (Comunição). Nova aposta para diagnóstico da Hepatite B no Rio de Janeiro. Arquivo de notícias [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 07/11/2016]; Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1535&sid=32&tpl=printerview
10. Gomes TC. Situação atual de mães cronicamente infectadas pelo tripanosoma cruzi no estado de Goiás e triagem sorológica em recém-nascidos pelo Teste do Pezinho na região metropolitana de Goiânia. Goiânia. Dissertação. [Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro] - Universidade Federal de Goiás; 2016. 52 p.

Correspondência
Sarah Ribeiro de Oliveira
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Universidade Federal de Goiás
Rua 235, s/n, Setor Universitário
74605-050 - Goiânia-GO, Brasil

Efetividade da administração de Omalizumabe para tratamento de pacientes com urticária crônica espontânea

Effectiveness of Omalizumabe administration for treatment of patients with spontaneous chronic urticaria

Débora Laureano de Souza[1]
Jhonata Pereira Muniz[1]
Thiago Mamoru Sakae[2]
Mariana Mangilli de Menezes[3]

Resumo
A urticária crônica espontânea (UCE) é uma doença que afeta uma parcela importante da população, gerando impactos negativos sobre a qualidade de vida e rendimento psicossocial. A falta de resposta ao tratamento de primeira escolha impõe uma necessidade iminente de novas estratégias terapêuticas. O tratamento desses pacientes com Omalizumabe tem demonstrado efeito promissor. **Objetivo:** Avaliar a resposta clínica de pacientes com diagnóstico de urticária crônica espontânea ao uso de Omalizumabe em pacientes acompanhados em uma clínica particular no Sul do Brasil. **Métodos:** Estudo observacional de coorte aberta, descritivo, exploratório. Foram avaliados os prontuários e empregados questionários validados de qualidade de vida (DLQI) e escore de atividade da urticária (UAS) para sete pacientes. **Resultados:** A UCE foi verificada nas idades entre 22 e 66 anos e é mais prevalente no sexo feminino (71,4%). Todos os pacientes estavam sendo polimedicados com no mínimo três medicações para UCE sem melhora. Após o emprego do Omalizumabe, houve redução estatisticamente significante nos níveis de IgE total, na dose de corticosteroide (27,5 mg ± 15,0 para 0±0) e nos escores dos questionários DLQI (12,29 ± 9,46 para 4,85 ± 7,96) e UAS (32,86 ± 10,37 para 12,57 ± 13,32) ao longo do acompanhamento de seis meses. **Conclusão:** O Omalizumabe mostrou-se uma opção terapêutica segura e eficaz, apresentando efeitos benéficos como melhora da qualidade de vida, melhora dos sintomas e diminuição do uso de medicações concomitantes.

Palavras-chave
Urticária; anticorpos monoclonais; antagonistas dos receptores histamínicos; qualidade de vida; corticosteroides

INTRODUÇÃO

Urticária Crônica Espontânea (UCE) é uma doença cutânea caracterizada pelo desenvolvimento de lesões maculopapulares eritematosas, podendo estar associada ou não a angioedema durante um período superior a seis semanas. Algumas outras características, como urtica e angioedema (Quadro 1), são importantes para a diferenciação de outras patologias que cursam com as mesmas lesões elementares, como síndromes autoinflamatórias e angioedema hereditário.[1]

Estima-se que a prevalência da UCE gire em torno de 0,5%-1% na população geral, sendo, de longe, a forma mais comum de urticária não aguda (66%-93%).[2,3] Os principais desafios desse tipo de urticária são a falha em identificar-se um fator desencadeante e o comportamento não previsível da doença, acabando por promover frustração, tantos

Quadro 1. Características da urtica e do angioedema

Lesão	Característica
Urtica	Edema central, de tamanho variável, quase sempre acompanhado de eritema reflexo em sua margem
	Prurido ou sensação de queimação.
	Padrão transitório, onde a pele retorna a sua aparência anterior, normalmente entre 1-24h após o aparecimento da lesão
Angioedema	Edema importante, eritematoso ou não, envolvendo a derme inferior e tecido subcutâneo, de início súbito.
	Algumas vezes apresenta dor, invés de prurido, e frequentemente acomete abaixo das membranas mucosas
	Resolução mais lenta que a Urtica, em cerca de 72h

Fonte: Traduzido e adaptado de Zuberbier [1]

[1]*Estudante de Medicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC - Criciúma-SC, Brasil.*
[2]*Professor da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL - SC, Brasil.*
[3]*Professora da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC - Criciúma-SC, Brasil.*

Instituição: Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC - Criciúma-SC, Brasil.

Artigo recebido em: 05/03/2018
Artigo aprovado: 29/05/2019
DOI: 10.21877/2448-3877.201900682

nos pacientes, quanto em seus médicos.[3] Importante destacar também o grande impacto na qualidade de vida do acometido devido ao caráter crônico da doença.[1,4]

Em uma consulta ao banco de dados da Editora Internacional Elsevier (Scopus), pelo termo "Chronic Spontaneous Urticaria" em títulos, resumos e palavras-chaves de artigos ou revisões, obteve-se resultado de 587 documentos, sendo, 293 (50%) publicados nos últimos três anos.[5] Com este dado, é possível observar-se a escassez literária sobre o tema e o interesse científico atual, o qual busca elucidar informações importantes no que diz respeito às urticárias, tais como sua etiologia, fisiopatologia e condutas terapêuticas mais eficazes.[1] Além disso, o desenvolvimento de duas ferramentas para a verificação da sintomatologia - UAS - e qualidade de vida - DLQi - dos acometidos pela UCE, têm contribuído de maneira significativa no avanço do tratamento e manejo desta patologia.[6]

Quanto à terapêutica, é consensual o uso de anti-histamínicos H1 de segunda geração como tratamento de primeira linha, podendo as doses ser aumentadas até quatro vezes para controle dos sintomas. Todavia, nem todos os pacientes atingem resolução satisfatória da UCE, mesmo após sucessivos ajustes nas doses medicamentosas, troca do agente anti-histamínico, uso de corticoesteroides sistêmicos, ansiolíticos, antileucotrienos e associação de múltiplos fármacos. Nesses casos, o tratamento com Omalizumabe, um anticorpo monoclonal anti-imuno-globulina E (IgE) revela-se como importante alternativa para o manejo da UCE.[6] Tal droga parece agir por dois mecanismos distintos, não totalmente compreendidos: ligando-se à IgE livre circulante; e causando *downregulation* dos receptores de alta afinidade à IgE (FccRI) dos basófilos.[2]

O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto na qualidade de vida e no grau de atividade da urticária do Omalizumabe em nossa população.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de um estudo de coorte aberta, observacional, descritivo, exploratório, com abordagem quantitativa, realizado em uma clínica particular na cidade de Criciúma, Santa Catarina, Sul do Brasil. Após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa institucional (2.272.096), foram analisados prontuários médicos dos pacientes com diagnóstico de UCE e baixa resposta ao tratamento polimedicamentoso (n = 07) no período de abril de 2017 a outubro de 2017.

As variáveis analisadas obtidas por meio do prontuário do paciente foram sexo, faixa etária, nível de IgE, sintomas e medicações prévias para UCE. O corticoesteroide utilizado foi a prednisona com dose em miligramas. A resposta ao Omalizumabe, o qual foi aplicado, em média, a cada quatro semanas em dose de 300 mg por via subcutânea, foi avaliada por meio de variáveis dependentes de escore de atividade da urticária (*Urticaria Activity Score* - UAS) e de qualidade de vida (*Dermatology Life Quality Index* - DLQI), verificados antes da primeira aplicação e após as aplicações posteriores de 2 a 7 meses de tratamento.

O UAS,[7] um questionário previamente validado, é composto por duas variáveis: número de lesões urticariformes (0-3 pontos) e a intensidade do prurido (0-3 pontos). O paciente deve ser instruído a avaliar cada variável uma vez por dia, no mesmo horário, por sete dias consecutivos. O resultado final pode variar de 0 a 21 pontos para cada variável e quantifica a atividade da UCE durante a semana.

O DLQi avalia como a alteração dermatológica impacta o dia-a-dia do paciente em seis domínios: sintomas e sentimentos, atividades diárias, lazer, trabalho e escola, relacionamento pessoal e tratamento, e aceita como respostas: realmente muito (3), bastante (2), um pouco (1), nada ou sem relevância (0). O escore varia de 0-30, sendo escores maiores apontando maior impacto na qualidade de vida. A soma é interpretada como em níveis de comprometimento na qualidade de vida: sem comprometimento na qualidade de vida (0-1), comprometimento leve (2-5), comprometimento moderado (6-10), comprometimento grave (11-20) e comprometimento muito grave (21-30).

Os dados coletados foram analisados com auxílio do programa Microsoft Excel utilizando-se a estatística descritiva. As variáveis quantitativas foram testadas nas comparações de antes e depois da intervenção com o Omalizumabe pelo teste t pareado. O nível de confiança adotado foi de 95% ($p<0,05$).

ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa institucional (protocolo 2.272.096) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

RESULTADOS

As características gerais da amostra (n=7) consistiram em idades de 22 a 66 anos e 71,4% do sexo feminino (Tabela 1).

Entre as características clínicas e laboratoriais da amostra (Tabelas 1 e 2), observou-se a presença de angioedema em 28,6% dos pacientes e 71,4% deles apresentavam comorbidades, sendo 54,54% de origem atópica (rinite alérgica, dermatite atópica e asma). Antes do uso de Omalizumabe, os pacientes estavam sendo polimedicados, em média, com 4,42 medicamentos. As medicações mais prevalentes foram os anti-histamínicos H1 de primeira geração (Anti-H1 G1) (100%), antidepressivos inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) (100%), cortico-

Tabela 1 - Características gerais da amostra

Paciente	Sexo	Idade (anos)	História Médica Pregressa	Idade no início dos sintomas (anos)	Duração da doença (anos)	Angioedema associado	IgE total (UI/mL)	UAS7 base	DLQi base	Tratamentos prévios
1	M	66	Linfoma Gástrico Trombose Venosa Profunda Fratura Óssea	53	13	Não	18	14	8	Anti-H1 G1, Anti-H1 G2, Anti- H2, ARLCT, ISRS, CES, Doxepina
2	F	35	Dermatite Atópica	31	4	Sim	187	42	18	Anti-H1 G1, Anti-H1 G2, ISRS, CES
3	F	59	TRH	57	2	Não	300	21	10	Anti-H1 G1, Anti-H1 G2, ISRS
4	F	26	TAG Rinite lérgica	20	6	Não	233	42	16	Anti-H1 G1, Anti-H1 G2, ARLCT, ISRS, CES
5	F	22	Dermatite Atópica Rinite Alérgica	21	1	Sim	3	35	15	AINES, Anti-H1 G1, Anti-H1 G2, ISRS, CES
6	F	24	TAG Dermatite atópica	19	5	Não	3000	42	17	Anti-H1 G1, Anti-H1 G2, ISRS, CES, Anti-H2
7	M	56	-	51	5	Não	153	34	25	Anti-H1 G1, Anti-H1 G2, ISRS, CES
	Total	Média ± DP		Média ± DP	Média	Total	Média ± DP	Média	Média ± DP	Total
	2 M 5 F	41,1 ± 18,1		36 ± 17,1	5,1	Sim (n = 2); Não (n = 5)	41,1 ± 18,1	556 ±	41,1 ± 18,1	AINES (n=1); Anti-H1 G1 (n = 7) Anti-H1 G2 (n = 7); Anti-H2 (n=2) ARLCT (n = 2); CES (n = 6); ISRS (n = 7)

TAG, Transtorno da Ansiedade Generalizado; TRH, Tratamento de Reposição Hormonal; ARLCT, Antagonista do Receptor de Leucotrieno; ISRS, Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina; Anti-H1 G1, Anti-histamínicos de Primeira geração; Anti-H1 G2, Antí-histamínicos de Segunda geração; CES, Corticoesteroide Sistêmico.
Fonte:Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais da amostra no início do estudo.

Presença de angioedema, n (%)	2 (28,6)
Comorbidades, n	11
Doenças atópicas (%)	54,54%
Medicação prévia para UCE, nº/DP	4,42 ± 0,97
AINES	1/7 (14,26%)
Anti-H1 G1	7/7 (100%)
Anti-H1 G2	5/7 (71,42%)
Anti-H2	2/7 (28,0%)
ARLCT	2/7 (28,0%)
CES	6/7 (85,0%)
ISRS	7/7 (100%)
Uso de corticoide crônico, nº (%)	4 (57,14%)
Níveis de IgE (UI/ml)	599 (3 - 3000)

Fonte: Elaborado pelo autor

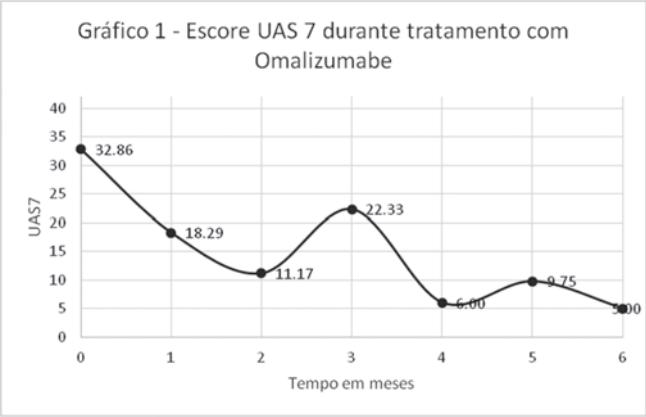
esteroide (CES) (85%) e anti-histamínico H1 de segunda geração (Anti-H1 G2) (71,42%). O uso de CES crônico foi realizado por 57,14% dos pacientes e um paciente apresentou múltiplas fraturas ósseas. O nível de IgE médio inicial foi de 599 UI/mL.

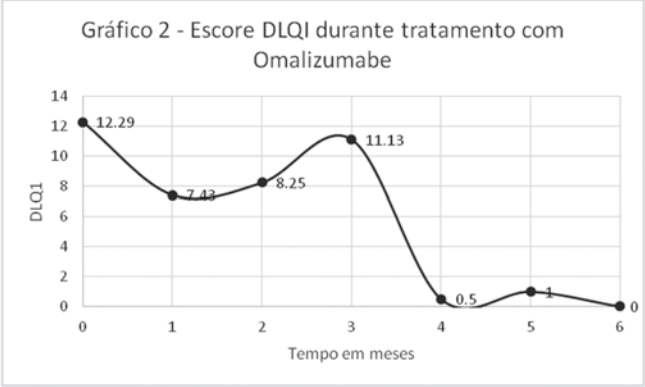
Após o tratamento com Omalizumabe, a resposta de cada paciente foi avaliada com o DLQI e UAS[7] antes e após o tratamento. Antes da primeira aplicação com Omalizumabe, o escore UAS[7] teve média de 32,86 (n=7); no primeiro mês após a aplicação foi de 18,29 (n=7), no segundo mês foi de 11,7 (n=6), no terceiro mês foi de 22,33 (n=3), no quarto mês foi de 6 (n=4), no quinto mês, de 8,33 (n=2) e no sexto mês, de 4 (n=1) (Gráfico 1). O score DLQI, por sua vez, foi de 12,29 (n=7) antes da aplicação, no primeiro mês após a aplicação foi de 7,43 (n=7), no segundo mês foi de 8,25 (n=4), no terceiro mês, de 11,13 (n=3), no quarto mês, de 0,5 (n=2), no quinto mês, de 1 (n=3) e no sexto mês, de 0 (n=1) (Gráfico 2).

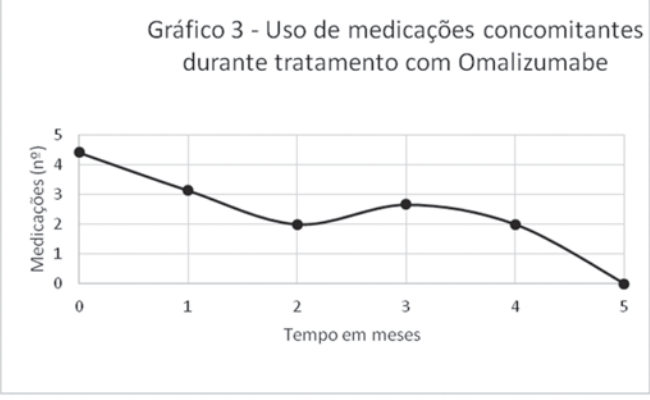
As medicações usadas durante o tratamento com Omalizumabe estão evidenciadas no Gráfico 3. Todos os pacientes usavam medicações, antes do tratamento, na média de 4,42; no primeiro mês após a aplicação do imunobiológico, a média de medicações foi de 3,14 (n=7), após a segunda aplicação foi de 2 (n=5), após a terceira aplicação, de 2,66 (n=3), após a quarta aplicação, de 2 (n=2) e, ao quinto mês, os pacientes não fizeram mais uso de medicações concomitantes (n=2) (Gráfico 3).

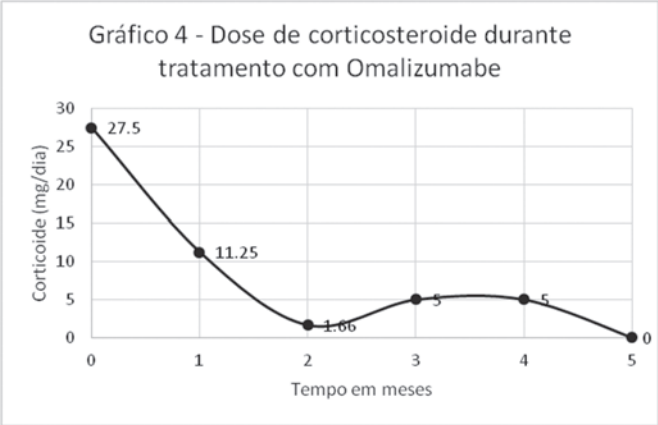
Analisaram-se as doses de CES utilizadas cronicamente pelos pacientes (n=4) antes do uso de Omalizumabe, as quais eram, em média, de 27,5 mg. No primeiro mês após a aplicação, houve redução para 11,25 mg (n=4), no segundo mês a dose foi de 1,66 mg (n=3) e no terceiro mês a dose foi de 5 mg (n=1) e, partir do quinto mês, o uso de CES foi suspenso (Gráfico 4). Efeitos colaterais (n=2) apresentados pelos pacientes ao uso de CES a longo prazo foram fraturas ósseas e infecção fúngica disseminada.

Os efeitos colaterais de eritema papular no local da aplicação e tosse em resposta ao Omalizumabe foram apresentados por 28% dos pacientes.









DISCUSSÃO

A UCE foi mais prevalente no sexo feminino com idade predominante entre 21 e 40 anos, resultado semelhante a estudo realizado na Espanha,[8] o qual aponta a prevalência da doença duas vezes maior em mulheres do que em homens. Também se assemelhou na faixa etária a estudos [9,10] que descrevem a maior prevalência entre a segunda e quinta décadas de vida.

O angioedema, que se associa a um curso mais prolongado e piora da doença[11,12] esteve presente em 28,6% dos pacientes, pouco abaixo dos 35% dos casos de UCE com concomitância de angioedema.[13] As doenças atópicas, por sua vez, também estiveram associadas à UCE,[14] assim como o evidenciado no presente estudo.

Os pacientes com UCE refratária ao tratamento convencional possuem indicação de tratamento com Omalizumabe pela falência dos tratamentos prévios ou pela presença de efeitos colaterais a eles.[15]

Sobre a efetividade do medicamento, 42% obtiveram controle dos sintomas da doença, evidenciado por um escore do UAS7≤ 6, além de 66% da melhora de qualidade de vida, demonstrado pela diminuição do DLQI. Os valores foram um pouco menores do evidenciado em estudo fase 2 de posologia do Omalizumabe (71% e 78%, respectivamente).[16] Tal divergência pode dar-se pela diferença do período de seguimento das amostras.

O número de medicações anteriores usadas pelos pacientes do presente estudo foi de 4,42±0,97, muito semelhantes aos valores basais de um estudo randomizado placebo controlado com 323 pacientes (média de 4,32 ± 2,67).[16] Após o uso de Omalizumabe, ao quinto mês foi suspenso o uso de medições concomitantes.

O uso de corticoide sistêmico é indicado de sete a dez dias,[17,18] porém pacientes com UCE refratária o fazem cronicamente[19] – 57,1% dos pacientes do presente estudo –, o que é preocupante, dado os efeitos colaterais em potencial associado ao uso crônico, como diabetes *melitus*,

hipertensão, osteoporose e sangramentos gastrointestinal.[20] A maior complicação do uso crônico de CES, a fratura óssea resultante de perda óssea,[21] foi apresentada por um paciente do estudo. Outro paciente apresentou pitiríase versicolor disseminada predisposta pelo CES, uma vez que este facilita infecções fúngicas pelo efeito inibidor do sistema imunológico e da resposta inflamatória.[22]

Em comparação ao estudo de Sussman,[23] todos os pacientes utilizaram anti-histamínicos, assim como no estudo comparativo 85% usaram corticoide sistêmico *versus* 97%, 28% usavam antileucotrienos *versus* 16%, anterior ao tratamento com Omalizumabe. O uso de Omalizumabe reduziu a necessidade de corticosteroides em 85%, resultado superior a estudos com outras drogas poupadoras de corticoides, como o metotrexato e ciclosporina.[24,25] O efeito colateral de anafilaxia ao Omalizumabe não foi apresentado no presente estudo, característica que favorece a consagração recente do imunobiológico como opção de tratamento segura para UCE refratária.[26]

Os principais fatores limitantes do uso do imunobiológico encontradas no estudo foram o alto custo da medicação e a disponibilidade baixa no mercado.

CONCLUSÃO

O Omalizumabe mostrou-se uma opção terapêutica segura e eficaz, apresentando efeitos benéficos para os pacientes, como melhora da qualidade de vida, melhora dos sintomas de UCE e diminuição importante da necessidade de uso de medicações concomitantes.

Novos estudos se fazem necessários para a elucidação do mecanismo de ação do Omalizumabe e dos fatores que identifiquem bons respondedores ao imunobiológico para, assim, reduzir o período de latência para o início de um tratamento efetivo nesses pacientes e evitar os efeitos colaterais de uma das principais medicações adjuvantes da UCE refratária usado pelos pacientes, o corticoesteroide sistêmico.

Abstract

Introduction: *Chronic Spontaneous Urticaria (CEU) is a disease that affects a significant portion of the population, generating negative impacts on quality of life and psychosocial performance. Lack of response to first-line treatment imposes an imminent need for novel therapeutic strategies. The treatment of these patients with Omalizumab has shown a promising effect.* ***Objective:*** *To evaluate the clinical response of patients diagnosed with Chronic Urticaria Spontaneous to the use of Omalizumab in patients followed at a private clinic in the South of Brazil.* ***Methods:*** *Observational, open cohort study, descriptive, exploratory. The validated questionnaires Dermatology Life Quality Index (DLQI) and Urticaria Activity Score (UAS) for seven patients were evaluated.* ***Results:*** *The CEU was verified in the ages between 22 and 66 years and more prevalent in the female (71.4%). All patients were being treated with at least three CEU medications without improvement. After the use of Omalizumab, a statistically significant decrease at a dosage of corticosteroids (27.5mg±15.0 to 0±0) and DLQI questionnaires scores (12.29±9.46 to 4.85±7.96) and UAS (32.86±10.37 to 12.57±13.32) over the six-month follow-up.* ***Conclusion:*** *Omalizumab proved to be a safe and effective therapeutic option, with benefits such as improved quality of life, improvement of symptoms and decreased use of concomitant medications.*

Keywords

Urticaria; monoclonals antibodies; histamine antagonists; adrenal cortex hormones; quality of life; corticosteroids

REFERÊNCIAS

1. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, Bindslev-Jensen C, Brzoza Z, Canonica GW, et al. The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: The 2013 revision and update. Allergy Eur J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2014 Jul [cited 2017 Oct 21];69(7):868-87. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/all.12313
2. Kaplan AP, Giménez-Arnau AM, Saini SS. Mechanisms of action that contribute to efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria. Allergy Eur J Allergy Clin Immunol. 2017;72(4):519-33.
3. Maurer M, Weller K, Bindslev-Jensen C, Giménez-Arnau A, Bousquet PJ, Bousquet J, et al. Unmet clinical needs in chronic spontaneous urticaria. A GA2LEN task force report. Allergy Eur J Allergy Clin Immunol. 2011;66(3):317-30.
4. Criado PR, Martins EJC, Criado FRJ, Maruta CW, Rivitti EA. Urticaria. An Bras Dermatol [Internet]. 2005;1(6):613-32. Available from: http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n6/en_v80n06a08.pdf
5. Scopus [Internet]. Amsterdã: Elsevier; 2017. Available from: https://www.scopus.com/results/results.uri?numberOfFields =0&src=s&clickedLink=&edit=t&editSaveSearch=&origin=searchbasic&authorTab=&affiliationTab=&advancedTab=&scint=1&menu=search&tablin=&searchterm1 =chronic+ spontaneous+ urticaria &field1=TITLE_ABS_KEY&dat
6. Costa C et al. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica da Urticária Crónica Espontânea. Recomendações em Portugal. Acta Med Port [Internet]. 2016;29(11):763-81. Available from: http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/8294/4830
7. Mynek A, Zalewska-Janowska A, Martus P, Staubach P, Zuberbier T, Maurer M. How to assess disease activity in patients with chronic urticaria? Allergy. 2008 Jun;63(6):777-80. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445192
8. Gaig P, Olona M, Muñoz Lejarazu D, Caballero MT, Domínguez FJ, Echechipia S, et al. Epidemiology of urticaria in Spain. J Investig Allergol Clin Immunol [Internet]. 2004 [cited 2017 Oct 21];14(3):214-20. Available from: http://www.jiaci.org/issues/vol14issue03/214-220.pdf
9. Ferrer M. Epidemiology, healthcare, resources, use and clinical features of different types of urticaria. Alergologica 2005. J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19 Suppl 2:21-6.
10. Zhong H, Song Z, Chen W, Li H, He L, Gao T, et al. Chronic urticaria in Chinese population: A hospital-based multicenter epidemiological study. Allergy. 2014 Mar;69(3):359-64,
11. Cooper KD. Urticaria and angioedema: Diagnosis and evaluation. J Am Acad Dermatol. 1991 Jul;25(1 Pt 2):166-74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622(91)70184-4
12. Champion RH, Roberts SOB, Carpenter RG, Roger JH. Urticaria and Angioedema: a Review of 554 Patients. Br J Dermatol. 1969; 81 (8):588-97.
13. Najib U, Bajwa ZH, Ostro MG, Sheikh J. A retrospective review of clinical presentation, thyroid autoimmunity, laboratory characteristics, and therapies used in patients with chronic idiopathic urticaria. Ann Allergy Asthma Immunol. 2009 Dec;103(6):496-501. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60266-9

14. Duarte P. Urticária Crónica: Experiência da Consulta nos CHUC. 2014 [cited 2017 Oct 21]; Available from: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/37446/1/Urticaria cronica experiencia da consulta nos CHUC.pdf
15. Metz M, Maurer M. Omalizumab in chronic urticaria. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2012;12(4):406-11.
16. Maurer M, Rosén K, Hsieh H-J, Saini S, Grattan C, Gimenéz-Arnau A, et al. Omalizumab for the Treatment of Chronic Idiopathic or Spontaneous Urticaria. N Engl J Med [Internet]. 2013 [cited 2017 Oct 21];368(10):924-35. Available from: http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1215372
17. Maurer M, Magerl M, Metz M, Zuberbier T. Diagnostik und therapie der chronischen urtikaria - Was wird von revision und aktualisierung der internationalen leitlinie erwartet? Ein report der öffentlichen konsensuskonferenz "URTICARIA 2012." Allergo J. 2013;22(5):324-9.
18. Mehta A, Godse K, Patil S, Nadkarni N, Gautam M. Treatment of Refractory Chronic Urticaria. Indian J Dermatol. 2015 [cited 2017 Oct 21];60(3):230-7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26120147
19. Agondi RC, Crispim L, Almonfrey FB, Kalil J, Motta, Motta AA. Urticária crônica espontânea refratária aos anti-histamínicos: opção por ciclosporina. Arq Asma Alerg Imunol. 2017;1(2):212-6. Acessível em: https://docplayer.com.br/52521950-Urticaria-cronica-espontanea-refrataria-aos-anti-histaminicos-opcao-por-ciclosporina.html
20. Criado PR, Criado RF, Maruta CW, Reis VM. Chronic urticaria in adults: State-of-the-art in the new millennium. An. Bras. Dermatol. [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Oct 21; 90(1):74-89.]. Available from: http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153509
21. Eastell R, Reid DM, Compston J, Cooper C, Fogelman I, Francis RM, et al. A UK Consensus Group on a management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. J Intern Med. 1998 Oct;244(4):271-92. Available from: https://www. ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9797491
22. Cardozo Pereira AL, Bolzani FCB, Stefani M, Charlín R. Uso sistêmico de corticosteroides: revisão da literatura. Med Cutan Iber Lat Am. 2007; 35(1):35-50. Available from: www.saudedireta.com.br/docsupload/134442634406-091.pdf
23. Sussman G, Hébert J, Barron C, Bian J, Caron-Guay RM, Laflamme S, et al. Real-life experiences with omalizumab for the treatment of chronic urticaria. Ann Allergy Asthma Immunol. 2014 Feb;112(2):170-4. Available from: http://www.annallergy.org/article/S1081-1206(13)00926-5/pdf
24. Perez A, Woods A, Grattan CE. Methotrexate: A useful steroid-sparing agent in recalcitrant chronic urticaria. Br J Dermatol. 2010 Jan; 162(1):191-4
25. Toubi E, Blant A, Kessel A, Golan TD. Low-dose cyclosporin A in the treatment of severe chronic idiopathic urticaria. Allergy. 1997;52(3):312-6.
26. Kaplan AP. Chronic Spontaneous Urticaria: Pathogenesis and Treatment Considerations. Allergy Asthma Immunol Res. 2017 Nov;9(6):477-482. Available from: https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4168/aair.2017.9.6.477&vmode=PUBREADER

Correspondência
Mariana Mangilli de Menezes
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC
Unidade Acadêmica em Ciências da Saúde - UNASAU
Curso de Medicina,
Criciúma - SC, Brasil
marimenezes1@hotmail.com
(48) 3437-4588

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS
Brazilian Journal of Clinical Analyses
ISSN 2448-3877 – Versão *Online*
ISSN 0370-369-x – Versão Impressa

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC], criada em 1969, é o órgão oficial de divulgação científica da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas [SBAC]. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no LILACS [Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde].

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC] é publicada em português e inglês e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária.

Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em ".pdf". As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de conflito de interesse é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde [CNS] e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa [CONEP]. A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 466/2012) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa [CEP] da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em ".pdf" da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [CONCEA] e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [COBEA], bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA] deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado, explicitamente, no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais [CEUA] da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em ".pdf" da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde [OMS], do International Committee of Medical Journal Editor [ICMJE] e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry [ANZCTR], International Standard Randomised Controlled Trail Number [SRCTN], Nederlands Trial Register [NTR], UMIN Clinical Trials Registry [UMIN-CTR], WHO International Clinical Trials Registry Platform [ICTRP]. No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (http://www. ensaiosclinicos.gov.br) do Ministério da Saúde [DECIT/MS], Organização Panamericana de Saúde [OPAS] e Fundação Oswaldo Cruz [Fiocruz] é igualmente aceito pela RBAC. O número de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção Material e Métodos.

Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou, eventualmente, pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados pelos pareceristas/ revisores serão informados imediatamente aos autores.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunohematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categoriais de comunicação científica designadas abaixo:

ARTIGOS ORIGINAIS: trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

ARTIGOS DE REVISÃO: trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

COMUNICAÇÃO BREVE: ttrabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RELATO DE CASO: trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

NOTA TÉCNICA: Descrição/ validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RESENHA: Revisão crítica de obra recém publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/*abstract*.

IMAGENS EM ANÁLISES CLÍNICAS: máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em ".jpg" ou ".tif" e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

CARTA AO EDITOR: correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na *Revista Brasileira de Análises Clínicas* ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnico-científicos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

EDITORIAIS: escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Deverão conter um máximo de 2000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é **enfaticamente** estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e de preferência, familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos. em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos.

A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a normalização técnica conforme o quadro abaixo.

ESTRUTURA DOS ARTIGOS	
Português	**Inglês**
Titulo Completo *Incluir versão em Inglês*	**Complete Title** *Incluir versão em Português*
Título Corrido *Incluir versão em Inglês*	**Running Title** *Incluir versão em Português*
Autores	**Authors**
Resumo *Incluir versão em Inglês*	**Abstract** *Incluir versão em Português*
Palavras-Chave *Incluir versão em Inglês*	**Keywords** *Incluir versão em Português*
Introdução	**Introduction**
Material e Métodos	**Material and Methods**
Ética	**Ethics**
Resultados	**Results**
Discussão	**Discussion**
Conclusão	**Conclusion**
Conflito de interesse	**Conflicts of Interests**
Suporte Financeiro	**Funding Sources**
Agradecimentos	**Ackowledgements**
Referências	**References**

TÍTULO COMPLETO: Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (excetuando-se, quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico.

TÍTULO CORRIDO: Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.

AUTORES: Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

RESUMO: Deverá ser redigido de forma impessoal, bem como ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado ainda de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

PALAVRAS-CHAVE: Deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chaves deverão ser extraídas do vocabulário DeCS [Descritores em Ciências da Saúde], elaborado pela Bireme, e/ou MeSH [*Medical Subject Headings*], elaborado pelo NLM [*National Library of Medicine*]. Os vocabulários DeCS (http://decs.bvs.br/) e MeSH (http://www.nlm.nih.gov/mesh/) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

INTRODUÇÃO: Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

MATERIAL E MÉTODOS: Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção, deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como deverá ser feita a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também, claramente, indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

ÉTICA: Nesta seção, deverá ser declarado, textualmente, o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionado também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição a qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando, claramente, o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

RESULTADOS: Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

DISCUSSÃO: Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

CONCLUSÕES: Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

CONFLITOS DE INTERESSE: Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito "Não há conflitos de interesse".

SUPORTE FINANCEIRO: Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS: Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

TABELAS: O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto (ou amostra) a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra "Tabela", seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas

de rodapé (legendas), indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para notas de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excel e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

FIGURAS: Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias. Deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução (mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato ".jpg" ou "tif" e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excell em formato ".doc", ".docx" ou ".xls" e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excell, caso não seja possível converter para formato ".tif". Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações serão colocadas deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverão ser enviados um número excessivo de figuras.

REFERÊNCIAS: As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédica] pelo *International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE]* (http://www.icmje.org) e que pode ser consultado em www.scielo.br/pdf/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf (Versão em Português) ou em www.icmje.org/urm_full.pdf (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em *List of Journals Indexed in Index Medicus* [*National Library For Medicine*] (http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. **A lista das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética.** Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de "resumo", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores.

As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

TEXTO: Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o Sistema de Chamada Numérico. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parênteses. Os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

Observações Gerais:

• Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula “e” entre os sobrenomes;

• Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina "et al.";

• Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento deverão ser indicados/ tratados como autores;

• Nomes contendo mais de um sobrenome deverá ser indicado o último sobrenome, sem partículas de ligação como “de” ou “da”;

• Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofos ou que formem uma expressão deverão ser indicados em seu conjunto;

• Termos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.

Alguns exemplos de citações:

• **Um/dois autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyaji[26] mudaram a denominação do fungo para *Hortaea werneckii*, em homenagem a Parreiras Horta.

• **Mais de dois autores:** Giannopoulos et al.[32] também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.

• **Autores corporativos:** De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes,[17] os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).

• **Editores/ Projetos editoriais:** Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,[5] a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias.

• **Sem indicação de nome de autor:** O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.[14]

AUTORES: Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. **Todos os autores** deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

Observações Gerais:

• Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;

• Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;

• Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;

• Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livre-docência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;

• Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/ emissão recomendados pela NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.

• Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência como suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS: Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra deverá ser iniciada por letra maiúscula. O texto do título não deverá vir nem em negrito e nem em itálico e deverá ser finalizado por ponto.

TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO: Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita com a utilização de ponto e vírgula.

MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS: O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: *Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec.* No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais (445-449, utilizar: 445-9).

EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO: As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra "edição" no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição.

PARÁGRAFOS: Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

Alguns exemplos de referências:

Periódicos:

• **Um Autor:** Marques SA. Paracoccidioidomycosis. Clin Dermatol. 2012 Nov;30(6):610-5.

• **Mais de um autor:** Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. Singapore Med J. 2012 Sep;53(9):604-7.

• **Até seis autores:** Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui

S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. Intern Med. 2012;51(20):2967-71.

• **Mais de seis autores:** Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Nov;56(11):5898-906.

• **Autores pessoais e corporativos:** Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. J Low Genit Tract Dis. 2012;16(3):205-42.

• **Volume com suplemento:** Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. Aliment Pharmacol Ther. 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

• **Número com suplemento:** Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. Cancer Control. 2012; 19(4 Suppl):4-15.

• **Editorial com indicação de autoria:** Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. Allergol Int. 2012;61(3):351-2.

• **Editorial sem indicação de título:** Bartels PD. Editorial. Ugeskr Laeger. 2012;174(42):2518.

• **Artigo/ Editorial sem indicação de autoria:** Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. Proteomics. 2012;12(19-20):2902-3.

• **Carta ao editor:** Dettenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. Dtsch Arztebl Int. 2010;107(8):139.

• **Artigo com DOI:** Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. Pediatrics. 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.

• **Autor corporativo:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2012 Oct 19;61:839-42.

Livros:

• **Um autor/ mais de um autor**: Stockham SL, Scott MA. Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

• **Autor de obra e de capítulo:** Rey L. Bases da parasitologia médica. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

• **Capítulo:** Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Penteado MV. Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

• **Reponsabilidade intelectual destacada:** Diniz D, Sugai A. Guilhem D. Squinca F, organizadores. Ética em pesquisa: temas globais. Brasília: Editora UNB; 2008.

Teses, Dissertações e Monografias:

• **Autor e indicação de grau:** Maranhão FCA. Análise da expressão gênica no dermatófito Trichophyton rubrum mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

Eventos Científicos:

• **Anais com indicação de título:** Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.

• **Anais com indicação de autoria, trabalho e título:** Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH, Dornelas-Ribeiro M, Maia S, et al. Espécies de Candida isoladas de pacientes leucêmicos. In: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007. p. 314.

Órgãos/ Instituições:

• **Um autor corporativo:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

• **Mais de um autor corporativo:** Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Relatório de atividades: 2006. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.

Referências Legislativas:

• **Leis:** Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial da União 20 set 1990; seção 1.

• **Decretos:** Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. Diário Oficial da União 29 jun 2011; seção 1.

• **Portarias**: Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. Diário Oficial da União13 mai 1998; seção 1.

• **Resoluções:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União 14 out 2005; seção 1.

Meios Eletrônicos:

• **Periódicos:** Mondelli AL, Niéro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). J Venom Anim Toxins incl Trop Dis [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf.

• **Referências legislativas:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. Diário Oficial da União 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: http://www.unesp.br/pgr/pdf/rdc30604anvisa.pdf.

• **Eventos Científicos:**. Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 4o. Congreso Virtual de Micología de Hongos Patógenos en América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: http://congresomicologia.ucv.ve.

A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo **Sistema de Gestão de Publicações (SGP)**, no endereço: www.sgponline.com.br/rbac/sgp. Outras formas de submissão, não serão aceitas.

Observações Gerais:

• A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo SGP, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de *status*;

• Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de *login* e senha;

• A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;

• O SGP atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;

• Pedidos de *fast-track* poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pós-graduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores. Os pedidos de *fast-track* deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.

MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da *Revista Brasileira de Análises Clínicas* - RBAC para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC. Declaramos também que o artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores. Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____/_____/_____.

VOCÊ SABIA QUE SE TORNANDO UM ASSOCIADO EMPRESARIAL SBAC SEU LABORATÓRIO CONCORRE A PRÊMIOS TODO MÊS?

Seu laboratório não é um ASSOCIADO EMPRESARIAL?
Conheça os benefícios em se associar à SBAC.



Exposição da sua marca
Página exclusiva do laboratório no portal da SBAC, o que colabora para a exposição e consolidação da marca do seu laboratório.

Consultorias
Acesso a conteúdo exclusivo das consultorias da SBAC nas áreas: Científica, Contábil, Financeira, Jurídica e Marketing, através do nosso portal.

Acesso às videoaulas
Disponíveis no Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – CEPAC;

VEUS SAÚDE - Compras Compartilhadas
Plataforma de compras exclusiva para o Associado Empresarial SBAC.

VEUS

Entre as diversas vantagens, você participa mensalmente de um sorteio de prêmios entre os associados PJ em dia com suas mensalidades.

NÚMERO DA SORTE SBAC

Os associados concorrem com um NÚMERO DA SORTE gerado automaticamente após a confirmação do pagamento da mensalidade.

São passagens aéreas, inscrições para o CBAC 2019, hospedagens, e mais!

Saiba mais em:
sbac.org.br/associadoempresarial/

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas